

**DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN
QUESO COSTEÑO SOBRE *Staphylococcus aureus*.**

MARIA CLAUDIA CAMPO ESCOBAR

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD CIENCIA DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERIA, NOVIEMBRE 2010**

**DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN
QUESO COSTEÑO SOBRE *Staphylococcus aureus*.**

MARIA CLAUDIA CAMPO ESCOBAR

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
BACTERIOLOGA**

Directores:

LINDA MARIA CHAMS CHAMS Esp.

DALDO ARAUJO VIDAL

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA
2010**

**El Jurado calificador del trabajo no será responsable de las ideas emitidas
por los autores (Artículo 46, Acuerdo 006 de mayo de 1979)
(Consejo Directivo)**

NOTA DE ACEPTACION

Presidente Del Jurado

Jurado

Jurado

Montería, Noviembre de 2010

DEDICATORIA

A Dios por regalarme la sabiduría y la agilidad para trabajar en esta investigación.

A mis padres y hermanas por acompañarme en todas las etapas de mi vida. Con su apoyo incondicional y su confianza, me han ayudado a ser una gran persona en el día de hoy.

A mis amigas Marcela, Claudia y Andrea que me han acompañado en todas mis aventuras.

A Roberto por su entera confianza, comprensión y su amor.

A todos los docentes que conforman el departamento de Bacteriología, por compartir cada uno de sus conocimientos.

A todos mis compañeros de estudio por estar siempre a mi lado y conducir juntos hacia la victoria.

Y por último y no menos importante, a mi abuelo Juan ser mi mayor inspiración.

María Claudia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis agradecimientos a todas aquellas personas que colaboraron con la realización de este trabajo:

A mis directores, Dra Linda Chamms Chamms. Esp. y Daldo Araújo Vidal. Ing. de Alimentos, por su esfuerzo, y dirección de este proyecto.

A la Dra. Oliva Enis Otero por facilitarme la infraestructura necesaria para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado calificador:
Dra. Virginia Rodríguez Rodríguez. Bacterióloga Esp.
Dr. Eduardo Thorrens Romero. Bacteriólogo.

A Jairo Combat Caballero, Enalvis Padilla Berrio, Auxiliares de Laboratorio, Leidy Ríos Marín, Bacterióloga. Programa de Bacteriología Universidad de Córdoba., por su colaboración en la preparación de los materiales.

A Marinella Crawford Barrera, por su colaboración en la caracterización físico – química de los quesos.

A Jorge Durango Borja, Estadístico., en la organización del diseño estadístico del proyecto y análisis de los resultados.

A todos mis amigos que participaron en la elaboración de esta tesis.

CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVOS GENERALES	14
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
3. MARCO REFERENCIAL	15
3.1. BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LACTICAS	15
3.1.1 NISINA	16
3.1.2 ESTRUCTURA	17
3.1.3 SOLUBILIDAD	17
3.1.4 FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD DE LA NISINA	17
3.2 EL QUESO COSTEÑO	18
3.2.1 <i>Staphylococos aureus</i>	19
3.2.1.1 Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.2.3 Estudios relacionados	21
3.3. MARCO LEGAL	24
4. METODOLOGÍA	25
4.1. POBLACION Y MUESTRA	25
4.2. SITIO DE TRABAJO	25
4.3. MATERIALES Y METODOS	26
4.3. 1 Determinar las tres concentraciones mínimas de nisina que inhiban el crecimiento de <i>S. aureus</i> .	26
4.3.2 Caracterizar la materia prima y elaborar el queso costeño con tres diferentes concentraciones de nisina.	26
4.3.3 Caracterizar fisicoquímicamente los quesos costeños preparados con las tres diferentes concentraciones de nisina.	27
4.3.4. Determinar la supervivencia y el crecimiento de <i>Staphylococcus</i>	

<i>aureus</i> en el queso costeño elaborado con diferentes concentraciones de nisina.	27
4.3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
4.4. Variables e indicadores	28
4.4.1.1. Variables independientes	28
4.4.1.2. Variables dependientes	28
4.4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
4.4.5. PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LOS DATOS	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6 CONCLUSIONES	36
7. RECOMENDACIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS	51

LISTA DE CUADROS Y GRAFICAS

	Pág.
Cuadro 1. Requisitos fisicoquímicos para el queso	19
Cuadro 2. Requisitos microbiológicos para el queso fresco	19
Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria	30
Cuadro 4. Análisis fisicoquímico	30
Cuadro 5. Análisis sensorial	
Gráfica 1. Crecimiento de <i>S. aureus</i> a 10°C	32
Gráfica 2. Crecimiento de <i>S. aureus</i> a 30°C	32
Cuadro 6. Análisis de la leche cruda	33
Cuadro 7. Análisis de varianza Usual en R	
Cuadro 8. Comparación de los tratamientos (Grupos, tratamientos y medias)	34
Gráfica 3. Comparación de recuentos por tratamientos	35

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i> .	52
ANEXO B. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i> . Observaciones: Crecimiento <i>S aureus</i> . Concentraciones – tiempos y temperatura.	53
ANEXO C. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i> . Determinación de las tres concentraciones mínimas de nisina que inhiban el crecimiento de <i>S. aureus</i> .	55
ANEXO D. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE <i>Staphylococcus aureus</i> . Concentración mínima inhibitoria.	57
ANEXO E. Determinación de la supervivencia y el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en el queso costeño elaborado con diferentes concentraciones de nisina.	58

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el efecto de la nisina adicionada en queso costeño sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. **Materiales y Métodos.** Se elaboraron 10 libras de queso costeño, 3 libras para cada una de las concentraciones (12, 14,4 y 16,8 mg/Kg de Nisina) determinadas por el método de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) según recomendaciones del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute, 2006). La materia prima (leche) se sometió a las operaciones de filtración, refrigeración y pasteurización, se determinaron valores de pH por el método de la A.O.A.C. 920.124 de 1990. Para la determinación de la supervivencia y crecimiento de *Staphylococcus aureus* en los quesos elaborados se utilizaron cepas estandarizadas de *S. aureus* ATCC 29213, los quesos se incubaron a 10°C y 30°C y se realizó el análisis microbiológico en el tiempo cero, 6, 12, y 24 horas de incubación, según el método de la FDA (Food and Drug Administration, 2003). Se planteó un Arreglo factorial 2³, con 2 Temperaturas (10°C y 30°C), 3 Concentraciones de nisina (12 mg/Kg, 14,4 mg/Kg y 16,8 mg/Kg) y horas (0, 6, 12 y 24 respectivamente) de forma aleatoria, con 3 repeticiones por tratamiento. **Resultados.** El crecimiento del *S. aureus* ATCC 29213, se ve altamente influenciada por la combinación entre la temperatura y la concentración de nisina, observándose que la combinación de la menor temperatura de almacenamiento (10°C) y la mayor concentración de nisina (16,8 mg/Kg) consiguen disminuir considerablemente el recuento de UFC/mL de la bacteria en estudio. Se concluye que la interacción *Temperatura x Concentración* es significativa (P=0.004215) y además los efectos principales temperatura, concentración y horas son altamente significativos respectivamente. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos revelaron que la concentración de nisina requerida para reducir significativamente la carga de *S. aureus* ATCC 29213 es la de 16,8 mg/Kg, concentración que está por encima de la cantidad recomendada por el Codex Alimentario.

1. INTRODUCCIÓN

En el departamento de Córdoba, zona ganadera por excelencia en Colombia, se ha estimado una producción diaria de 1´060.510 litros de leche (Berrocal, 2004) y un 70% de ésta se destina a la elaboración de queso, empleándose en su mayoría sistemas artesanales (Oliver *et al.*, 2005). El queso costeño, es de alto consumo en la población del departamento y la totalidad que se produce se prepara con leche cruda, sin ningún tipo de conservante convirtiéndolo en un alimento con alto riesgo de contaminación desde el momento de su fabricación hasta su comercialización, permitiendo la vehiculización de bacterias productoras de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) como, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium spp.* (Calderon *et al.*, 2006).

En Colombia hasta la semana epidemiológica N° 53 de 2009, se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia 13161 casos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), involucrados en 899 brotes, comparado con el mismo periodo del año 2008, donde se notificaron 8348 casos, se observa un incremento del 36.5% en la notificación al sistema de vigilancia. Hasta la semana epidemiológica 53 de 2009, el mayor número de casos se presentaron en la semana 6, debido a la ocurrencia de dos brotes, uno con 769 casos y otro con 183 casos, notificados por los entes territoriales de Bogotá y Sucre respectivamente. De las 36 Unidades Departamentales y Distritales, el 94.4 % notificaron casos de ETAs al SIVIGILA., el Distrito de Bogotá (142 brotes) y Antioquia (110 brotes) fueron los mayores notificadores, seguido de Huila y Sucre con 61 brotes y Nariño con 52 brotes. Del total de casos implicados en brotes de ETAs, notificados por las entidades territoriales hasta Semana N° 53, el 56.2% fueron confirmados por laboratorio, el 8.4% confirmados por nexo epidemiológico, el 35.4% por clínica. El grupo de edad que presentó la mayor incidencia de ETAs fue el de 15 a 44 años (49.8 %),

lo cual corresponde a 6555 casos, seguido por el grupo de 5 a 14 años (32.8 %) con 4312 casos. (SIVIGILA, 2009)

Los principales agentes causales de ETAs en nuestro país son *Salmonella spp.* y *S. aureus*, los cuales ocupan los primeros lugares de los reportes anuales de la red de vigilancia en salud pública en Colombia (Vanegas *et al.*, 2008, Torres *et al.*, 2004). La utilización de sustancias antimicrobianas que han encontrado un amplio campo de aplicación en el sector alimentario como bioconservante es la nisina, convirtiéndose en una práctica de enorme interés tecnológico. La conservación de un alimento requiere de la eliminación o limitación de la habilidad de los microorganismos patógenos de crecer. Considerándose importante realizar esta investigación donde se evalúa el efecto de la nisina adicionada al queso costeño para así inhibir el crecimiento del *S. aureus* (uno de los principales causantes de intoxicación alimentaria en alimentos manipulados) en este producto, los resultados obtenidos pueden aportar información de importancia a los fabricantes del producto, que se apropiarán de esta práctica sencilla, económica y de fácil aplicación para mejorar la calidad microbiológica del producto y alargar su vida útil, comercializando un queso con valor agregado que beneficie a los fabricantes por el aumento en la venta de un producto de mejor calidad y a los consumidores por adquirir un alimento más sano e inocuo. Además, los organismos de Salud Pública podrán organizar campañas educativas y sanitarias sobre producción, conservación y comercialización de queso costeño apto para el consumo y así contribuir a minimizar la morbimortalidad asociada a infecciones vehiculizadas por este alimento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la nisina adicionada en queso costeño sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración mínima de nisina que inhibe el crecimiento de *S. aureus*.
- Caracterizar la materia prima y elaborar el queso costeño con tres diferentes concentraciones de nisina.
- Caracterizar fisicoquímicamente los quesos costenos preparados con las tres diferentes concentraciones de nisina.
- Determinar la supervivencia y el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el queso costeño elaborado con las tres diferentes concentraciones de nisina.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 BACTERIOCINAS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Las bacteriocinas son polipéptidos activos, sintetizados vía ribosomal por bacterias lácticas. Se caracterizan por presentar un efecto antagónico contra especies de microorganismos taxonómicamente relacionadas, ya sea patógenos y/o causantes de deterioro (Cotter *et al.*, 2005). Dentro de los géneros de bacterias lácticas productores de bacteriocinas se encuentran *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Vásquez *et al.*, 2009). Más tarde el término bacteriocina fue empleado para designar a los péptidos antimicrobianos producidos por bacterias lácticas. En 1953 la empresa inglesa Aplin & Barret en Dorset, Inglaterra lanzó al mercado un concentrado de Nisina conocido como Nisaplin® (Delves-Broughton, 1990). En 1969, la Nisina fue valorada como segura para su uso en alimentos por la *Food and Agriculture Organization / World Health Organization*. En 1983 fue incorporada en la lista de aditivos para alimentos de la Unión Europea (Cotter *et al.* 2005) y en 1988 fue aprobada por la *Food Drug Administration* (FDA) para ser usada en quesos fundidos pasteurizados (Chen y Hoover, 2003). En el 2001, su empleo ya había sido aprobado en 40 países.

En 1993 se clasifican las bacteriocinas según su espectro de inhibición solo en dos grupos: A) Bacteriocinas activas frente a cepas taxonómicamente relacionadas. B) Bacteriocinas con un amplio rango de actividad frente a bacterias gram positivas (Yamazaki *et al.*, 2005). Estudios recientes también manifiestan actividad antagónica de las bacteriocinas producidas por bacterias gram positivas contra microorganismos gram negativos (Todorov *et al.*, 2005). La clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a características físicas, químicas y genéticas es descrita por varios autores (Castellanos *et al.*, 2008; Feria, 2007; Requena *et al.*, 1995;) que coinciden en mencionar las siguientes clases:

Clase I - Lantibióticos: Son péptidos pequeños (menos de 5000 Da), que contiene en su estructura aminoácidos atípicos o modificados caracterizado por la presencia de aminoácidos no comunes como lantionina, metillantionina y a aminoácidos insaturados como dehidroxilamina y dehidrobutirina, referenciados como lantibióticos. A este grupo pertenece la nisina, que es la bacteriocina mejor caracterizada, y se comercializa para uso como aditivo alimentario (Gálvez *et al.*, 2007). Su aplicación en alimentos es amplia, pues actúa adecuadamente a pH ácido lo que permite su uso en alimentos fermentados. Otros ejemplos de este grupo son la lacticina 481 y lacticina S.

Clase II: Son péptidos pequeños termoestables (menos de 10000 Da). Ej. Lactacina B, Lactocina 27. Esta característica de termoresistencia parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Esta característica la hace atractiva para la utilización en la industria de alimentos, porque resistiría tratamientos térmicos.

Clase III: Proteínas termolábiles de peso molecular mayor 30000 Da. Ej. helveticina J. Más recientemente Castellano y colaboradores (2008) reportaron que la última revisión de la clasificación las divide en dos categorías principales: los lantibióticos que contienen lantioninas (clase I) y las bacteriocinas que no contiene lantionina (clase II), mientras que la clase general; proteínas termolábiles (es la clase III de bacteriocinas) constituyen un grupo llamado bacteriolisinas.

3.1.1 Nisina.

La nisina es un antibiótico polipeptídico producido por la bacteria *Lactococcus lactis*. La existencia de esta sustancia se conoce desde finales de la década de 1920, aunque se caracterizó mucho después. Se utiliza desde la década de 1940, aunque de forma muy limitada. Es un conservante bastante efectivo contra las bacterias gram-positivas, ya que se une a sus membranas interfiriendo en sus

sistemas de transferencia de protones. En particular, se podría utilizar para combatir a varios microorganismos patógenos, como *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*, que forman endosporas que resisten mejor el calentamiento que las células vegetativas y también *Listeria monocytogenes*. La nisina es también muy eficaz en la prevención de alteraciones del queso, especialmente quesos fundidos, producidas por *Clostridia*. Actualmente, esta es su principal aplicación. Además, la nisina se inactiva con las enzimas digestivas del hombre, posee termoestabilidad a pH ácido, es atóxica por lo que es reconocido como aditivo generalmente seguro por la FDA y está permitido su uso en más de 50 países (Delves-Broughton, 1990; Rodríguez, 1996).

3.1.2 Estructura.

La cadena polipeptídica de la nisina está formada por 34 aminoácidos, y tienen un peso molecular de 3354. Entre estos aminoácidos se encuentran varios poco comunes, como la lantionina, metilantionina, dehidroalanina y ácido dehidroaminobutírico. Todos ellos se forman por modificación de aminoácidos comunes (serina y treonina), después de la síntesis ribosomal del polipéptido. Tiene cuatro anillos, formados por un puente tioéter del tipo de la lantionina.

3.1.3 Solubilidad.

La nisina es soluble en medio acuoso y muy estable en medio ácido (3.5 -8).

3.1.4 Factores que afectan la actividad de la Nisina.

La nisina es bastante resistente a los tratamientos térmicos, especialmente en medio ácido, a pH menor de 3,5. Se obtiene por fermentación, y su principal inconveniente es que es un conservante comparativamente caro, lo que limita su utilización. En el tubo digestivo se degrada como las demás proteínas.

3.2 EL QUESO COSTEÑO

El queso costeño es un producto autóctono de la costa Atlántica, que se elabora de forma artesanal, con alto contenido de sal y baja humedad y es utilizado principalmente en la industria panadera. Es un producto fresco, no ácido, prensado, no madurado, elaborado a partir de la leche de vaca. Por su baja humedad se puede clasificar como un queso semiduro con un contenido alto de grasa. La forma tradicional de este queso es el de bloques rectangulares, de color blanco o crema con poco brillo, de superficies irregulares. La textura es abierta con algunos ojos mecánicos, que se deshace cuando se frota en los dedos (Universidad Nacional de Colombia, 2008).

Este alimento puede contaminarse con diferentes tipos de agentes que pueden alterar o no sus características y en dependencia del agente contaminante se distinguen la contaminación física, la química y la biológica. Esta última es la más estudiada, ya que los microorganismos causan la mayoría de las intoxicaciones alimentarias. (Frazier *et al.*, 2003). Los principales agentes causales de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Colombia son *Salmonella* spp. y *S. aureus*, los cuales ocupan los primeros lugares de los reportes anuales de la red de vigilancia en salud pública en Colombia, los productos lácteos y aquellos que requieren de manipulación y están listos para el consumo humano, son los más relacionados con este tipo de brotes (Vanegas *et al.*, 2008).

La producción de estos quesos se da en una amplia zona del país y la denominación varían de acuerdo con la zona donde se produce, es así como en la costa atlántica, se denomina queso blando, en otros departamentos se denomina queso fresco, prensado, campesino, entre otros. Los quesos campesino y prensado tiene respectivamente en promedio las siguientes características: 70.95 y 65.57% de humedad del queso desengrasado; 49.34 y 45.60% de materia grasa en la materia seca. Esto permite clasificarlos como quesos blandos y semiblandos de alto contenido de materia grasa de acuerdo con la clasificación de FAO/OMS

(ICTA y PRAD, 1994). Los requisitos microbiológicos y fisicoquímicos que se describen a continuación pertenecen a la resolución 2310 de 1986 y 1809 de 1989 respectivamente del Ministerio de Salud de Colombia para quesos frescos.

Cuadro 1. Requisitos fisicoquímicos para el queso

Humedad del queso desengrasado	% m/m (máx.)
Duro	40.00
Semiduro	55.0
Semiblando	65.00
Blando	80.00
Materia grasa en extracto seco	% m/m (min.)
Rico en grasa	60.00
Graso	45.00
Semigrasa	20.00
Semimagro	5.00
Magro	0.1

Fuente: Resolución 2310 de 1986, Ministerio de Salud de Colombia

Cuadro 2. Requisitos microbiológicos para el queso fresco

REQUISITOS	n	m	M	c
NPM coliformes fecales/g	3	<100	—	0
Hongos y levaduras	3	100	500	1
Estafilococo coagulasa positiva/g	3	1000	3000	1
Salmonella/ 25 g	3	0	—	0

n = número de muestra, **m** = nivel mínimo aceptable de calidad; **M**= nivel máximo aceptable de calidad, **c**= número máximo de muestra entre m y M.

Fuente: Resolución 2310 de 1986, Ministerio de Salud de Colombia.

3.2.1 *Staphylococcus aureus*.

El género *Staphylococcus*, es uno de los grupos bacterianos más estudiados; es un coco Gram positivo, catalasa y coagulasa positivos, se hallan en la piel y mucosas y pueden llegar a los alimentos a través de manipuladores de alimentos con infecciones piógenas agudas o por portadores asintomáticos, que los albergan en fosas nasales y faringe (Boyce, 1998; Al-Shemari *et al.*, 2007) asociándose,

entonces, su presencia en alimentos a una inadecuada manipulación o al empleo de materia prima contaminada constituyéndose, a su vez, en fuente de diseminación a nuevos hospedadores susceptibles de adquirir la infección. Su metabolismo es de tipo fermentativo, son aerobios y anaerobios facultativos. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gas y produce acetil metil carbinol. Fermentan el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis y no hidrolizan el almidón (Murray *et al.*, 2006).

S. aureus, es un importante patógeno humano, se considera una bacteria osmotolerante, capaz de crecer en una actividad de agua (a_w) baja como 0,86. Las enfermedades que causa incluyen infecciones agudas como la sepsis y toxemias, entre las que están: síndrome de shock toxico estafilocócico (SSTE), síndrome de piel escaldada estafilocócica (SPEE) e Intoxicación Alimentaria Estafilocócica (Murray *et al.*, 2006). El *S. aureus*, posee una amplia gama de factores de virulencia catalogados en toxinas, enzimas y factores estructurales, sustancias agresivas asociadas con la capacidad de esta bacteria para producir la enfermedad. Varían desde componentes de la membrana celular como los ácidos teicoicos hasta exoenzimas que incluyen estafiloquinasa, hialuronidasa, fosfatasa, coagulasa, catalasa, proteasa, nucleasa, lipasa, leucocidina, hemolisinas y las enterotoxinas, que causan la intoxicación alimentaria, convirtiéndolo en uno de los microorganismos más ampliamente estudiados en la industria de alimentos (Dos Santos, 2007).

3.2.1.1 Crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Son capaces de crecer en presencia de un 40% de bilis. Soportan tasas elevadas de cloruro sódico. La temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40°C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pHs mucho más extremos. Poseen una enzima, coagulasa que los diferencia del resto de las especies del género, esta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina (Murray *et al.*, 2006).

S. aureus, es inhibido por la Nisina, comportándose esta bacteriocina en un potente bloqueador de esta bacteria (Marcen, 2000). Se han realizado diferentes estudios que demuestran la efectividad de las bacteriocinas provenientes de BAL contra cepas de *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*: Kalmokoff, *et al.* (1999), Eppert *et al.* (1997), Rodríguez *et al.* (2002) y Muriana (1996), han reportado la aplicación de nisina y otras bacteriocinas para el control de cepas de *S. aureus* y *Listeria spp.*, resistentes a temperaturas de refrigeración y a tratamientos con desinfectantes convencionales en la industria alimentaria.

3.2.3 Estudios relacionados.

La incidencia de las enfermedades transmitidas a través de los alimentos causada por microorganismos contaminantes no es precisa, debido a las grandes limitaciones que existen en el actual sistema de información epidemiológica. Los centros de control y prevención de enfermedades, de los Estados Unidos de América, estiman que las enfermedades pueden afectar cada año hasta el 30% de la población de los países industrializados; Las enfermedades diarreicas son la segunda mayor causa de muerte de niños menores de cinco años, y ocasionan la muerte de 1,5 millones de niños cada año (OMS. 2009). Cada año ocurren en los Estados Unidos 76 millones de casos de enfermedad transmitida por los alimentos. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) estiman que ocurren 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes relacionadas con las enfermedades transmitidas por alimentos cada año; de las cuales el 82% son de etiología desconocida, del 18% restante el 30.2% fueron causados por bacterias (principalmente *Campylobacter spp.*, *Listeria* y *Salmonella spp.*), el 2.6% por parásitos (principalmente *Giardia spp.* y *Toxoplasma spp.*) y cerca de 67.2% por virus (en su mayoría rotavirus). (ETA-SVCSP-INS, 2008).

En el año 2007, hubo un total de 17,883 casos de ETAs. El número mayor de casos se debió a la *Salmonella spp.*, con una tasa de incidencia de 14.92 por cada 100,000 personas. Las infecciones por *Campylobacter spp.* fueron las otras

infecciones más comunes con una tasa de incidencia de 12.79 por 100,000 personas. En ese mismo orden siguieron las infecciones por *Shigella* spp., con una tasa de incidencia de 6.26 por 100,000 personas. Las tasas de infecciones fueron particularmente altas entre los niños menores de 5 años. (Tauxe, 2008). Se estima que las enfermedades causadas por *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* en los EE.UU. tienen costos de casi US\$ 7 billones cada año (INFOSAN, 2005).

En los brotes de intoxicación alimentaria con etiología confirmada, 57% se atribuyeron a bacterias, 12% a virus y 21% a toxinas marinas. Los restantes 10% fueron causados por parásitos, contaminantes químicos o toxinas de las plantas. Los productos alimenticios más comúnmente asociados fueron: peces (22%), agua (20%), y carnes de ganado (14%). Según los datos de los brotes con agentes causales confirmados por laboratorio, *Salmonella* spp., fue indudablemente una de las bacterias más frecuentemente informada (20% de los brotes reportados) (ETA-SVCSP-INS, 2008).

Del total de casos presentados en los brotes de ETAS, notificados hasta semana epidemiológica N° 12, en el año 2008, se seleccionaron los más representativos, de acuerdo al tamaño de población involucrada, la calidad de la información y la configuración final del brote enviado por las entidades territoriales al INS. Los lugares de consumo en donde se presentaron la mayor incidencia de brotes fueron el hogar y los establecimientos educativos. El *Staphylococcus* coagulasa positivo (11.1%) y *Salmonella* spp. (11.1%), fueron los agentes etiológicos más detectados en los resultados de las muestras analizadas y procedentes de brotes de ETA. Otros indicadores de importancia para Colombia fueron: El grupo de edad que presentó la mayor incidencia de ETA fue el de 15 a 44 años (47.13%), lo cual corresponde a 412 casos, seguido por el grupo de 5 a 14 años (31.35%) con 274 casos. (ETA-SVCSP-INS, 2008)

Hasta la semana epidemiológica No. 40 del 2008, se notificaron al sistema nacional de vigilancia 6033 casos por archivos planos de ETAs. Por archivo colectivo 2008 se ha notificado 4154 casos en comparación del 2007 se notificaron 4240 caso con una diferencia de 2%. Hasta el décimo periodo epidemiológico del 2008, se presentó el mayor número de casos en la semana 22, debido a la presencia de un brote que ocurrió en un establecimiento penitenciario, ubicado en el Municipio de Bello (Antioquia) que aportó 1804 casos, de los 1843 casos notificados esa semana (Campo, 2008).

Investigaciones relacionadas a la contaminación de quesos artesanales son las siguientes:

Vanegas *et al.*, (2008) han indicado que la presencia de *S. aureus* coagulasa positivo en los quesos artesanales puede indicar una contaminación a partir de piel, boca o fosas nasales de personas portadoras que manipularon el alimento. El hallazgo de algunas condiciones críticas de salubridad en el expendedor (manipulador del producto) como el poco aseo de manos, falta de certificados médicos, no afiliación a la seguridad social o inasistencia a programas de control y vigilancia, se muestran como factores de riesgo para la contaminación del producto.

Algunos productos en los cuales se ha implementado el uso de bacteriocinas, específicamente la nisina, son especialmente productos lácteos como el queso Gouda y queso Emmenthal donde la nisina inhibe el crecimiento de *Cl. Butyricum* y *Cl. Tyrobutyricum*. En el yogurt se da una inhibición del cultivo iniciador *Lactobacillus delbrueckii, bulgaricus* y *Strptococcus thermophilus* por la nisina (Rojas y Vargas, 2008) por lo que se comprueba que no cualquier bacteriocinas puede ser aplicada como preservante en alimentos.

En los quesos frescos los tratamientos adicionados con nisina no se logró aislar ninguna colonia de *Staphylococcus*, demostrándose por un lado, la efectividad de la nisina para inhibir su crecimiento y su capacidad para evitar la contaminación con el patógeno (Samelis, J et al, 2003).

En Montería-Córdoba un estudio realizado por Martínez y colaboradores (2006), mostro una contaminación del queso costeño del 100% con *S. aureus*, coliformes totales y fecales, convirtiéndolo en un alimento no apto para el consumo. Yáñez y colaboradores (2008) en un estudio realizado en alimentos expendidos en la vía pública en Montería reportaron mayor contaminación por *Salmonella spp.* En quesos de 18,4% por PCR-RT y 5,3% por el método convencional.

3.3 MARCO LEGAL

- Ley 9 de 1979 por la cual se reglamenta el Código Sanitario Nacional
- Resolución 01804/89 por la cual se modifica la Resolución No 02310/86 que reglamenta parcialmente el título V de la Ley 09/79. La resolución indica las características fisicoquímicas y microbiológicas del queso fresco. Especifica los exámenes rutinarios y especiales que deben practicarse y el número de muestras a evaluar para determinar la calidad del queso.
- Decreto 3075 de 1997, (Decreto reglamentario a la Ley 09 de 1979) Regula todas las actividades que pueden generar factores de riesgo por el consumo de alimentos. El decreto es de aplicación a fábricas de alimentos, a las actividades de la producción y a las actividades de vigilancia y control.

4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE ESTUDIO

La investigación corresponde a una observación de tipo exploratorio y descriptivo de corte transversal que se realizó en la ciudad de Montería-Córdoba, Colombia 2010.

4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población objeto del estudio es el queso costeño elaborado en la planta piloto del programa Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Córdoba-Colombia, sede Berástegui. La muestra correspondió a 10 libras de queso costeño elaborado en el área de lácteos de la planta piloto, el queso se preparó teniendo en cuenta la metodología planteada en este proyecto y se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta ser utilizados.

4.3 SITIO DE TRABAJO

Los análisis de pH y presencia de antibióticos en la leche cruda y pH se llevo a cabo en los laboratorios de Análisis de Alimentos y Lactología en la sede de Berástegui de la Universidad de Córdoba. Las pruebas microbiológicas fueron realizadas en el laboratorio de Microbiología del programa de Bacteriología de la Facultad Ciencias de la Salud, Sede Central. La producción y almacenamiento de los quesos en la Planta Piloto de Lácteos de la Universidad de Córdoba (Sede Berástegui).

Ubicación Sede Central: municipio de Montería, capital del departamento de Córdoba, localizada al noroeste de Colombia, a 8°45´ de latitud norte y 75°53´ de

longitud oeste. Tiene una altitud de 18 metros sobre el nivel del mar. Temperatura promedio de 28°C (Instituto geográfico Agustín Codazzi).

Ubicación Sede Berástegui: corregimiento de Berástegui, municipio de Ciénaga de Oro, departamento de Córdoba, Colombia; con una temperatura promedio de 29°C, humedad relativa 86% y 20 m.s.n.m. Enmarcada geográficamente entre 8° 31 de longitud norte y 75 ° 58 de latitud oeste del meridiano de Greenwich (Instituto geográfico Agustín Codazzi).

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Determinar la concentración mínima de nisina que inhibe el crecimiento de *S. aureus*.

Se utilizó la técnica de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) según recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute, 2006 (CLSI) con diferentes concentraciones de Nisina (Ver anexo D), para escoger las tres concentraciones de nisina que inhiben el crecimiento de la cepa de *S. aureus* ATCC 29213, utilizada en el estudio y así preparar los quesos con las tres concentraciones de nisina que tuvieron efecto antimicrobiano. (Ver anexo D y C)

4.4.2 Caracterizar la materia prima y elaborar el queso costeño con tres diferentes concentraciones de nisina.

La leche de vaca que se utilizó en la investigación fue obtenida del programa de bovinos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Córdoba, una vez recepcionada la materia prima se sometió a las operaciones de filtración y refrigeración hasta una temperatura de 4°C; se determinó la presencia de antibióticos en la leche utilizando el método colorimétrico de DELVOTEST (SP –NT de DSM) y la medición del pH por valoración potenciométrica según el

método de la A.O.A.C. 920.124 DE 1990. Se realizaron análisis fisicoquímico por triplicado utilizando el equipo BIOLAC 60, que determinó grasas, lactosa, temperatura de la leche, agua adicionada, proteínas, sólidos no grasos, sales, densidad y crioscopia según el método FIL (FEDERACION INTERNACIONAL LECHERA-IDF 141B, 1996). Se elaboraron 10 libras de queso costeño, por el proceso estandarizado del manual de productos lácteos del ICTA 1994, utilizando leche pasteurizada a 63°C por 30 minutos, 3 libras con la menor concentración de nisina, 3 con la concentración media de nisina, 3 libras con la mayor concentración de nisina y una libra que se utilizó como control (no contenía nisina).

4.4.3 Caracterizar fisicoquímicamente los quesos costeños preparados con las tres diferentes concentraciones de nisina.

La medición del pH en el queso se realizó con la misma metodología descrita en el numeral 4.3.2. Se realizó la medición de los valores de pH en los quesos costeños cada vez que se realizaba el análisis microbiológico. También se determinó el porcentaje de materia grasa y materia grasa en la materia seca por el método de Gerber Van Gulik. 1957, el porcentaje de humedad y humedad de queso sin grasa por Gravimetría de la norma ICONTEC 735 (item 6.3), se determinaron proteínas por el método Micro Kjeldahl. Oficial methods of analices 988.05, acidez titulable por el método titrimétrico AOAC 920.124 y sólidos totales por Gravimetría según norma ICONTEC 735. (Ver anexo A)

4.4.4 Determinar la supervivencia y el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el queso costeño elaborado con diferentes concentraciones de nisina.

Se realizaron por triplicado los arreglos relacionados a continuación para este objetivo:

Queso costeño elaborado con Leche pasteurizada:

Queso costeño con menor concentración de nisina

Queso costeño con concentración intermedia de nisina

Queso costeño con mayor concentración de nisina

Se utilizaron cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y se inoculó cada queso por inmersión durante un minuto en una suspensión bacteriana de las cepas estandarizada con una concentración correspondiente a un Mcfarland de 0,5 lo que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Densidad Óptica entre 0,08 y 0,1) (CLSI, 2006). Después se incubaron los quesos a 10°C y temperatura ambiente (30°C) rangos de temperatura de conservación del alimento en nuestro medio, realizándose el recuento de *S. aureus* a las 0 horas (proceso que se realiza antes de la incubación), 6, 12 y 24 horas de incubación, determinando así, el número de unidades formadoras de colonias. Para el aislamiento e identificación de *S. aureus* se utilizó el método de la FDA (Food and Drug Administration, 2003). (Ver anexo E)

4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se planteó un Arreglo factorial 2 x 3, con 2 Temperaturas (10°C y 30°C), 3 concentraciones de nisina (12 mg/Kg, 14,4 mg/Kg y 16,8 mg/Kg) y horas (0, 6, 12 y 24 respectivamente) de forma aleatoria, con 3 repeticiones por tratamiento.

4.5.1 VARIABLES E INDICADORES

4.5.1.1. Variables independientes. Temperaturas de almacenamiento (10°C y 30°C); tipo de queso: elaborado con leche pasteurizada con concentraciones de nisina (alta, media y baja), tiempo de incubación (0,6, 12 y 24 horas).

4.5.1.2. Variables dependientes. pH, variables organolépticas (Color y apariencia general); variables microbiológicas (Crecimiento de *Staphylococcus aureus*).

4.5.3 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los resultados obtenidos se tabularon y representaron en graficas acompañados de su análisis y discusión respectiva. Se les practicó análisis estadístico mediante prueba de Varianza (Software R) para determinar la significancia entre las variables del estudio y prueba de Duncan o prueba de medias para precisar las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que la nisina es un producto clasificado como seguro por la FDA, que puede ser digerido por las enzimas gástricas del ser humano y que no genera efectos tóxicos en el organismo, se realizó la determinación de las tres concentraciones de nisina a utilizar en esta investigación empleando la técnica de CIM, según recomendaciones del CLSI, donde se concluyó que las tres concentraciones a utilizar serían 12, 14.4 y 16.8 mg/Kg, donde las dos últimas concentraciones empleadas en el estudio no están permitidas para el consumo humano, observadas en el cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria

CONCENTRACION DE NISINA		CRECIMIENTO	
		SI	NO
700 UI	16,8 Mg/Kg		X
600 UI	14, 4 Mg/Kg		X
500 UI	12 Mg/Kg		X
400 UI	9,6 Mg/Kg	X	
300 UI	7,2 Mg/Kg	X	
CONTROL DEL MEDIO			X
CONTROL DEL M.O.		X	

Los resultados obtenidos revelaron que los niveles requeridos de nisina, para reducir significativamente la carga de *S. aureus* ATCC 29213 ocurrió a partir de 12 mg/kg en donde no se observó crecimiento bacteriano, que es la carga recomendada en la norma general del Codex para los aditivos alimentarios, CODEX STAN 192-1995 del Codex Alimentarius, actualizado hasta la 33ª Reunión de la Comisión (2010), siendo comparable esta reducción con proporciones de nisina de 14,4mg/Kg y 16,8 mg/Kg . Estos resultados confirman los reportes previos de que la nisina es capaz de ejercer un efecto bactericida e inhibir el crecimiento del *Staphylococcus aureus*. Según la bibliografía consultada, la incorporación de nisina en los quesos puede variar según las legislaciones pertinentes de cada país. En Colombia las cantidades sugeridas por la norma general del Codex para los aditivos alimentarios, CODEX STAN 192-1995 del Codex Alimentarius (2010) es de 12,5 mg/Kg, como se pudo comprobar en esta prueba preliminar, fue suficiente para reducir la carga de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Los resultados del análisis fisicoquímico y análisis sensorial se resumen en los cuadros 4 y 5, los cuales se ajustan a los requerimientos exigidos por el ministerio de protección social, la evaluación sensorial

Cuadro 4. Análisis fisicoquímico

Quesos Concentraciones de nisina	pH	% Acidez	% Humedad	% Grasa
12 mg/Kg	6.11	0.6930	42.7	20
14.4 mg/Kg	6.0	0.5544	36.2	24
16.8 mg/Kg	5.66	0.4158	42.0	20

Cuadro 5. Análisis sensorial

	Apariencia	Textura	Color	Olor
12 mg/Kg	Poca presencia de material microscópico, aspecto limpio	Buena consistencia y compactación grasosa, huecos pequeños muy escasos no comunicados sin presencia de abertura	blanco	Fragante(queso fresco)
14.4 mg/Kg	Aspecto limpio, sin presencia de material particulado	Buena consistencia y compactación grasosa, huecos pequeños muy escasos no comunicados sin presencia de abertura	blanco	Fragante(queso fresco)
16.8 mg/Kg	Escasa presencia de material microscópico, aspecto limpio	Buena consistencia y compactación grasosa, huecos pequeños muy escasos no comunicados sin presencia de abertura	blanco	Fragante(queso fresco)

Cuadro 6. Análisis de la leche cruda

Análisis para la leche cruda	Observaciones
-------------------------------------	----------------------

Acidez (acido láctico)	0.19 % acido láctico
Grasa	4.23 por 100 ml de leche
Densidad	32.54 ^o Lactometricos
Lactosa	4.87
Sólidos no grasos	8.94
Proteínas	3.17
H2O adicionada	0
Crioscopia	-0.574 °C
Sales	0.75%(cloruro)

En el cuadro 6 se pueden observar los diferentes análisis que se realizaron para evaluar las características de la leche cruda utilizada en el estudio realizado, de las cuales podemos concluir que esta leche cumple con los requisitos exigidos por el ministerio de protección social en el decreto 2838 de 2006 y la leche analizada es fresca y estaba bajo condiciones de conservación y preservación adecuada no permitiendo la acidificación de esta.

En los siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos, seguidamente se realiza un promedio de estos y se grafica.

PRIMERA REPLICA

QUESO 10°C

	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs	22800	20400	28000	19
6hrs	13600	9200	7800	13
12hrs	9800	4200	1000	16
24hrs	6000	2800	400	19

QUESO 30°C

	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs	26800	22500	25000	21
6hrs	23800	15600	14000	18
12hrs	22800	11200	8000	15
24 hrs	18800	6600	4800	12

Fuente: datos investigadores

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias /g

SEGUNDA REPLICA

QUESO 10°C

	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs	35200	36800	30000	17
6hrs	8000	6500	4600	11
12hrs	6700	3200	1300	18
24 hrs	4000	1700	100	11

QUESO 30°C

	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs	28000	24800	26000	19
6hrs	19200	13400	13600	18
12hrs	17600	11600	12400	14
24hrs	15800	9800	6000	16

Fuente: datos investigadores

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias /g

TERCERA REPLICA

QUESO 10°C

	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs	23400	30000	23000	11
6hrs	12200	7400	4200	8
12hrs	6100	4450	1580	3
24hrs	5700	1130	94	1

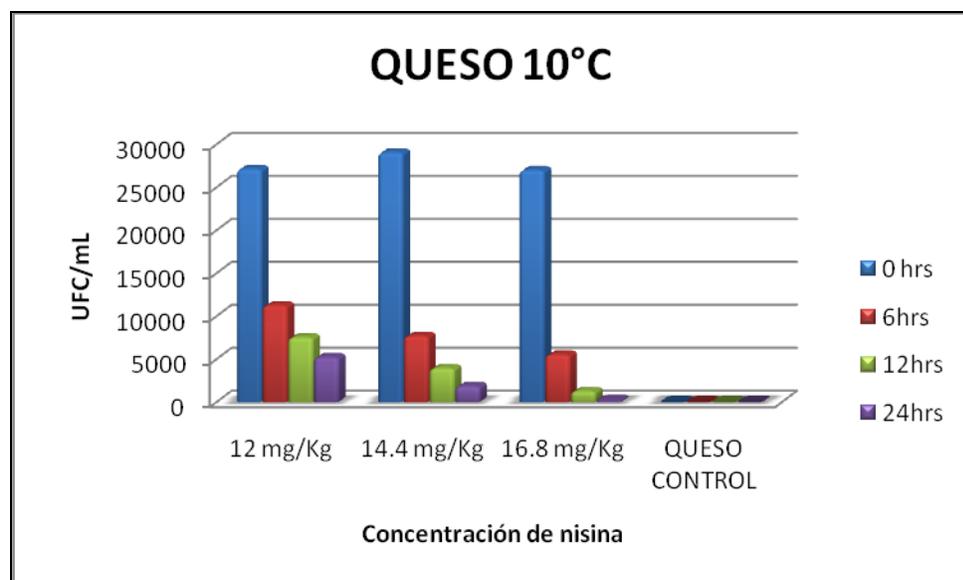
QUESO 30°C

	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs	31000	28000	22000	17
6hrs	19800	18000	19000	15
12hrs	21000	9100	7700	16
24hrs	16700	7000	4560	18

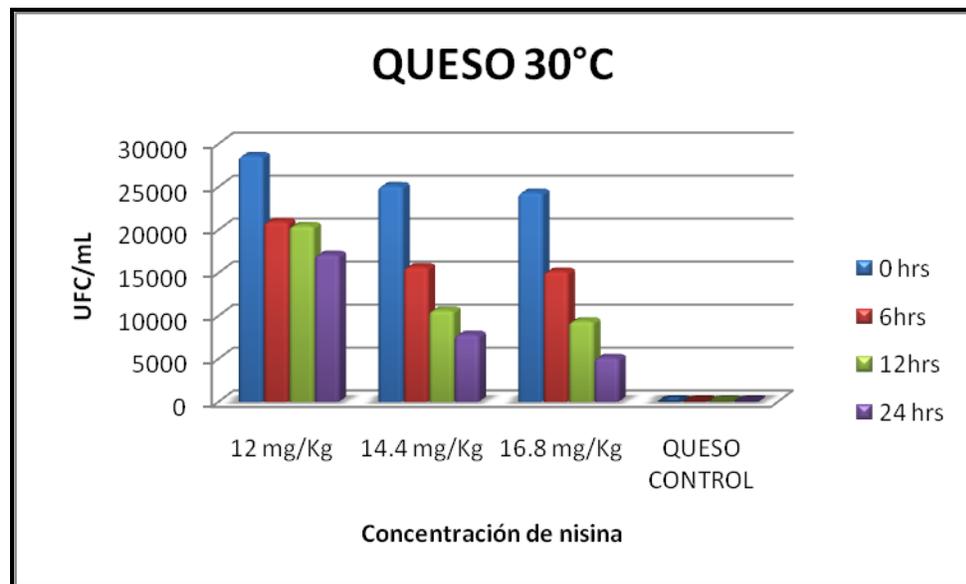
Fuente: datos investigadores

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias /g

En las Gráficas 1 y 2 se observa que el crecimiento del *S. aureus* ATCC 29213, se ve altamente influenciada por la combinación entre la temperatura y la concentración de nisina, porque la combinación de la menor temperatura de almacenamiento y mayor concentración de nisina consiguen disminuir considerablemente el recuento de UFC/mL de la bacteria en estudio.



Gráfica 1. Crecimiento de *S. aureus* a 10°C



Gráfica 2. Crecimiento de *S. aureus* a 30°C

Estos resultados coinciden en gran parte con los resultados de Maldonado y Manca. 2007, investigadores del Laboratorio de Bioquímica de Alimentos del Instituto de Química y Tecnología, de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua, Venezuela. Estos realizaron un estudio llamado Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano, donde llegaron a la conclusión de que el uso de la nisina en el queso experimental, inhibió el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*, en el queso que fue conservado a 10°C durante siete días, y hubo una significativa reducción de 1.21 unidades logarítmicas el primer día de almacenamiento en este tipo de quesos. También se pudo apreciar, que el contaje de bacteria durante los tres tiempos de almacenamiento estudiados están por debajo del límite detectable de microorganismo (<1.30 Log (UFC/g), indicando que la nisina fue efectiva en la inhibición del crecimiento de la bacteria *S. aureus* en el queso de mano almacenado por siete días a la temperatura promedio de 10°C.

Por otra parte, otro estudio realizado en Venezuela en el año 2007 realizado por Márqueza y García Rojas revela que los resultados encontrados en la investigación llamada Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo “telita” elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela, confirman el efecto inhibitorio de la nisina sobre el crecimiento del *S. aureus*, estudiando el efecto inhibitorio de la adición de nisina (16,7 y 10,0 mg/kg) en queso blanco tipo “telita” sobre la supervivencia de *S. aureus*, encontraron que ambas concentraciones de nisina utilizadas mostraron un efecto bacteriostático sobre el *S. aureus* a las 2 semanas de almacenamiento a 8 ± 2 °C, concluyendo que este efecto fue dependiente de la concentración de nisina adicionada al producto y de la población inicial de *S. aureus* presente en el queso “telita”. La reducción en los niveles de *S. aureus* en las muestras de queso telita con 10,0 y 16,7 mg nisina/kg parece estar relacionada con la fuerte actividad antiestafilocócica, ejercida por la nisina cuando se usa a niveles de 3,75-12,50 mg/kg (150- 500 UI/g) en el producto terminado, como ha sido reportado por varios autores. Es evidente, así, demostrar que la acción de la nisina en los quesos conservados a 10 °C, es más eficaz que en los quesos almacenados a 30°C. En el cuadro 7 se observa el análisis de varianza y se concluye que la interacción *temperatura x concentración* es significativa ($P=0.004215$) y además los efectos principales temperatura, concentración y horas son altamente significativos respectivamente. Ahora bien, como la interacción principal temperatura x horas x concentración no es significativa el crecimiento de *S. aureus* en el queso costeño elaborado con diferentes concentraciones de nisina no depende de las horas de incubación.

Cuadro 7. Análisis de varianza Usual en R

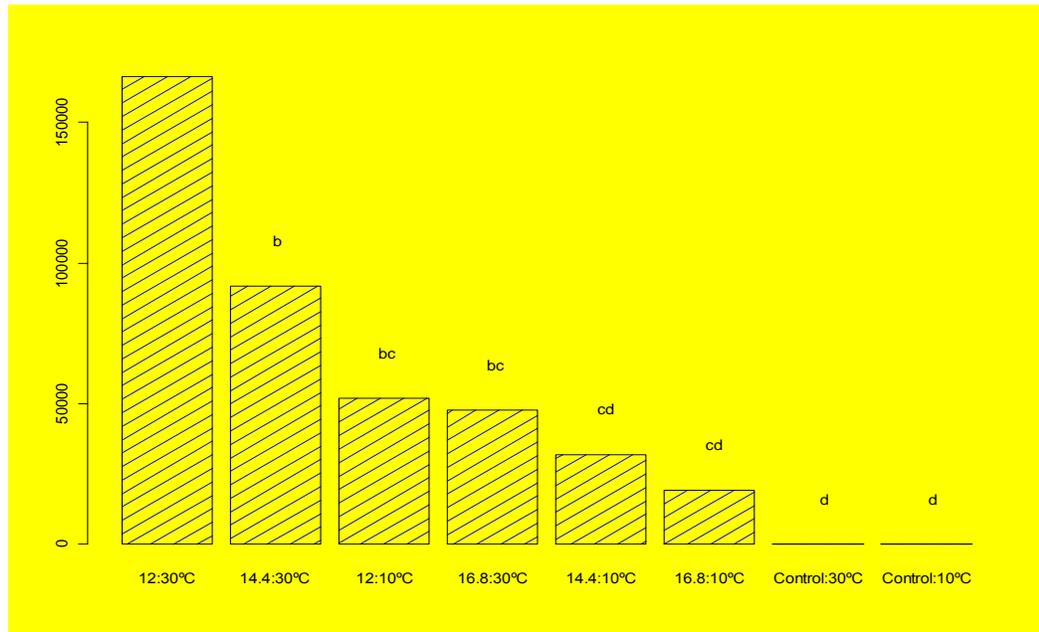
Variable dependiente: Supervivencia de <i>Staphylococcus aureus</i>					
Fuente de variación	SC	GL	CM	F	P
Temperatura	6.154E10	1	6.154E10	20.731	2.426e-05***
Horas	3.129E10	3	1.043E10	3.513	0.020062*
Concentración	1.536E11	3	5.121E10	17.251	2.559e-08***
Temperatura * Horas	1.789E9	3	5.964E8	0.2009	0.895407
Temperatura*Concentración	4.317E10	3	1.439E10	4.847	0.004215**
Horas * Concentración	1.312E10	9	1.457E9	0.4909	
Temperatura * Horas * Concentración	1.328E9	9	1.476E8	0.050	0.999977
Error	1.900E11	64	2.969E9		
Total	4.959E11	95			
R cuadrado = 0.6168 (R cuadrado corregida = 0.4312)					

En el cuadro 8 se observa el resultado de la prueba de Duncan donde se comparan los tratamientos para determinar la interacción significativa entre temperatura y concentración de nisina, a fin de evaluar cual concentración de nisina inhibe más eficazmente el crecimiento de la cepa de *S. aureus*, utilizada en este estudio.

Cuadro 8. Comparación de los tratamientos (Grupos, tratamientos y medias)

a	12 mg/Kg	30°C	166250
b	14.4 mg/Kg	30°C	91750
bc	12 mg/Kg	10°C	51941.67
bc	16.8 mg/Kg	30°C	47625
cd	14.4 mg/Kg	10°C	31931.67

cd	16.8mg/Kg	10°C	19197.83
d	control	30°C	1.541.667
d	control	10°C	1.158.333



Gráfica 3. Comparación de recuentos por tratamientos

De la prueba de Duncan, se puede concluir que la concentración mínima de nisina que inhibe el crecimiento de *S. aureus* es la concentración de 16.8 mg/Kg a una temperatura de 10°C con una media de 19197.83, el crecimiento máximo se da en una concentración de 12 mg/Kg a una temperatura de 30°C con una media de 166250. Estos mismos resultados se pueden observar con mayor claridad en la Gráfica 3.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos revelaron que la concentración de nisina requerida para reducir significativamente la carga de *S. aureus ATCC 29213* es la de 16,8 mg/Kg, concentración que está por encima de la cantidad recomendada por el Codex Alimentario, permitiendo concluir que en los quesos costeños no es factible la utilización de la concentración permitida de nisina (12 mg/Kg).

La conservación del queso costeño del estudio a temperatura de refrigeración (10°C) garantiza un menor recuento de UFC/mL de la cepa en estudio.

En el análisis de varianza se concluye que la interacción *temperatura x concentración* es significativa y además los efectos principales temperatura, concentración y horas son altamente significativos respectivamente.

En la prueba de Duncan se observa que hay diferencias significativas entre los tratamientos 12 mg de nisina por Kg de queso a 30°C y 16.8 mg de nisina por Kg de queso a 10°C.

7. RECOMENDACIONES

De acuerdo al trabajo realizado y a las conclusiones que hemos formulado, podemos realizar las siguientes recomendaciones:

Desarrollar investigaciones similares, acordes a la reglamentación sobre microbiología alimentaría en especial para productos lácteos y derivados.

Coordinar con organizaciones de Salud Pública investigaciones similares de cobertura departamental que muestren la realidad del estado de contaminación que tienen los quesos en el departamento de Córdoba y así desarrollar técnicas que contribuyan a convertir el queso costeño en un alimento más inocuo.

Coordinar entre Universidad y Saneamiento municipal, acciones educativas dirigidas a expendedores de queso para que tengan conocimiento sobre el manejo, manipulación y conservación del producto y lograr minimizar las posibilidades de contaminación.

Recordar a organismos de salud Pública el control periódico de los controles médicos a que debe someterse en expendedor y/ o manipuladores de quesos para garantizar un adecuado estado de salud en beneficio del consumidor y la comunidad en general.

BIBLIOGRAFIA

Al-Shemari H., Abou-Hamad W., Libman M. 2007. Desrosiers M. Bacteriology of the sinus cavities of asymptomatic individuals after endoscopic sinus surgery. *J Otolaryngol* 36:43-8.

Ahvenainen R. 2000. Active and intelligent packaging. En *Novel Food packaging techniques*. Editor: Ahvenainen R., Editorial CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U. p. 5-21.

A.O.A.C.1990. Official methods of analysis 15 Ed. Association of Official Analytical Chemists. Vol I y II. Arlington, U.S.A.

Belalcazar M., Poutou R., Torres K. *et al. Listeria monocytogenes* y listeriosis animal. *Rev UDCA Act Divulg Cient* 2005 8(2): 95-101.

Berrocal A., Mejía E. 2004. Evaluación higiénico sanitaria del proceso de elaboración del queso fresco en Montería, Trabajo de grado Médico Veterinario, Universidad de Córdoba: Montería, Colombia.

Bourtoom, T. 2008. Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* 15(3): 237-248.

Boyce J. 1998. Are the epidemiology and microbiology of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* changing. *JAMA* 279:623-4.

Calderón A., García F. y Martínez G. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. *Rev.MVZ Córdoba* 11(1):725-737.

Campo A. Instituto Nacional de Salud. 2008. SIVIGILA, Informe de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos, semanas epidemiológicas 1 a 40, Colombia. URL: http://web.invima.gov.co/Invima/general/docs_general/doc_informacionalimentos/informevigilancia_enfermedadalimentos_semana1a40.pdf [Accedido: 11 28 2009]

Caribbean Epidemiology Centre, CAREC. 2008. Morbidity Review of Communicable Diseases in CAREC Member Countries. URL: <http://wildlife1.wildlifeinformation.org/s/00ref/WebsitesContents/w0705.htm> [Accedido: 08 20 2009]

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 Sci.* 79 (3): 483 - 499.

Cha D. and Chinnan M. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:223-237.

Cha D., Choi J., Chinnan M. *et al.* 2002. Antimicrobial films based on Na-alginate and k-carrageenan. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol* 35:715-719.

Chen H. and Hoover D. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety* 2:82-100.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 16th informational supplement. CLSI Document M100-S16. CLSI, Wayne, Pennsylvania.

Cotter P., Hill C. and Ross R. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Rev.* 3:777-88.

Cutter C. and Siragusa G. 1997. Growth of *Brochothrix thermosphacta* in ground beef following treatments with nisin in calcium alginate gels. *Food Microbiol* 14:425-30.

Cutter C., Willett J. and Siragusa G. 2001. Improved antimicrobial activity of nisin-incorporated polymer films by formulation change and addition of food grade chelator. *Lett Appl Microbiol* 33:325-328.

Dajani A., Taubert K., Wilson W, *et al.* 1997. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the Americans Heart associations. *JAMA* 277:1797 -1801

Díaz R. 2000. Manual Práctico de Microbiología. p. 28 - 46. ED. Masson 2 edición. Barcelona.

Dolz M. 2008. Bacteriocinas de probióticos Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutr. clín. diet. hosp.* 28(3):20-37.

Dos Santos A. 2007. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria.p.98.

Delves-Broughton J. 1990. Nisin and its uses as food preservative. *Food Technol* 11:100-117.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and Application its as a Food Preservative. *J. Soc. Dairy Technology* 43(3):73-76.

Escuela de ingenieros de Antioquia (EIA). 2007. Empaques y películas biodegradables y/o comestibles para alimentos. URL:<http://materiales.eia.edu.co/ciencia%20de%20los%20materiales/articulomateriales%20biodegradables.htm> [Accedido: 08 22 2009]

Eswaranandam S. and Johnson M. 2004. Antimicrobial activity of citric, lactic, malic, or tartaric acids and nisin against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella garminara*. J Food Sci FMS 79-84.

Enan G.2006. Inhibition of *Clostridium perfringens* LMG 11264 in Meat Samples of Chicken, Turkey and Beef by the Bacteriocin Plantaricin UG1. International J Poultry Sci 5 (2): 195-200.

Eppert, I., Valdés N. and Scherer S. 1997. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. Applied and Environmental Microbiology 63:12 4812-4817.

Espinoza D.,Maniscalchi M., Hassoun M. *et al.* 2008. Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 28:48-54.

FAO/OMS. 2005. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe: "*Medidas prácticas para promover la inocuidad de los alimentos*". San José, Costa Rica. p. 1-111.

Feria P. 2007. Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín – Colombia. p. 84.

Fiorentini A., Sant'anna E., Porto A., *et al.* 2001. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* bn in the shelf-life of refrigerated bovine meat, *Brazilian J. Microbiol* 32:42-46.

Food and Drug Administration. 2003. Food and Drug Administration/AOAC BAM. URL: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-toc.htm>. [Accedido: 08 22 2009]

FOOD- INFO. 2009. URL: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. [Accedido: 08 22 2009]

Frazier W. C., Westhoff D. C. 2003. *Microbiología de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. p. 371-401.

Gallegos J., Arrieta G., Máttar S. *et al.* 2007. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Rev.MVZ Córdoba* 12(2): 996-1012.

Gálvez. A., Abriouel. H., López R. *et al.* 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *Int J Food Microbiol* 120: 51-70.

Ganzlec G., Hertela C., Vossen M. *et al.* 1999. Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine, *Int J Food Microbiol* 48: 21-35.

García, T., Martín R., Sanz, B. *et al.* 1995. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas, *Rev Española Cienc Tecnol AI* 35 (1): 1-18.

Gómez F. 2005. Efecto antimicrobiano de un extracto crudo obtenido de *Lactobacillus plantarum* evaluados en un quesito antioqueño contaminado con

Listeria monocytogenes. Tesis Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín – Colombia. p. 79.

González B., Arca P., Baltasar M. *et al.* 1994. Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin, *Appl Environ Microbiol* 60 (6):2158-2163.

Gutiérrez L., Montoya O. y Ruíz 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*. *CENIC Ciencias Biol*; (36): 1-6. Número Especial.

Haeghebaert S., Sulem P., Deroudille L. *et al.* 2003. Dos brotes de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 8 vinculados al consumo de queso Cantal elaborado con leche cruda, Francia, 2001. *Euro Surveill* 8(7):3-9.

Han J. 2000a. Antimicrobial food packaging. En *Novel Food packaging techniques*. Editor: Ahvenainen R., Editorial CRC Press, Boca Raton, Florida, E.U. p. 50-70.

Han J. 2000b. Antimicrobial food packaging. *Food Technol* 54(3):56-65.

Hoffman K., Han I. and Dawson P. 2001. Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin, lauric acid, and EDTA. *J Food Prot* 64(6):885-89.

Ihaka R. & Gentleman R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299–314.

Jay James M. 2002 Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia, D.L ,Zaragoza.

INFOSAN. Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los alimentos
Nota de Información INFOSAN/WHO/Global/Salm-Surv.

URL:

[Http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_06_GSS_Oct05_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_06_GSS_Oct05_en.pdf).

[Accedido: 10 25 2009]

Instituto geográfico Agustín Codazzi Colombia. URL:
http://www.igac.gov.co:8080/igac_web/contenidos/home.jsp. [Accedido: 10 20 2009]

Instituto Nacional de Salud. 2007. Informe epidemiológico nacional. URL:
<http://www.ins.gov.co/?idcategoria=1768>. [Accedido: 10 20 2009]

ETA-SVCSP-INS. 2008. Informe de la vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos. Estadística de las enfermedades transmitidas por alimentos a nivel global. URL:
http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g_sp.htm#8.
[Accedido: 10 20 2009]

Kalmokoff, M., Daley E., Austin J. *et al.* 1999. Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology* 50: 191-201.

Khwaldia K., Perez C., Banon S. *et al.* 2004. Milk proteins for edible films and coatings, *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:239-51.

Krochta J. and De Mulder-Johnson, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films. *Food Technol* 51(2):61-74.

Lade H., Chjtanand M., Gyananath G. *et al.* 2006. Studies On Some Properties of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus* Species Isolated From Agro-Based Waste. *J Microbiol* 2 (1):404-409.

Lungu B. and Johnson M. 2005. Potassium sorbate does not increase control of *Listeria monocytogenes* when added to zein coatings with nisin on the surface of full fat turkey frankfurter pieces in a model system at 4 °C. *J Food Sci* 70(2): M95-9.

ICTA y PADT- RURAL, 1994. Manual de elaboración de queso costeño amasado.

Maldonado R., Llanca L., Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Revista facultad de agronomía. (Maracay)* 33:147- 163. 2007.

Marcen J. 2000. Antimicrobianos naturales. *Medicina naturista* 2:104-108.

Márquez J., García C., 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* 2007; 27:108-111

Martínez Karen. 2006. Caracterización microbiológica del queso y valoración del estado higiénico locativo de expendios en la ciudad de Montería. Departamento de Córdoba. Colombia 2005. Tesis (Bacterióloga) Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Salud. p.45.

Matamoros P. 2007. Estafilococo coagulasa positivo en alimentos analizados en el laboratorio de salud pública de junio de 2000 a junio de 2001. Secretaria distrital de salud de Bogotá, laboratorio de salud pública, Bogotá- Colombia.

Mauriello G., Ercolini D., La Stora A. *et al.* 2004. Development of polythene films for food packaging activated with antilisterial bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J App Microbiol* 97:314-22.

McMullen, L.M. y Stiles, M.E. 1996. Potential use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in preservation of meats. *J Food Prot Supl.* 64-71.

Murillo M. 2008. Evaluación de propiedades fisicoquímicas y antimicrobianas de películas comestibles adicionadas con nisina y/o glucosa oxidasa. Tesis maestría en biotecnología

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Hong I. and Krochta J. 2006 .Oxygen Barrier Properties of Whey Protein Isolate Coatings on Polypropylene Films. *Journal of Food Science* 68: 224 – 228.

Min S., Harris LJ. and Krochta J. 2005. *Listeria monocytogenes* inhibition by whey protein films and coatings incorporating the lactoperoxidase system. *J Food Sci* 70 (7): M317-24.

Min S. and Krochta JM. 2005. Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *J Food Sci* 70(2):M87-94.

Ming X., Weber G., Ayres G. *et al.* 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J Food Sci* 62(2):413-15.

Montville T. and Chen Y. 1998. Mechanistic action of Pediocin and Nisin: recent progress and unresolved questions Appl Microbiol Biotechnol; 50: 511-519.

Muriana P. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. International Journal of Food Protection 59: 54-63.

Murray P. *et al.* 2006. Microbiología médica, 5ta edición, editorial Elsevier, España, p.323-338.

Natrajan N. and Sheldon B. 2000a. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. J Food Prot 63 (9): 1268-72.

Ogunbanwo S., Sanni A. and Onilude A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1, J Biotech 2(8): 219-227.

Oliver S., Jayarao B. and Almeida R. 2005. Foodborn pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. Foodborn Path Dis 2(2): 115-129.

OMS. Inocuidad de los alimentos. Reunión 118. Abril 27 de 2001.

Ouatara B., Simard R., Piette G. *et al.* 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. Int J Food Microbiol 62: 139-148.

Padgett T., Han I. and Dawson P. 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compound into biodegradable packaging films. J Food Prot 61(10):1330-35.

Pérez C., Regalado C., Rodríguez C. *et al.* 2006. Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. p. 193-216

Quintavalla S. and Vicini L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Sci* 62:373-380.

Quintero B., Guerrero I., Vernon E. *et al.* 2005. Incorporation of the antilisterial bacteriocin-like substance from *Pediococcus parvulus* VKMX133 into film-forming protein matrices with different hydrophobicity. *J Food Sci* 70(9):M398-403.

Ray B., Miller K. and Mahendra K. 2002. Bacteriocin of lactic acid bacteria: Current perspectives. *Indian J Microbiol* 41:1-21.

Remiger A., Eijsink V., Ehrmann M. *et al.* 1999. Purification and partial amino acid sequence of plantaricina 1.25 α and 1.25 β two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. *J Appl Microbiol* 86:1053 - 1058.

Requena T. y Pelaez C. 1995. Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas, *Rev Española Cienc Tecnol AI* 35 (1): 19-44.

Salyers A. and Whitt D. 2002. *Bacterial Patogénesis: a molecular approach*. ASM press, second edition, Washinton. p. 681-695.

Suárez, M, *et al.* 2008. Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 sobre la vida útil de filetes del híbrido de cachama *Piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. *VITAE* 15 (1): 34-39.

Scanell A., Hill C., Ross R. *et al.* 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 y Nisaplin ®. *Int J Food Microbiol* 60: 241-249.

Suppakul P, Miltz J, Sonneveld K, Bigger SW. 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J food Sci* 68(2):408-419.

Todorov S. and Dicks L. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria, *Enz Microb Tech* 36: 318-326.

Torres K., Sierra S., Poutou R. *et al.* 2004. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. *Rev UDCA Act Divulg Cient* 7(1):25-57.

Torres E. y Pacheco de D. 2007. Evaluación nutricional, física y sensorial de panes de trigo, yuca y queso llanero. *Rev Chil Nutr* 34: 133-41.

Universidad Nacional de Colombia. 2008. Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos: Principios de Elaboración de Quesos frescos, Bogotá.

Vanegas L., González L., Martínez L. *et al.* 2008. Isolation and characterization of *Staphylococcus enterotoxigenic* strains from cheese in Bogotá. *Rev.MVZ Córdoba* 13(2):1288-1293.

Vásquez M., Suárez M. y Zapata B. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por Bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición* 36 (1):64-71.

Wu Y., Rhim J., Weller C. *et al.* 2002. Development and application of multicomponent edible coatings and films: A review. *Adv Food Nutr Research* 44:347-394.

Wu Y., Rhim, J., Weller C. *et al.* 2000. Moisture loss and lipid oxidation for precooked beef patties stored in edible coating and films. *J of Food Sci* 65(2): 300-04.

Yamazaki K., Suzuki M., Kawai J. *et al.* 2005. Purification and Characterization of a Novel Class IIa Bacteriocin, Piscicocin CS526, from Surimi-Associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Appl Environ Microbiol.* 71(1): 554–557.

Yáñez E., Máttar S. y Durango A. 2008 Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. *Rev. ACIN* 12(4): 247-254.

Zhang Y. and Han J. 2006. Mechanical and Thermal Characteristics of Pea Starch Films Plasticized with Monosaccharides and Polyols. *Journal of Food Science* 71 (2): E109- E 118.

Zhao Y. 2001. Development and delivery of risk reduction strategies for New England cheese manufacturers. Durham, New Hampshire: New England Cooperative Extension Consortium. URL: <http://www.umass.edu/umext/consortium/cheese.htm>. [Accedido: 10 20 2009]

ANEXOS

**ANEXO A. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA
ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE *Staphylococcus aureus*.
Análisis: Leche cruda**

Análisis para la leche cruda	Observaciones
Acidez (ácido láctico)	
Grasa	
Densidad	
Lactosa	
Sólidos no grasos	
Proteínas	
H ₂ O adicionada	
Crioscopia	
Sales	

**ANEXO B. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA
ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE *Staphylococcus aureus*.**

**Observaciones: Crecimiento *S. aureus*
Concentraciones – tiempos y temperaturas**

PRIMERA REPLICA

QUESO 10°C				
	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs				
6hrs				
12hrs				
24hrs				
QUESO 30°C				
	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs				
6hrs				
12hrs				
24 hrs				

Fuente: datos investigadores

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias /g

SEGUNDA REPLICA

QUESO 10°C				
	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs				
6hrs				
12hrs				
24 hrs				
QUESO 30°C				
	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs				
6hrs				
12hrs				
24hrs				

Fuente: datos investigadores

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias /g

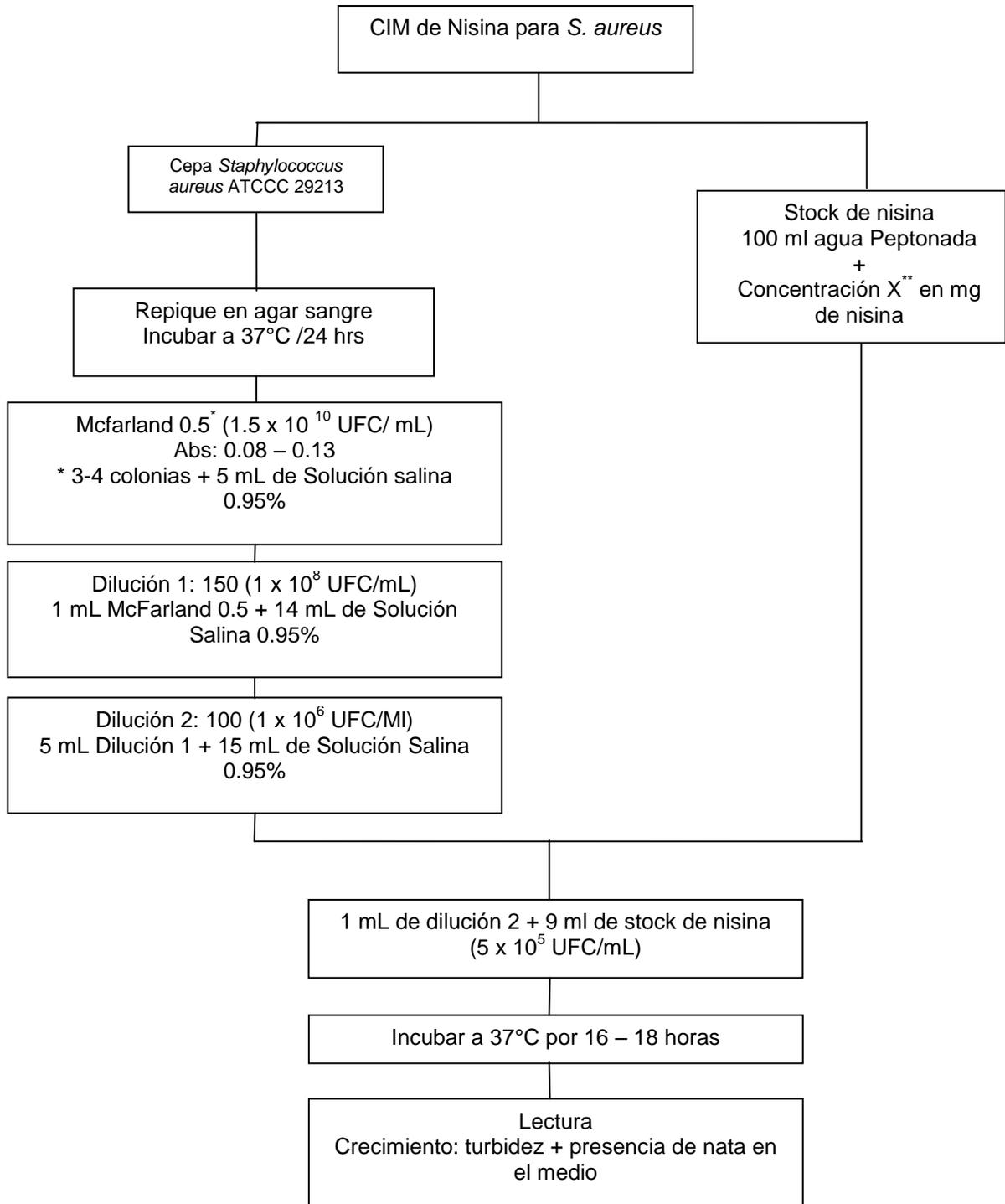
TERCERA REPLICA

QUESO 10°C				
	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs				
6hrs				
12hrs				
24hrs				
QUESO 30°C				
	12 mg/Kg	14.4 mg/Kg	16.8 mg/Kg	QUESO CONTROL
0 hrs				
6hrs				
12hrs				
24hrs				

Fuente: datos investigadores

*U.F.C. Unidades Formadoras de Colonias /g

ANEXO C. Determinación de las tres concentraciones mínimas de nisina que inhiban el crecimiento de *S. aureus*.



** Las concentraciones de nisina utilizadas serán distribuidas de la siguiente manera:

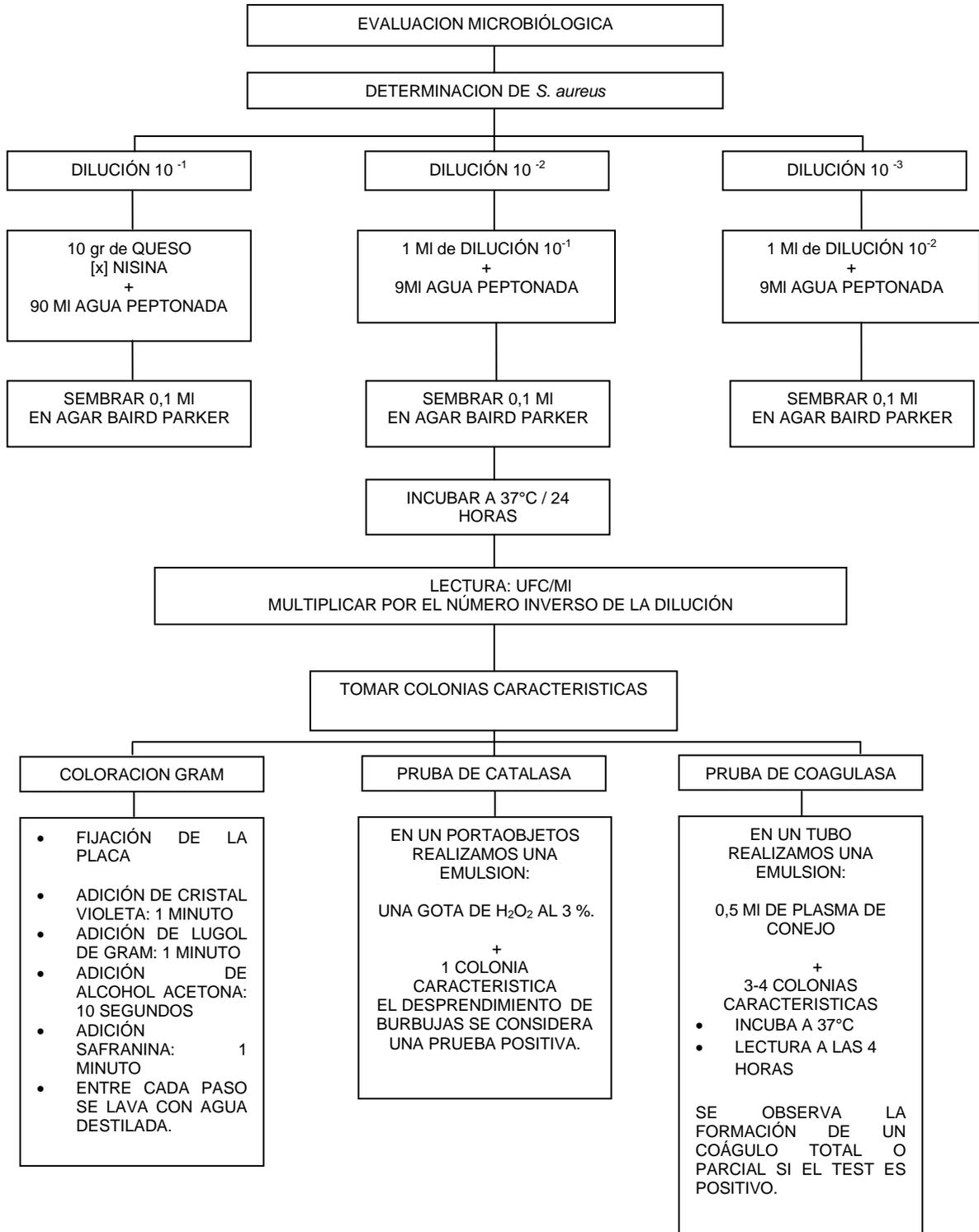
Concentración de nisina	Equivalencia en miligramos
300 UI	7.2
400 UI	9.6
500 UI	12
600 UI	14.4
700 UI	16.8

ANEXO D. DETERMINACION DEL EFECTO DE UNA BACTERIOCINA ADICIONADA EN QUESO COSTEÑO SOBRE *Staphylococcus aureus*.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

CONCENTRACION		CRECIMIENTO	
		SI	NO
700 UI	16,8 Mg/Kg		
600 UI	14, 4 Mg/Kg		
500 UI	12 Mg/Kg		
400 UI	9,6 Mg/Kg		
300 UI	7,2 Mg/Kg		
CONTROL DEL MEDIO			
CONTROL DEL M.O.			

ANEXO E. Determinación de la supervivencia y el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en el queso costeño elaborado con diferentes concentraciones de nisina.



Este procedimiento se realizó para cada uno de los quesos preparados con las tres concentraciones de nisina y las dos temperaturas de conservación.