



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EVALUACIÓN DE UNA PELÍCULA ACTIVA  
PARA LA CONSERVACIÓN DE CARNE.**

*TESIS*

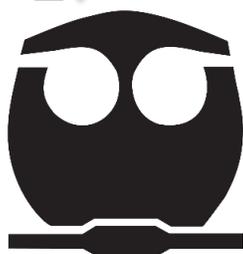
**PRESENTA:**

**YAQUELIN CASTRO HERNÁNDEZ**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**Director de Tesis**

**Dra Maricarmen Quirasco Baruch**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: PROFESORA: GABRIELA ALATORRE GARCÍA**

**VOCAL: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH**

**SECRETARIO: ALEIDA MINA CETINA**

**1er. SUPLENTE: ELSI IDELI JUAREZ ARROYO**

**2° SUPLENTE: ROEB GARCIA ARRAZOLA**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO 312. CONJUNTO E. FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

SE AGRADECE EL FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO POR EL PROGRAMA DGAPA PAPIIT IN 222717: ESTUDIO Y APLICACIONES DE LAS PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS OBTENIDAS DEL METAGENOMA Y BACTERIAS DE QUESOS TRADICIONALES MEXICANOS, JUNTO CON EL PROYECTO PAIP-FQ CON LA CLAVE 5000-9102

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. C. Cindy Adriana Estrada Hernández

### **SUSTENTANTE (S):**

Yaquelin Castro Hernández

1. Resumen.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1 Carne.....	2
2.1.1 Producción Pecuaria Nacional.....	3
2.1.2 Comercialización de la carne de res.....	4
2.2 Microbiota presente en la carne.....	6
2.2.1 Microorganismos de importancia microbiológica en carne.....	7
2.2.1.1 Microorganismos indicadores.....	7
2.2.1.1.1 Microorganismos indicadores de calidad.....	7
2.2.1.1.1.1 Mesófilos aerobios.....	8
2.2.1.1.2 Microorganismos indicadores de inocuidad.....	8
2.2.1.1.2.1 Coliformes totales y fecales.....	8
2.3 Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA).....	9
2.4. Microorganismos asociados a ETAs por el consumo de carne.....	10
2.4.1 <i>Salmonella enterica</i> .....	10
2.4.2 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	11
2.4.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	11
2.4.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
2.4.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
2.5 Métodos para la conservación de carne.....	14
2.6 Envase.....	15
2.6.1 Envases activos o funcionales.....	15
2.6.1.1 Películas biodegradables activas.....	15
2.7 Compuestos antibacterianos de naturaleza proteínica.....	16
2.7.1 Bacteriocinas.....	17
2.7.1.1 Enterocina AS-48.....	18
2.7.2 Peptidoglicano hidrolasas.....	18
3. Antecedentes en el grupo de trabajo.....	19
4. Justificación.....	21
5. Hipótesis.....	21
6. Objetivos.....	21
6.1 Objetivo general.....	21
6.2 Objetivos particulares.....	21
7. Metodología experimental.....	22
7.1 Reactivación de la cepa de <i>E. faecalis</i> FAIR E-77.....	23
7.2 Fermentación.....	23
7.3 Obtención de la preparación extracelular (PE).....	23
7.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de la PE.....	23
7.5 Determinación de proteína por el método de Bradford.....	24
7.6 Elaboración de la Película antibacteriana (PA).....	24

7.7 Evaluación de la película vs microbiota presente de manera inicial.....	27
en la carne.	
7.8 Estandarización de las UFC para inocular a la carne con los.....	27
microorganismos de importancia en la inocuidad de alimentos.	
7.9 Evaluación de la PA contra microorganismos patógenos inoculados.....	27
intencionalmente.	
8. Resultados y discusión .....	29
8.1 Verificación de la actividad antibacteriana del preparado extracelular....	29
(PE) contra los microorganismos de interés en la inocuidad de la carne.	
8.2 Evaluación de la Película Activa (PA) vs mesófilos aerobios.....	31
coliformes totales y fecales.	
8.2.1 Aplicación de los distintos recubrimientos sobre la carne de res ...	34
8.3 Inoculación intencional de microorganismos en carne de res.....	39
8.3.1 Evaluación de la PA contra <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
8.3.1.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra <i>L. ....</i>	39
<i>monocytogenes</i>	
8.3.2 Evaluación de la PA contra <i>S. aureus</i> .....	41
8.3.2.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra <i>S. aureus</i> ..	41
8.3.3 Evaluación de la PA contra <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	44
8.3.3.1 Elaboración de la PA para su evaluación.....	44
contra <i>Y. enterocolitica</i>	
8.3.4 Evaluación de la PA contra <i>Salmonella entérica</i> .....	47
8.3.4.1 Elaboración de la PA para su utilización contra <i>S. enterica</i> ..	47
8.3.5 Evaluación de la PA contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	49
8.3.5.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra.....	49
<i>P. aeruginosa</i> .	
8.4 Resumen del conteo en placa de cada microorganismo evaluado.....	51
9. Aspectos económicos en la producción de la biopelícula activa.....	54
10. Conclusiones.....	56
11. Perspectivas.....	56
12. Bibliografía.....	57
ANEXO I. Cinéticas de Crecimiento de microorganismos de interés.....	65
en la inocuidad alimentaria de Alimentos evaluadas contra el Preparado	
Extracelular (PE).	
ANEXO II. Análisis de Varianza y Diferencia Mínima Significativa (DMS).....	68
de la cuenta en placa de los distintos microorganismos evaluados.	

## Índice de Tablas.

<b>Tabla 1.</b> Composición química típica (% peso/volumen) de la carne roja magra después de la rigidez cadavérica.	2
<b>Tabla 2.</b> Inhibición antibacteriana debajo del área de la película con respecto al tiempo de almacenamiento de la película.	20
<b>Tabla 3.</b> Resumen de las cinéticas de crecimiento de cada microorganismo patógeno	30
<b>Tabla 4.</b> Cantidad de proteína utilizada en la PA contra la microbiota presente de manera inicial en la carne.	31
<b>Tabla 5.</b> Cuenta inicial de mesófilos aerobios presentes en la carne de manera inicial	31
<b>Tabla 6.</b> Cuenta inicial de coliformes totales y <i>E. coli</i> presentes en la carne	32
<b>Tabla 7.</b> Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la cuenta de mesófilos aerobios presentes en la carne después de 6 días de refrigeración.	34
<b>Tabla 8.</b> Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la cuenta de coliformes totales en carne de res.	36
<b>Tabla 9.</b> Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la cuenta de <i>E. coli</i> en carne de res.	37
<b>Tabla 10.</b> Cantidad de proteína utilizada en la PA contra <i>L. monocytogenes</i> .	39
<b>Tabla 11.</b> Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos en carne inoculada intencionalmente con <i>L. monocytogenes</i>	40
<b>Tabla 12.</b> Cantidad de proteína utilizada en la PA contra <i>S. aureus</i> .	41
<b>Tabla 13.</b> Análisis microbiológico de la carne antes de inocular con <i>S. aureus</i> para cuantificar la presencia de este microorganismo.	42
<b>Tabla 14.</b> Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la cuenta de <i>S. aureus</i> inoculado intencionalmente en carne de res.	44
<b>Tabla 15.</b> Cantidad de proteína utilizada en la PA contra <i>Y. enterocolitica</i> .	44
<b>Tabla 16.</b> Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre <i>Y. enterocolitica</i> inoculada intencionalmente en carne de res.	45

<b>Tabla 17.</b> Cantidad de proteína utilizada en la PA contra <i>S. entérica</i> .....	47
en carne intencionalmente inoculada.	
<b>Tabla 18.</b> Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre .....	48
<i>S. entérica</i> inoculada intencionalmente en carne.	
<b>Tabla 19.</b> Cantidad de proteína utilizada en la PA contra <i>P. aeruginosa</i> .....	50
<b>Tabla 20.</b> Efecto de la aplicación de los tratamientos sobre <i>P. aeruginosa</i> .....	51
en carne inoculada intencionalmente.	
<b>Tabla 21.</b> Resumen de la aplicación de los tratamientos sobre la microbiota.....	52
presente de manera inicial en la carne.	
<b>Tabla 22.</b> Resumen de la aplicación de los tratamientos en cada .....	53
microorganismo evaluado.	
<b>Tabla 23.</b> Materias primas y costo para la realización de la biopelícula activa.....	55
<b>Tabla 24.</b> Análisis de Varianza para mesófilos aerobios.....	68
<b>Tabla 25.</b> DMS para mesófilos aerobios.....	69
<b>Tabla 26.</b> Análisis de Varianza para coliformes totales.....	69
<b>Tabla 27.</b> DMS para coliformes totales.....	70
<b>Tabla 28.</b> Análisis de Varianza para coliformes fecales.....	70
<b>Tabla 29.</b> DMS para coliformes fecales. ....	71
<b>Tabla 30.</b> Análisis de Varianza para <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	71
<b>Tabla 31.</b> DMS para <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	72
<b>Tabla 32.</b> Análisis de Varianza para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	73
<b>Tabla 33.</b> DMS para <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	73
<b>Tabla 34.</b> Análisis de Varianza para <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	74
<b>Tabla 35.</b> DMS para <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	75
<b>Tabla 36.</b> Análisis de Varianza para <i>Salmonella entérica</i> .....	76
<b>Tabla 37.</b> DMS para <i>Salmonella enterica</i> .....	76
<b>Tabla 38.</b> Análisis de Varianza para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	77
<b>Tabla 39.</b> DMS para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	77

## Índice de Figuras.

<b>Figura 1.</b> Producción y Consumo aparente nacional de productos cárnicos.....	3
<b>Figura 2.</b> Volumen de la producción nacional de carne de bovino del 2012..... a 2017	4
<b>Figura 3.</b> Participación del gasto en carne de res por tipo de corte.....	5
<b>Figura 4.</b> Preferencia del lugar de compra de carne de res.....	6
<b>Figura 5.</b> Estructura propuesta para la enterocina AS-48.....	18
<b>Figura 6.</b> Sustrato específico de las PGHs.....	19
<b>Figura 7.</b> Diagrama experimental del trabajo desarrollado.....	22
<b>Figura 8.</b> Placa Petrifilm™ para el Recuento de <i>E. coli</i> /Coliformes.....	33
<b>Figura 9.</b> Colonias de <i>L. monocytogenes</i> en medio PALCAM.....	40
<b>Figura 10.</b> Disco Staph Express en Placa Petrifilm™ Staph Express.....	42
<b>Figura 11.</b> Colonias de <i>Yersinia enterocolitica</i> en medio Yersinia.....	45
<b>Figura 12.</b> <i>S. enterica</i> en agar chrom ID Salmonella Elite.....	48
<b>Figura 13.</b> <i>P. aeruginosa</i> en medio Cetrimide, expuesto a luz ultravioleta.....	50
<b>Figura 14.</b> SDS-PAGE, carril 1, marcador de peso molecular, carril 2 perfil proteínico del PE, tinción con azul de Coomasie.....	54
<b>Figura 15.</b> Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> contra el PE.....	65
<b>Figura 16.</b> Cinética de crecimiento de <i>S. aureus</i> contra el PE.....	65
<b>Figura 17.</b> Cinética de crecimiento de <i>Y. enterocolitica</i> contra el PE.....	66
<b>Figura 18.</b> Cinética de crecimiento de <i>S. enterica</i> contra el PE.....	66
<b>Figura 19.</b> Cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> contra el PE.....	67

## 1. Resumen.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen la capacidad de producir compuestos aroma y sabor, exopolisacáridos, enzimas de importancia en procesos alimentarios (peptidasas, lipasas), y agentes antibacterianos tales como ácidos orgánicos, etanol, bacteriocinas y peptidoglicano hidrolasas (PGHs). Actualmente se han desarrollado películas y recubrimientos a base de diversas matrices biodegradables tales como polisacáridos y proteínas, en donde los compuestos antibacterianos, anteriormente mencionados, se atrapan en la matriz biodegradable de tal forma que conservan su actividad antibacteriana. Con lo anterior, se abre paso a la investigación y desarrollo de envases funcionales o inteligentes, en donde además de proteger al producto, podrían ayudar a mantener la calidad microbiológica del alimento, adicionalmente contribuirían en la disminución de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), a causa del algún microorganismo patógeno.

En este trabajo se utilizó a la BAL *Enterococcus faecalis* FAIR E-77, ya que presenta importante actividad antilisterial debido a la producción de la enterocina AS-48, además de la producción de PGHs. La actividad antibacteriana, en la fracción extracelular, se inmovilizó en una película biodegradable a base de almidón, la cual se diseñó para su aplicación como parte de un envase primario para carne de res. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad antimicrobiana de la biopelícula contra el desarrollo de microorganismos indicadores de contaminación en la carne de res y contra microorganismos patógenos de importancia en la inocuidad de este producto inoculados intencionalmente. Con respecto a un tratamiento en donde no se utilizó ningún recubrimiento en la carne (N), la película activa (PA) redujo de manera significativa ( $\alpha=0.05$ ) los valores de los microorganismos indicadores después de 6 días a 4 °C. En la evaluación de PA contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, y *Yersinia enterocolitica* inoculados intencionalmente la presencia de PA logró reducir significativamente ( $\alpha=0.05$ ) la cantidad de los últimos tres microorganismos evaluados con respecto a N. De

acuerdo con los resultados obtenidos, PA ejerció la capacidad antibacteriana necesaria contra el desarrollo de diferentes microorganismos de importancia en la inocuidad de alimentos, ofreciendo así una alternativa funcional a los empaques primarios convencionales utilizados en la distribución de este producto.

## 2. Marco teórico.

### 2.1 Carne.

La carne fresca se define como la estructura muscular estriada esquelética, acompañada o no de tejido conectivo, hueso y grasa, además de fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos; proveniente de animales para abasto, que no ha sido sometida a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características sensoriales y fisicoquímicas; se incluyen las refrigeradas o congeladas (NOM- 194-SSA1-2004).

La carne fresca es altamente perecedera y está sujeta al deterioro, principalmente microbiano, por lo que, la producción, transporte, almacenamiento y comercialización han de realizarse bajo buenas prácticas de manufactura (BPM), para garantizar la inocuidad del producto y por tanto la seguridad del consumidor (FAO, 2014).

**Tabla 1.** Composición química típica (% peso/volumen) de la carne roja magra después de la rigidez cadavérica.

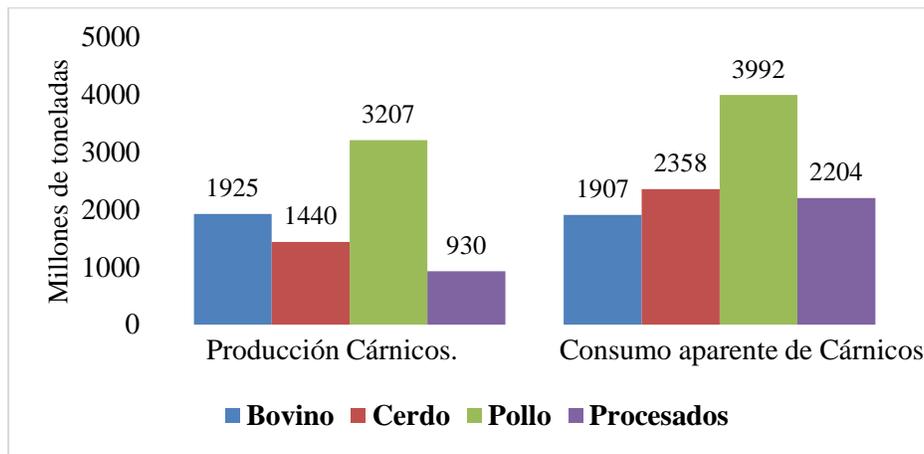
Constituyente	Peso húmedo (%)
Agua	75.0
Proteínas	20.0
Lípidos	3.0
Cenizas	1.0
L(+)-ácido láctico	0.9
Creatina	0.5
Aminoácidos libres	0.4

Anserina/Carnosina	0.3
Productos del ATP	0.3
Nucleótidos	0.3
Glucógeno	0.1
Azúcares fosfato	0.1

Tomada de Moreno, 2006; Huss. 1998.

### 2.1.1 Producción Pecuaria Nacional.

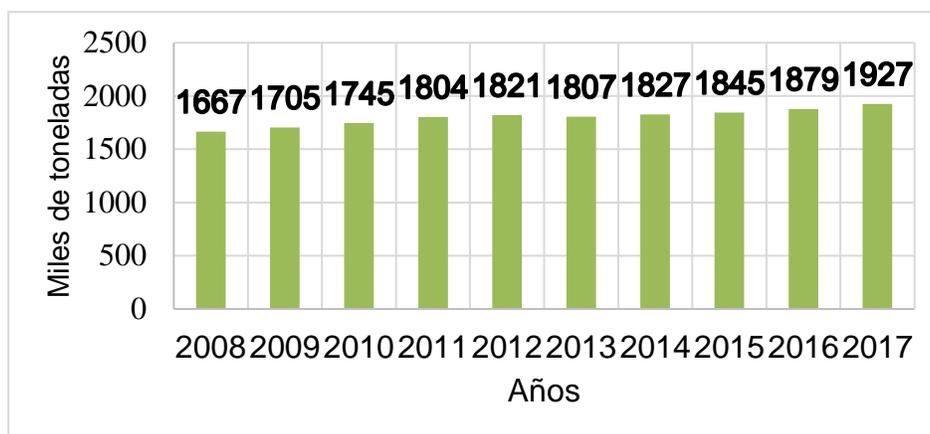
México es un importante productor de carne a nivel mundial, en el 2017 ocupó el sexto lugar en producción de carne de ave con 3, 207,686 toneladas al igual que para la carne de bovino con 1,925, 900 toneladas, mientras que para la carne de porcino ocupó el lugar quince con 1,440, 850 (SAGARPA & SIAP, 2018). La población mexicana consume en mayor cantidad la carne de ave, de ganado porcino y de ganado vacuno, como se observa en la **Figura 1**



**Figura 1.** Producción y Consumo aparente nacional de productos cárnicos. La cantidad esta expresada en millones de toneladas. Tomada de Consejo Mexicano de la Carne, 2017.

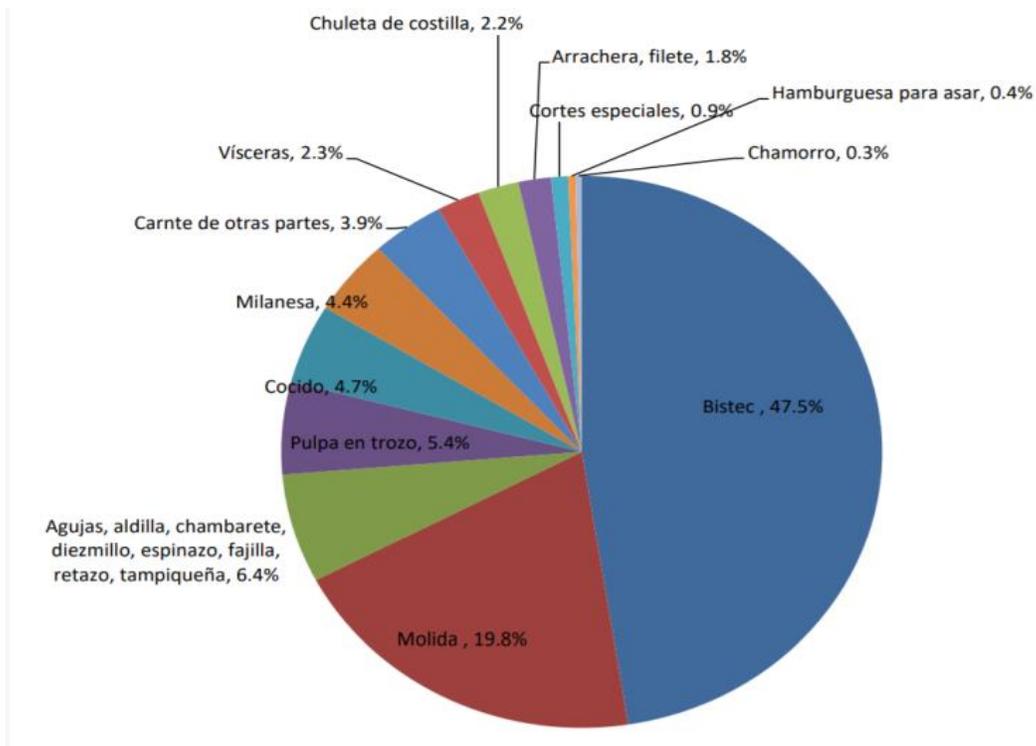
### 2.1.2 Comercialización de carne de res.

Durante la década reciente la producción nacional de carne de bovino ha presentado un continuo crecimiento, con excepción de 2013, como se muestra en la **Figura 2**. En el 2017 la producción en canal del ganado bovino rebasó las 1.19 millones de toneladas, cifra 2.6% superior a la obtenida en el 2016 (SAGARPA & SIAP, 2018; FIRA, 2017).



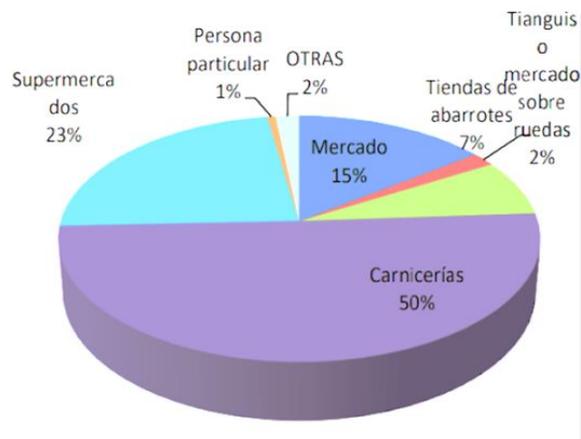
**Figura 2.** Volumen de la producción nacional de carne de bovino del 2012 a 2017, Expresado en miles de toneladas. Tomada de SAGARPA & SIAP, 2018.

En la **Figura 3** se muestra la participación del gasto en carne de res, en la cual se observa que el corte que se compra con mayor frecuencia es el bistec, puesto que, es un corte de valor inferior en comparación con otro tipo de cortes (FIRA, 2017).



**Figura 3.** Participación del gasto en carne de res por tipo de corte. Tomada de Consejo Mexicano de la Carne, 2017.

En la **Figura 4** se muestra la preferencia en el lugar de compra de carne de res, el 50% de la población adquiere la carne en carnicerías mientras que el 23% prefiere realizar la compra en supermercados. La carne que está destinada a carnicerías locales y a mercados sobre ruedas procede de rastros municipales, donde en la mayoría de los casos no se mantiene en refrigeración, por lo que la carne se transporta, corta y expende a temperatura ambiente. Mientras que la carne que se vende en cadenas de supermercados, carnicerías selectas o es de exportación, normalmente proviene de rastros que cuentan con una certificación de Tipo Inspección Federal (TIF), donde el procesamiento de la carne se realiza bajo BPM (Rubio *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Preferencia del lugar de compra de carne de res. Tomada de Consejo Mexicano de la Carne, 2017.

## 2.2 Microbiota presente en la carne.

La cantidad y tipo de microbiota inicial varía de acuerdo con los niveles de higiene, temperatura, flujo de aire, composición de la atmósfera y otros factores que influyen durante la manipulación del producto, su proceso y almacenamiento. Estos factores determinan cuáles microorganismos formarán parte de la microbiota dominante en el producto. La selección de la microbiota predominante y los cambios químicos que le ocurren también dependen de interacciones microbianas (Sofos *et al.*, 2013).

Después de la muerte del animal, la carne experimenta una serie de cambios bioquímicos que repercuten en sus características organolépticas y también en su aptitud como sustrato para el crecimiento de los microorganismos. En la primera fase (rigidez cadavérica o rigor mortis) la carne es un mal sustrato, principalmente por el descenso del pH y el potencial óxido-reducción negativo; mientras que en la segunda fase (maduración), la carne se convierte en un excelente medio para el crecimiento de los microorganismos, ya que se forman sustancias básicas, así como el ablandamiento, que trae consigo la jugosidad de los tejidos. La muerte del animal y la maduración de la canal, permiten que los microorganismos se depositen sobre las superficies expuestas del músculo y del tejido adiposo (Sofos *et al.*, 2013). En la superficie el potencial óxido-reducción positivo (+150 a +250 mV) favorecerá el crecimiento de las bacterias aerobias (Moreno, 2006).

Los tipos de microorganismos encontrados comúnmente en la carne fresca incluyen bacilos y micrococcos Gram negativo tales como *Pseudomonas* spp., enterobacterias, *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Moraxella* spp., *Flavobacterium* spp., *Aeromonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., corineformes y estreptococos fecales. En bajas cantidades se encuentran Bacterias Ácido Lácticas (BAL), *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus* y esporas de *Clostridium*, además de parásitos y virus entéricos (Sofos *et al.*, 2013)-

## **2.2.1 Microorganismos de importancia microbiológica en carne.**

### **2.2.1.1 Microorganismos indicadores.**

Los microorganismos indicadores pueden emplearse para reflejar la calidad microbiológica de los alimentos, en relación con la vida útil del producto o su inocuidad frente a patógenos transmitidos por los alimentos (Jay *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.1.1 Microorganismos indicadores de calidad.**

Los microorganismos indicadores de calidad en un alimento no representan un peligro directo para la salud, sin embargo, son grupos o tipos de microorganismos que, por su origen, procedencia, resistencia térmica, temperatura óptima para desarrollo y otras características, pueden indicar exposición, manipulación y conservación inadecuadas del producto alimenticio. Son útiles también para alertar sobre la presencia de un peligro potencial para la salud (OPS/OMS, 2015).

Deben cumplir con las siguientes características:

1. Deben estar presentes y ser detectables en todos los alimentos cuya calidad debe evaluarse.
2. Su crecimiento y cantidad debe ser inversamente proporcional con la calidad del producto.
3. Deberán detectarse, enumerarse y distinguirse claramente de otros organismos.
4. Deberían ser cuantificables en un corto tiempo, idealmente dentro de un día de trabajo.

5. Su crecimiento no debería verse afectado de forma negativa por otros componentes de la microbiota que forma parte de la matriz alimentaria.

Los indicadores de calidad microbiana son organismos de descomposición cuyo número creciente da lugar a la pérdida de calidad del producto (Jay *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.1.1.1 Mesófilos aerobios.**

Un indicador utilizado para verificar la calidad de la carne son los mesófilos aerobios, ya que una cuenta alta de estos microorganismos indicará un procesamiento no satisfactorio y malas condiciones de almacenamiento. Cabe resaltar que la mayoría de las bacterias patógenas son mesófilas (Camacho *et al.*, 2009).

#### **2.2.1.1.1.2 Indicadores de inocuidad.**

Los indicadores microbianos de inocuidad se emplean más a menudo, para evaluar la higiene de los alimentos y el saneamiento, que los de calidad.

Idealmente, un indicador de inocuidad debería cumplir los siguientes criterios:

1. Deben ser fácil y rápidamente detectables.
2. Distinguirse fácilmente de los demás miembros de la microbiota alimentaria.
3. Tener un historial de asociación constante con el patógeno.
4. Estar siempre presentes cuando el agente patógeno en cuestión esté presente
5. Ser un organismo cuyo número debería, idealmente, estar en correlación con el del agente patógeno de que se trate.
6. Poseer necesidades de crecimiento y una tasa de crecimiento igual o superior a la del agente patógeno.
7. Tener una tasa de mortalidad que al menos sea paralela a la del patógeno e idealmente persista ligeramente más tiempo que el patógeno en cuestión.
8. Estar ausentes de los alimentos que no contengan el agente patógeno, excepto, quizás, en cantidades mínimas (Jay *et al.*, 2005).

#### **2.2.1.1.2.1 Coliformes totales y fecales.**

Los coliformes son bacilos Gram negativos que fermentan la lactosa en 48 horas. En general, los coliformes están representados por cuatro o cinco géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Raoultella* y *Klebsiella* (Jay *et al.*, 2005).

Dado que *Escherichia coli* es usado con mayor frecuencia para dar indicios de contaminación fecal, a menudo es deseable determinar su incidencia en una población de coliformes. Esto se debe a que se encuentra en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, incluidos los humanos. Las otras bacterias pueden encontrarse en el suelo, donde son más resistentes que algunas bacterias patogénicas de origen intestinal (*Salmonella* y *Shigella*). Así, la presencia de coliformes totales no indica, necesariamente, contaminación fecal o la presencia de patógenos entéricos, sin embargo, la presencia de *E. coli* sí indica contaminación fecal (PAHO/WHO, 2015).

#### **2.3 Enfermedades de transmisión alimentaria (ETA).**

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) se originan por la ingestión de alimentos o agua contaminados, en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. De acuerdo con el tipo de contaminación y de la cantidad de alimento consumido, se presentarán distintas sintomatologías tales como: diarrea, dolor de cabeza, vómitos e incluso fiebres. Generalmente las ETA son de carácter infeccioso o tóxico y pueden ser causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que logran entrar al organismo (Kopper *et al.*, 2009). Cada año a nivel mundial, las ETA afectan a 1 de cada 10 personas provocando 420,000 muertes, de las cuales, un tercio son niños. Las ETA pueden ser mortales, especialmente en menores de 5 años (OMS, 2015). Los microorganismos responsables de estas enfermedades van desde: coliformes fecales, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* hasta parásitos y

protozoarios que causan amibiasis, giardiasis, triquinosis y cisticercosis (Kopper *et al.*, 2009).

## **2.4 Microorganismos asociados a ETAs por el consumo de carne.**

Dentro de los agentes biológicos causantes de ETAs por consumo de carne destacan: *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni/coli*, *Escherichia coli* enterohemorrágica y *Yersinia enterocolitica*. La carne también es vehículo de cepas de *Staphylococcus aureus* de procedencia animal, así como de *Listeria monocytogenes*, esta última no produce un cuadro gastroentérico, como los anteriores, aunque es frecuente incluirla entre los microorganismos que se asocian a las enfermedades transmitidas por este alimento (Moreno, 2006).

La contaminación del producto alimenticio puede ocurrir directamente del animal vivo infectado, ser el resultado de una higiene de baja calidad durante el procesamiento, el almacenamiento de los productos o porque los humanos sean portadores asintomáticos (Normanno, 2007).

### **2.4.1 *Salmonella enterica*.**

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativo, flagelado, no esporulada, anaerobia facultativa. *Salmonella* es encontrada naturalmente en el medio ambiente, tanto en animales domésticos, como salvajes (gatos, perros, anfibios, reptiles, aves y roedores) (Li *et al.*, 2013). Esta bacteria es causante de salmonelosis, gastroenteritis y otras enfermedades. El tipo de infección varía dependiendo de los factores de virulencia y la capacidad de resistencia del hospedero. Los signos y síntomas podrían desarrollarse en forma de náuseas, vómitos y de diarrea a septicemia o bacteriemia. La salmonelosis es una de las ETA más comunes en todo el mundo, con alrededor de 93.8 millones de casos y 155,000 muertes, por año. Los datos a partir de 2000 hasta 2008 dan un coste estimado medio en la asistencia médica de esta ETA de 55.5 a 93.2 mil millones de dólares, en los Estados Unidos. El panorama frente a esta bacteria es incierto debido a la aparición de serotipos de *Salmonella* multirresistente a fármacos. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium es el serotipo dominante en el

mundo, y es asociado con brotes de ETA tanto en países en vías de desarrollo, como en países desarrollados. Diversos brotes de salmonelosis causados por *S enterica* han sido vinculados a las aves de corral, huevo, productos lácteos, la carne poco cocida, molida y sus derivados (Heredia & García, 2018).

#### **2.4.2 *Yersinia enterocolitica*.**

El género *Yersinia* forma parte de la familia *Enterobacteriaceae* y comprende 13 especies donde se incluyen tres especies patógenas en mamíferos. *Yersinia* es un bacilo Gram negativo, oxidasa-negativo, no esporulado, anaerobio facultativo y fermentador de glucosa. Dentro de las especies que son patógenas en mamíferos solo *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* ocasionan enfermedades de transmisión alimentaria (Robins, 2013).

*Yersinia enterocolitica* es un patógeno psicrófilo que causa gastroenteritis aguda y en ocasiones, otras enfermedades más serias en humanos, dependiendo de la edad de la persona infectada. En algunos países *Y. enterocolitica* rivaliza con *Salmonella* en frecuencia como causante de ETA. Esto se debe a que puede crecer a temperatura de refrigeración, lo cual genera una preocupación creciente en términos de inocuidad alimentaria. La infección con este patógeno es más recurrente en niños menores de 5 años (Latiful *et al.*, 2013).

#### **2.4.3 *Listeria monocytogenes*.**

El género *Listeria* se clasifica en 17 especies, de las cuales solo dos son consideradas como patógenas en humanos y animales: *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* (Heredia & García, 2018; Guillet *et al.*, 2010).

*L. monocytogenes* es la especie más importante y representativa de este género. Es un bacilo pequeño, Gram positivo, anaerobio facultativo, flagelado e invasivo, que puede crecer a altas concentraciones de sales, un amplio intervalo de temperatura (-0.4°C a 45°C), pH que va de entre 4 y 9.6, y una actividad de agua de  $\geq 0.92$ , además de la capacidad que posee para adherirse a las superficies (Kurpas *et al.*, 2018).

Los brotes de ETA que causa esta bacteria son esporádicos, sin embargo, la tasa de mortalidad de esta enfermedad alcanza un 20-30% de los casos, la cual es alta, en comparación con los otros microorganismos mencionados. La tasa de mortalidad genera un impacto considerable para la sociedad y la industria de alimentos (Heredia & García, 2018; Ryser & Buchanan, 2013).

La enfermedad causada por *Listeria monocytogenes* ocurre predominantemente en grupos bien definidos de alto riesgo, tales como mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos inmunocomprometidos y adultos mayores. La enfermedad causa principalmente septicemia, meningitis, y meningoencefalitis y en mujeres embarazadas el aborto (Kurpas *et al.*, 2018).

*L. monocytogenes* se encuentra extensamente presente en las plantas, suelo y muestras superficiales de agua, también ha sido encontrado en ensilados, aguas residuales, desechos de mataderos, leche de vacas sanas, vacas con mastitis, y en el excremento de humanos y de animales. Es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza y debido a su capacidad de crecimiento es difícil erradicarlo de los alimentos (Heredia & García, 2018).

#### **2.4.4 *Staphylococcus aureus*.**

El término "staphylococci" se refiere a un grupo de bacterias en forma de cocos agrupados en forma de racimos, Gram positivas, de aproximadamente 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. La intoxicación por *S. aureus* se encuentra entre las causas más frecuentes de gastroenteritis en el mundo. Esta enfermedad se debe a la ingestión de una o más toxinas formadas por la bacteria en el alimento contaminado (Seo & Bohach, 2013); una de las toxinas que comúnmente ha estado implicada en los brotes de intoxicación alimentaria es la enterotoxina A, ya que con solo 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación (Zendejas *et al.*, 2014). Los síntomas más comunes para esta intoxicación son náuseas, vómito, cólicos abdominales y postración (Raftari *et al.*, 2009).

Los animales que se utilizan como alimento son reservorio de esta bacteria, y se localiza principalmente en piel y mucosas (Normanno, *et al.*, 2007) además en el

ganado lechero, *S. aureus* ha asociado con la mastitis subclínica, puede contaminar la leche y otros productos lácteos (Fagundes, *et al.*, 2010)

Los estafilococos representan el 14% estimado del total de brotes de ETA en los Estados Unidos. En un estudio dirigido por el Servicio de Investigación Económica del Departamento de Agricultura de ese país se reportaron aproximadamente 1.5 millones de casos de esta enfermedad en un solo año, causando 1,210 muertes y costando 1.2 mil millones de dólares (Seo & Bohach, 2013). En México, la incidencia de infecciones ocasionadas por *S. aureus* es desconocida, ya que no existe un registro referente al número de casos asociados que atenten contra la vida del paciente (Zendejas *et al.*, 2014).

*Staphylococcus aureus* puede usarse como microorganismo indicador de inocuidad puesto que un alto conteo de esa bacteria indica un peligro potencial, debido a la producción de toxinas, sin embargo, no todas las cepas *S.aureus* son capaces de producir toxina. Este microorganismo es un indicador de manipulación inadecuada, pues su fuente principal es la superficie corporal del hombre (PAHO & WHO, 2015). En un análisis microbiológico para reportar la presencia de este microorganismo se deben realizar pruebas posteriores al conteo en placa, tales como la producción de enzimas como termonucleasa y coagulasa, las cuales se explican a detalle en la NOM-115-SSA1-1994.

#### **2.4.5 *Pseudomonas aeruginosa*.**

*Pseudomonas* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. *P. aeruginosa* es altamente proteolítico y lipolítico, esto provoca cambios biológicos indeseables en la composición de la carne y sus productos, por esta razón *P. aeruginosa* puede usarse como indicador de calidad en la conservación de carne ya que, al ser psicrófilo, tiene una gran prevalencia en alimentos proteínicos almacenados aeróbicamente a temperaturas frías (Gram *et al.*, 2002; Amal *et al.*, 2014).

Estos microorganismos habitan ampliamente la naturaleza, encontrándose en el suelo, el agua, las plantas y los animales (incluyendo humanos). *P. aeruginosa* se

ha convertido en una causa importante de enfermedades, especialmente en pacientes con el sistema inmune comprometido (Amal *et al.*, 2014).

## **2.5 Métodos para la conservación de carne.**

La conservación de alimentos se puede definir como la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos, para el consumo humano y animal, protegiéndolos de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro y así permitir su consumo futuro. El objetivo principal es preservar el sabor, los nutrientes, la textura y la calidad microbiológica entre otros aspectos (Bosques & Colina, 1999).

En la actualidad los consumidores demandan productos cárnicos de alta calidad, que sean mínimamente procesados, además, requieren que sean productos inocuos y que no contengan aditivos como conservadores (Hugas *et al.*, 2002). Esto obliga a la búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos (Milena *et al.*, 2009). En este sentido, el uso de tratamientos térmicos tiene como objetivo principal la inactivación de microorganismos patógenos para proporcionar a los consumidores un producto microbiológicamente seguro. Sin embargo, a pesar de los beneficios del tratamiento térmico, regularmente el producto final sometido a estas condiciones presenta alteraciones en atributos de sabor, color, y/o textura. Por lo que el uso de tecnologías no térmicas como alternativa a la inactivación de microorganismos y la conservación de calidad organoléptica del producto es un área de investigación que ha crecido rápidamente. En productos cárnicos las más estudiadas incluyen:

- Irradiación: Se somete a la carne a radiación ionizante, esta produce radicales libres que dañan al ADN de los posibles microorganismos contaminantes.
- Altas presiones hidrostáticas: Se utiliza una presión isostática entre 100 y 600 MPa a temperatura ambiente, lo que provoca que los enlaces de hidrógeno y los enlaces hidrofóbicos sean modificados irreversiblemente.
- Adición de compuestos naturales: Las sustancias que se agregan a la matriz alimentaria pueden ser ácidos orgánicos, aceites, minerales etcétera.

- **Empaques activos o funcionales:** Las propiedades activas o funcionales pueden incluir la eliminación del oxígeno, humedad o etileno y la actividad antimicrobiana.

(Hugas *et al.*, 2002; Quintavalla & Vicini, 2002; Ahn *et al.*, 2006; Heredia *et al.*, 2014).

## **2.6 Envase.**

Se define envase primario como un recipiente que tiene contacto directo con el producto. El envase facilita el manejo, transporte, almacenaje, manipulación y distribución del producto. También el envase pretende evitar contaminaciones cruzadas desde otros alimentos, manipuladores o el ambiente (Pérez, 2012; Rodríguez *et al.*, 2014). Los envases con los que normalmente se comercializa la carne fresca están hechos de cloruro de polivinilo (película autoadherible) y poliestireno (Charola).

### **2.6.1 Envases activos o funcionales.**

Un envase activo o funcional se define como "envase que modifica las condiciones del envasado para prolongar la vida de anaquel, mejorar la seguridad y/o las propiedades sensoriales, manteniendo al mismo tiempo la calidad de los alimentos" (Quintavalla & Vicini, 2002).

La investigación sobre envases funcionales se ha centralizado en las películas activas debido a la facilidad con la que se pueden incorporar compuestos antimicrobianos a estas matrices, además estas películas se elaboran con materiales biodegradables presentando una posible alternativa al uso del plástico (Padgett *et al.*, 1998).

#### **2.6.1.1 Películas biodegradables activas.**

Las películas y recubrimientos con propiedades antimicrobianas pueden ser desarrollados para reducir, inhibir o detener el crecimiento de microorganismos en las superficies de los alimentos (Rocha *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2014)

Dado que la contaminación microbiana de estos alimentos se produce principalmente en la superficie, se han usado aerosoles antibacterianos o inmersiones. Sin embargo, la aplicación superficial directa de sustancias antibacterianas tiene beneficios limitados, ya que las sustancias activas se neutralizan al contacto o se difunden rápidamente de la superficie a la masa del alimento. Por lo tanto, el uso de películas que contengan al agente antimicrobiano inmovilizado podría ser más eficaz, debido a que la migración del agente desde el material de envase a la superficie del producto es lenta, lo que ayuda a mantener altas concentraciones donde se necesita. Si un antimicrobiano puede liberarse del envase durante un período prolongado, la actividad también puede extenderse a la fase de transporte y almacenamiento de la distribución de alimentos (Quintavalla & Vicini, 2002).

Las diversas matrices que han utilizado para incorporar distintos agentes antimicrobianos son proteínas, lípidos y polisacáridos tales como: caseína, colágeno, almidón de maíz, gelatina, proteína de soya y gluten de trigo (Padgett *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2013). Los antimicrobianos más frecuentes incorporados en las películas son ácidos orgánicos (ácido sórbico, benzoico, cítrico y propiónico), enzimas (lisozima), bacteriocinas (nisina), polisacáridos (quitosano) y aceites esenciales (bergamota, canela, citronela, clavo, jengibre, orégano, pimiento y el romero) (Rocha *et al.*, 2013).

## **2.7 Compuestos antibacterianos de naturaleza proteínica.**

Las bacteriocinas de las BAL son péptidos producidos por bacterias que inhiben o matan a otros microorganismos, mientras que las PGHs son enzimas capaces de degradar el peptidoglucano presente en la pared celular de las bacterias, ejemplo de estos son la nisina y la lisozima, respectivamente, estos dos son los compuestos de este tipo más utilizados en la conservación de alimentos. En contraste con otros antimicrobianos, las bacteriocinas son termoestables, activas en un amplio intervalo de pH y siguen siendo efectivas a concentraciones bajas, además de que la aplicación de estos péptidos no altera la calidad sensorial de los productos alimenticios, porque los péptidos presentan características incoloras,

inodoras e insípidas. De acuerdo con lo anterior, las bacteriocinas han atraído un interés considerable como conservadores naturales de los alimentos, al prolongar la vida útil y mantener la inocuidad de la carne, así como de los productos cárnicos (Sung *et al.*, 2013; Woraprayote *et al.*, 2016).

### **2.7.1 Bacteriocinas.**

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente producidos por bacterias. Los organismos productores son inmunes a sus propias bacteriocinas. De acuerdo con el organismo productor, las bacteriocinas son activas contra otras bacterias y pueden ser de espectro estrecho ya que presentan actividad dentro de la misma especie; o de espectro amplio, esto significa que presentan actividad contra distintos géneros. (Cotter *et al.*, 2005). La producción de bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de esta, guardando relación directa con la biomasa producida (Milena *et al.*, 2009).

Aunque no existe una clasificación definitiva para las bacteriocinas procedentes de bacterias Gram positivo, generalmente se dividen en:

- Clase I: Péptidos de alrededor de 19 a 38 aminoácidos que poseen residuos de lantionina. Por ejemplo: Nisina.
- Clase II: Bacteriocinas que no contienen lantonina, poseen una variedad heterogénea de péptidos pequeños.

Clase IIa: Incluye péptidos similares a la pediocina como la pediocina PA-1/Ach y la enterocina A.

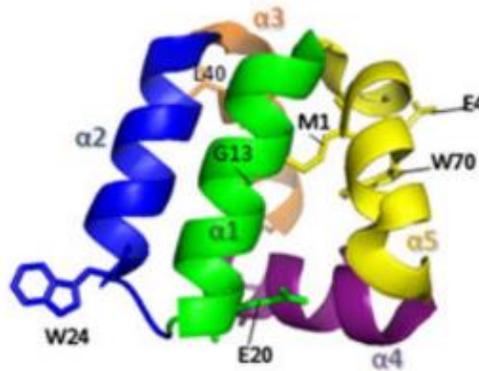
Clase IIb: De dos péptidos, por ejemplo, enterocina L50 o las plantaricinas EF y JK.

Clase IIc: Péptidos cíclicos como la enterocina AS-48.

Clase IId: Péptidos lineales simples distintos de pediocina (Cotter *et al.*, 2005; Grande *et al.*, 2014).

### 2.7.1.1 Enterocina AS-48.

La enterocina AS-48 es una bacteriocina cíclica producida por cepas de *Enterococcus faecalis* aislado de alimentos, principalmente leche y quesos madurados. Contiene una cadena de 70 residuos de aminoácidos, circularizada por un enlace peptídico. La conformación de enterocina AS-48 está organizada en cinco hélices alfa que forman una estructura globular compacta (**Figura 5**).



**Figura 5.** Estructura propuesta para la enterocina AS-48. Las cinco regiones helicoidales principales de la proteína se indican con colores diferentes (Sánchez *et al.*, 2011).

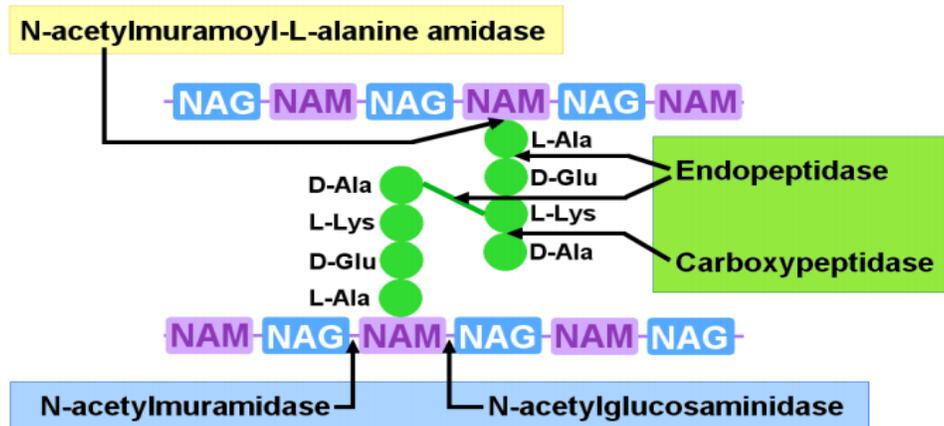
La enterocina AS-48 tiene un amplio espectro inhibitorio contra microorganismos patógenos Gram positivo y Gram negativo de importancia en alimentos tales como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Paenibacillus* spp. (Sánchez *et al.*, 2011). Este péptido catiónico se inserta en las membranas bacterianas y les hace poros, llevando finalmente a la muerte celular (Grande *et al.*, 2014).

### 2.7.2 Peptidoglicano hidrolasas.

Las enzimas que degradan el peptidoglicano que se encuentra en la pared celular reciben el nombre de peptidoglicano hidrolasas (PGHs). Los microorganismos aprovechan la actividad de las PGHs para aspectos importantes de crecimiento, división y desarrollo y algunas bacterias las secretan para eliminar a microorganismos que se encuentran como competencia en el entorno (Uehara & Bernhardt, 2011).

Las PGHs se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de enlace que hidrolizan (Figura 6):

- N-acetylmuramidases: Hidrolizan el enlace  $\beta$ -1,4 entre el N-acetylmurámico y la N-acetilglucosamina, dejando como producto terminal un extremo ácido de N-acetylmurámico, ejemplo de estas enzimas es la lisozima.
- N-acetilglucosaminidasas: Hidrolizan el enlace  $\beta$ -1,4 entre la N-acetilglucosamina y el N-acetylmurámico, dejando como producto terminal un extremo reductor de N-acetilglucosamina.
- N-acetylmuramoyl-L-alanina: Hidrolizan el enlace entre el grupo lactil del N-acetylmurámico y el  $\alpha$ -amino del L-ala, ya que este es el primer aminoácido de cadena peptídica lateral.
- Peptidasas: Hidrolizan enlaces del peptidoglicano, dentro de esta clase se encuentran las endopeptidasas que rompen los enlaces formados por los péptidos y las carboxipeptidasas que hidrolizan el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos.



**Figura 6.** Sustrato específico de las PGHs (Malnikova, *et al.*, 2010).

### 3. Antecedentes en el grupo de trabajo.

En el grupo de trabajo se ha estudiado la producción de bacteriocinas y PGHs, se tiene un interés especial debido a su posible aplicación en la industria para mejorar la calidad microbiológica de los alimentos (De Vuyst *et al.*, 2007).

En 2019, Robles inmovilizó la actividad antibacteriana de *Enterococcus faecalis* FAIR E-77 por atrapamiento en una biopelícula, diseñada como empaque primario para carne.

Llevó a cabo la elaboración de la película antimicrobiana y evaluó la actividad cualitativamente mediante pruebas de difusión en Agar Soya Tripticasa (TSA, por sus siglas en inglés) al 0.8%. Concluyó que la aplicación de la película a base de almidón de maíz y glicerol limitaba el crecimiento total de 4 de los 5 microorganismos que probó, después de 7 días de incubación a 4°C. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Inhibición antibacteriana debajo del área de la película con respecto al tiempo de almacenamiento de la película.

Microorganismo	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
<i>S. aureus</i>	•••	•	•	•	•	•	•
<i>L. monocytogenes</i>	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••
<i>P. aeruginosa</i>	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••
<i>Y. enterocolitica</i>	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••
<i>S. enterica</i>	•••	•••	•••	•••	•••	•••	•••

Tomada de Robles, 2019.

- Inhibición completa debajo del área de la película.
- Inhibición parcial debajo del área de la película.
- Poca o nula inhibición debajo del área de la película.

Determinó que la actividad antibacteriana no sólo correspondía a la bacteriocina AS-48 que es un péptido cíclico catiónico producido por *Enterococcus faecalis* y que ha sido empleada con éxito contra diferentes patógenos en una amplia gama de productos alimenticios, sino también a PGHs, que son enzimas que degradan la capa de peptidoglucano presente en la pared celular de bacterias (Abriouel *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2011; Uehara & Bernhardt, 2011).

#### **4. Justificación.**

Una vez demostrada la actividad antimicrobiana de la película activa in vitro, se debe evaluar su eficacia en un alimento ya que, al aplicarse en una matriz compleja, la película debería de conservar sus propiedades antibacterianas. Con este desarrollo se ayudaría a mejorar la inocuidad de la carne que se comercializa en México, debido a que esta matriz, por su actividad de agua y composición química, es un excelente vehículo para el desarrollo y proliferación de microorganismos de deterioro y patógenos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria.

#### **5. Hipótesis.**

La película activa presentó actividad antibacteriana contra diversas bacterias patógenas, a nivel caja Petri, por lo que se espera que tenga actividad contra dichos patógenos al utilizarla como empaque para carne de res, además de que disminuirá la cuenta de la microbiota presente de manera inicial en la carne.

##### **6.1 Objetivo general.**

- Evaluar la efectividad antimicrobiana de la película activa como empaque primario en la carne de res.

##### **6.2 Objetivos particulares.**

- Evaluar la actividad antimicrobiana de la película activa contra la microbiota presente en la carne de manera inicial evaluada como: mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la película activa contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica* en carne inoculada intencionalmente.

## 7. Metodología experimental.

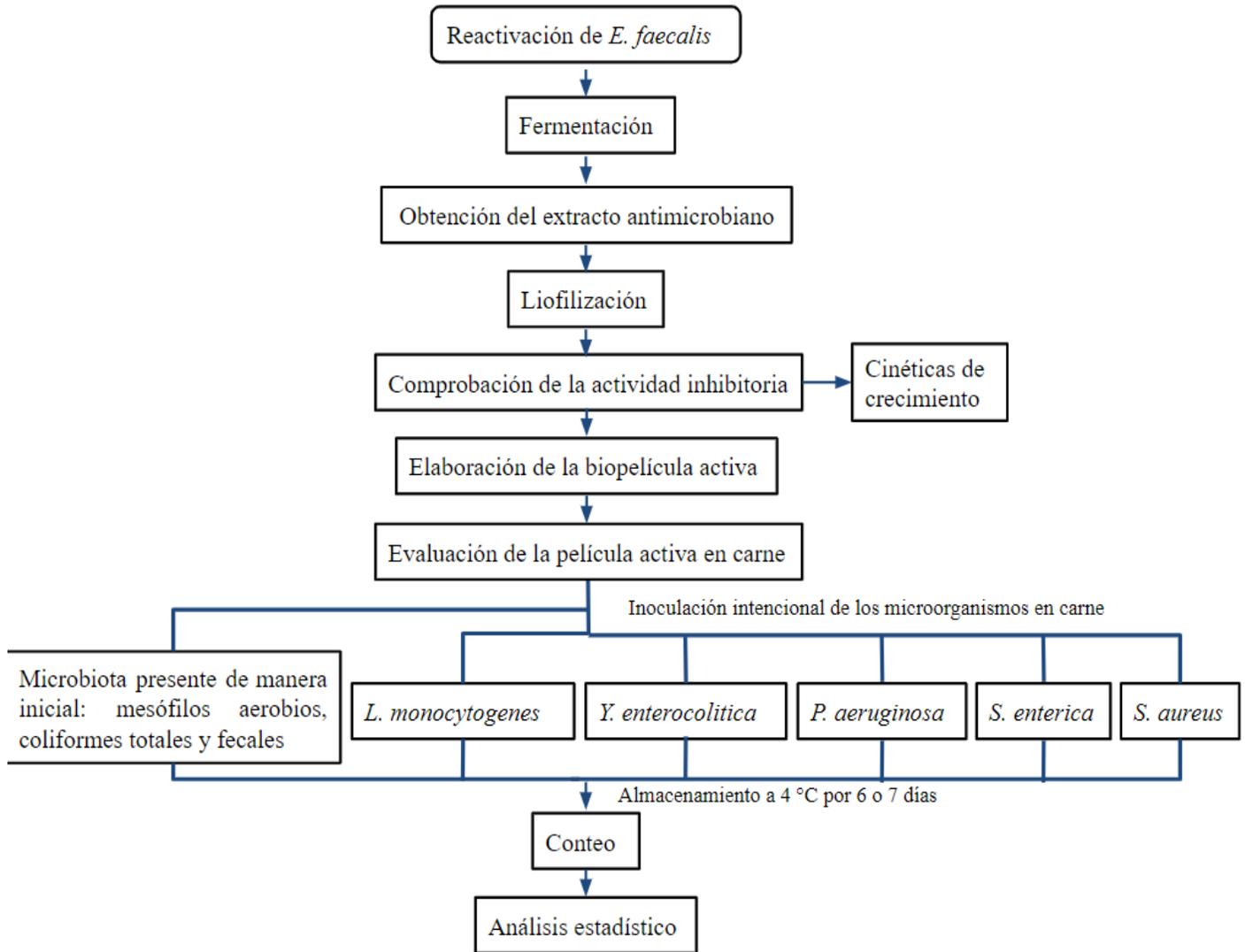


Figura 7. Diagrama experimental del trabajo desarrollado.

### **7.1 Reactivación de la cepa de *E. faecalis* FAIR E-77.**

A partir de un glicerol que contenía a la cepa se tomaron 50 µL, los cuales se inocularon en un tubo de ensayo con 10 mL de medio Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés, BD DIFCO). El tubo de ensayo se colocó en una incubadora estática (BG E 71) a 37°C por 24 h.

### **7.2 Fermentación.**

Después de las 24 h de reactivación de la cepa se tomaron 3 mL del tubo de ensayo y se inocularon en un matraz de 500 mL con 175 mL de caldo BHI para llevar a cabo una fermentación de 12 h a 37°C y 250 rpm en una incubadora con agitación (New-brunswick innova 4000).

### **7.3 Obtención de la preparación extracelular (PE).**

Posteriormente el extracto obtenido se centrifugó a 15317 *g*, por 15 minutos en una centrífuga (Beckman J2-MC). Se desecharon las células y al sobrenadante se le ajustó el pH a 7 con NaOH 6 M, con un potenciómetro Hanna H1-4211. El sobrenadante se filtró con membrana de 0.22 µm en equipo de filtración rápida al vacío de metal (Millipore). Por último, en tubos cónicos para centrifuga de 50 mL (Falcon) se colocaron 17.5 mL del preparado extracelular (PE), se congelaron a -70°C en un ultracongelador (Revco) y se liofilizaron en una liofilizadora Labconco Freezer dry.

### **7.4 Determinación de la actividad antimicrobiana de la PE.**

A partir de un glicerol que contenía la cepa de *S. aureus* o del microorganismo patógeno a evaluar se tomaron 50 µL y se inocularon en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo BHI. El tubo se colocó en una incubadora estática (BG E 71) a 37°C por 15 h. Posteriormente, se inoculó una alícuota del cultivo anterior en un matraz de 25 mL con 10 mL de caldo BHI, de tal forma que la densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) del nuevo cultivo se ajustara en 0.057 al medir la DO en un espectrofotómetro

(Thermo Scientific Biomate 3), se utilizó agua destilada como blanco. El matraz se colocó en una incubadora con agitación (NEW-BRUNSWICK INNOVA) 40 a 30 °C y 100 rpm. Se monitoreo el crecimiento de *S. aureus* (o del microorganismo patógeno a evaluar) cada hora durante 8 h mediante la medición de la DO. En otro experimento con las mismas condiciones, al inicio de la fase exponencial de crecimiento de *S. aureus*, se adicionaron 680 µg de proteína presente en PE resuspendida, determinada mediante el método de Bradford. En este experimento se monitoreo el crecimiento del microorganismo como se describió anteriormente.

### **7.5 Determinación de proteína por el método de Bradford.**

El contenido liofilizado de un tubo falcon fue resuspendido en 1.7 mL de amortiguador de fosfatos, pH 7, estéril. Se determinó el contenido de proteína por el método de Bradford, para lo cual en una placa de 96 pozos se colocaron 40 µL del reactivo de Bradford y 160 µL de la muestra diluida, se dejaron pasar 5 minutos y se midió la concentración de proteína a una longitud de onda de 595 nm en un lector de placas EPOCH (BIO-TECK). La cantidad de microlitros de PE liofilizada resuspendida en amortiguador equivalente a 680 µg de proteína, que se debe agregar al inicio de la fase exponencial de la cinética de crecimiento, se calculó de la manera siguiente.

$$\left( \frac{1000 \mu\text{L de PE resuspendido}}{3000 \mu\text{g de proteína}} \right) (680 \mu\text{g de proteína}) = 227 \mu\text{L de PE resuspendido}$$

### **7.6 Elaboración de la Película antibacteriana (PA).**

En un matraz de 250 mL se colocaron 50 mL de una solución de almidón de maíz al 6% p/p. Con el fin de gelatinizar el almidón, la solución se sometió a un proceso de esterilización en una autoclave (Yamato SM 300). De manera independiente, el liofilizado se resuspendió en 1.7 mL de amortiguador de fosfatos pH 7, esto con el fin de saber la cantidad de proteína que se agregaría a la película se determinó la cantidad de proteína presente en el resuspendido, mediante el método de Bradford descrito. Pasado el tiempo de esterilización se esperó a que la temperatura de la mezcla descendiera a 90°C para agregar 2.4 g de glicerol estéril (0.4 g de glicerol al 50% p/v por cada gramo de almidón), esta mezcla se colocó

por 5 minutos en una parrilla de agitación magnética (Corning PC-420 D) a 90°C y 200 rpm. Posteriormente se pesaron 12.5 g de la mezcla anterior en una balanza (ADAM ACB-PLUS 1000), se añadió por completo el contenido resuspendido del liofilizado y se homogeneizó en la misma parrilla por 5 minutos a 60 °C y 200 rpm. La mezcla se pesó en los moldes y se vertió en moldes en forma de círculo de la siguiente manera: 1g de mezcla en los moldes de 3.5 cm de diámetro y 1.5 g de mezcla en los moldes de 3.8 cm de diámetro. Los moldes con la mezcla se colocaron en una estufa estática (RIOSSA E-51) a 40°C por 20 h. Después de este tiempo los moldes se pasaron a un desecador con humedad relativa de 55% por 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, el desecador se almacenó a 4°C en un refrigerador (Nieto REB630), hasta el uso de las películas.

La cantidad de proteína inmovilizada en la matriz de almidón y glicerol se calculó de la siguiente manera

Primero se calculó el área total de la película que se obtuvo con 12.5 g de la mezcla.

$$A_1 = \Pi r^2 = (\Pi)(1.90^2) = 11.34 \text{ cm}^2$$

$$A_2 = \Pi r^2 = (\Pi)(1.75^2) = 9.62 \text{ cm}^2$$

$$\text{Área total} = (A_1 + A_2)5 = (11.34 + 9.62)5 = 104.8 \text{ cm}^2$$

Posteriormente se calculó la proteína total que se adicionó

$$\begin{aligned} \text{Proteína total} &= \left( \frac{3576 \mu\text{g de proteína}}{\text{mL de PE resuspendido}} \right) (1.7 \text{ mL de PE resuspendido}) \\ &= 6079.2 \mu\text{g de proteína} \end{aligned}$$

Finalmente se dividió la cantidad de proteína total entre el área total

$$\text{Proteína inmovilizada} = \left( \frac{6079.2 \mu\text{g de proteína}}{104.8 \text{ cm}^2 \text{ de película}} \right) = 58.00 \frac{\mu\text{g de proteína}}{\text{cm}^2 \text{ de película}}$$

La película control (**P**) fue realizada de la misma manera, con la excepción de que no se resuspendió PE, solo se agregó a la mezcla de glicerol y almidón amortiguador de fosfatos pH 7.

## **7.7 Evaluación de la película vs microbiota presente de manera inicial en la carne.**

La carne empleada para los análisis se obtuvo de un supermercado ubicado cerca de las instalaciones del laboratorio, la muestra se eligió al azar, se tomó del refrigerador donde se encontraba de manera no aséptica al ser un producto envasado con presentación comercial para venta al menudeo, la muestra se transportó al laboratorio a una temperatura de 6°C en una hielera con refrigerantes congelados utilizados para mantener el intervalo de 2°C a 8°C (NOM-109-SSA1-1994). En una campana de flujo laminar (ADLER) se realizó una homogeneización frotando los bisteces entre ellos, se cortaron y se pesaron 10 g de carne en una balanza granataria (OHAUS), por duplicado para cada tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes: carne sin ningún recubrimiento (N); carne recubierta con plástico Egapack (L); carne recubierta con la biopelícula sin los compuestos antibacterianos (P) y carne recubierta con la película activa (PA).

Para la determinación de mesófilos aerobios presentes en la carne al tiempo cero del análisis, se pesaron 10 gramos de carne por duplicado, se colocaron en 90 mL de agua peptonada, se homogeneizaron en stomacher (SEWARD 400 CIRCULATOR) por un minuto y medio a 250 rpm, posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$  de cada 10 g de muestra que se pesó (NOM-110-SSA1-1994), el medio que se utilizó para el recuento de mesófilos fue agar cuenta estándar. Para el plaqueo se colocó un mililitro de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en cajas Petri, por triplicado, se vertieron 20 mL de agar líquido a 45°C en las cajas y se homogeneizaron de la siguiente forma: 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta que el inóculo se incorporó completamente en el medio y por último las placas se dejaron solidificar. Las cajas Petri con agar cuenta estándar se colocaron en posición invertida a 37 °C por 36 h en una incubadora estática (BG E71) (NOM-092-SSA1-1994).

Así mismo, se llevó a cabo la determinación de coliformes totales y fecales en placas 3M® Petrifilm™, se incubaron a 37 °C por 24 h y 48 h respectivamente (3M, 2003).

Las demás muestras se incubaron por 6 días a 4°C en un refrigerador (METALFRIO REB450EN2M).

Después de los 6 días de incubación se determinó la cantidad presente de mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales en cada tratamiento.

### **7.8 Estandarización de las UFC para inocular a la carne con los microorganismos de importancia en la inocuidad de alimentos.**

Para inocular al microorganismo se tomó como criterio lo reportado en la literatura, como la mayoría de los autores coloca de manera intencional alrededor de  $10^4$  UFC/g de microorganismo, entonces se decidió inocular esta cantidad en la carne (Sánchez *et al.*, 2014).

A partir de un glicerol que contenía la cepa del microorganismo patógeno a evaluar, se tomaron 50 µL y se inocularon en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo BHI. El tubo se colocó en una incubadora estática (BG E71) a 37°C por 12 h. Después del tiempo de incubación se tomaron 100 µL del cultivo anterior y se realizaron diluciones hasta  $10^{-8}$ , para obtener colonias contables en agar BHI, con el fin de encontrar la dilución para inocular la carne.

### **7.9 Evaluación de la PA contra microorganismos patógenos inoculados intencionalmente.**

A partir de un glicerol que contenía la cepa del microorganismo patógeno a evaluar se tomaron 50 µL y se inocularon en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo BHI. El tubo se colocó en una incubadora estática (BG E71) a 37°C por 12 h. La carne empleada para los análisis se obtuvo de un supermercado ubicado cerca de las instalaciones del laboratorio, la muestra se eligió al azar, se tomó del refrigerador donde se encontraba de manera no aséptica al ser un producto envasado con presentación comercial para venta al menudeo, la muestra se transportó al laboratorio a una temperatura de 6°C en una hielera con refrigerantes

congelados utilizados para mantener el intervalo de temperatura de 2°C a 8°C (NOM-109-SSA1-1994). Se realizó la determinación del microorganismo en cuestión en 10 g de carne al tiempo cero, para verificar que no existiera algún microorganismo que interviniera con la determinación, es decir, algún microorganismo que pudiera crecer en el medio selectivo y diferencial, y con esto modificar la cuenta en placa o que se llevara a cabo una incorrecta interpretación de los resultados, mediante la observación de las colonias, después de 24 h de incubación a 37°C.

En campana de flujo laminar se homogeneizó el lote de carne. Se pesaron 10 g de muestra para cada tratamiento por duplicado.

De las diluciones seriadas del microorganismo se tomó un mL de la dilución  $10^{-2}$  y se colocó en la carne de cada tratamiento, se extendió con varilla de vidrio y se dejó absorber en la carne por 30 minutos. Posteriormente se colocaron los recubrimientos para cada tratamiento (L, P y PA).

Para verificar la cantidad de microorganismo inoculado, en dos muestras de carne sin película se realizó el conteo en placa en medio selectivo y diferencial de cada bacteria, se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ ; se tomó 1 mL de cada dilución, se extendió con varilla de vidrio estéril y se dejó absorber en el agar por 30 minutos. Las placas de agar fueron colocadas en posición invertida en una incubadora estática a 37°C por 24 h.

Para *S. aureus* se tomó 1 mL, se inoculó en la placa petrifilm y se dejó gelificar. Las placas petrifilm fueron colocadas en una incubadora estática a 37°C por 24 h. Para verificar que se trataba de *S. aureus*, a las 23 h se colocó un disco revelador que contenía ADN, después de la colocación de este disco, las placas se incubaron por 2 h más y se realizó el conteo.

Cada muestra de carne de cada microorganismo se incubó por 6 días a 5°C en un refrigerador (METALFRIO REB450EN2M). Con la excepción de *Y. enterocolitica*, ya que se realizó una determinación al tiempo 6 y el análisis completo del experimento con este microorganismo se realizó hasta el día 7.

## 8. Resultados y discusión.

### 8.1 Verificación de la actividad antibacteriana del preparado extracelular (PE) contra los microorganismos de interés en la inocuidad de la carne.

Se elaboraron cinéticas de crecimiento de los siguientes microorganismos: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa* mediante el monitoreo de la  $DO_{600\text{ nm}}$  en espectrofotómetro, con el objetivo de establecer el inicio de la fase exponencial de crecimiento del microorganismo, debido a que en este punto el microorganismo terminaría de adaptarse a las condiciones a las que está creciendo (Montville & Matthews, 2013). En otro experimento independiente se agregó PE al inicio de la fase exponencial, debido a que a partir de este punto solo existiría como variable en el crecimiento del microorganismo la adición de la PE. Para saber la cantidad de  $\mu\text{L}$  que se adicionaron de PE a las cinéticas de los diferentes microorganismos se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford. Los 680  $\mu\text{g}$  de proteína presente en PE que se adicionaron para *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Y. enterocolitica*, se debe a la cantidad de proteína promedio presente en el liofilizado resuspendido en 1.7 mL de amortiguador de fosfatos dividido entre los 12.5 g de la mezcla de almidón y que funcionan para inhibir el crecimiento de los microorganismos debajo del área de la película como se mostró en la **Tabla 2** (Robles, 2019). Es decir:

$$\left( \frac{4997 \mu\text{g de proteína}}{\text{mL de PE resuspendido}} \right) (1.7 \text{ mL de PE resuspendido}) = \left( \frac{8495 \mu\text{g de proteína}}{12.5 \text{ g de mezcla}} \right) \\ = 680 \frac{\mu\text{g de proteína}}{\text{g de mezcla}}$$

Mientras que para *S. enterica* y *P. aeruginosa* se utilizó el doble, 1360  $\mu\text{g}$  de proteína, al no observar cambios en las pendientes de los tres primeros microorganismos, como se muestra en las **Figuras del Anexo 1**. A partir de las cinéticas de crecimiento de los 5 patógenos se obtuvieron 5 gráficas distintas que se encuentran en el Anexo I. En la **Tabla 3** se muestra el resumen de los resultados de la evaluación de PE contra los diversos microorganismos y se

observa que dentro de los microorganismos evaluados *Y. enterocolitica* es el microorganismo más sensible a PE, puesto que después de la adición de PE el inicio de la fase exponencial se retrasó 3 h y la pendiente se modificó (**Figura 17, Anexo 1**). En el caso de *L. monocytogenes* el inicio de la fase exponencial es dos horas después debido a la adición de PE, mientras que para *S. aureus* se observa un retraso de dos horas. Para *S. enterica* y *P. aeruginosa* se observa una reducción en la pendiente de la cinética de estos microorganismos (**Anexo 1, Figura 18 y Figura 19**, respectivamente); sin embargo, no se mostró el retraso de la fase exponencial. Lo anterior se puede deber a que la cantidad de PE que se agregó en la evaluación del crecimiento era insuficiente para la cantidad de microorganismos que se encontraban en el medio líquido. En PE se había reportado la presencia de la bacteriocina AS-48 y Robles encontró la presencia de PGHs, esta combinación resultó afectar el crecimiento de los microorganismos evaluados debido a que las PGHs hidrolizan el peptidoglucano, que es el principal componente de la pared celular (Serrano *et al.*, 2018) y la bacteriocina AS-48 afecta la integridad de la membrana celular (Grande *et al.*, 2014). Después de evaluar la PE contra *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *P. aeruginosa*, obteniendo resultados favorables se procedió a evaluar la película activa contra estas bacterias patógenas.

**Tabla 3.** Resumen de las cinéticas de crecimiento de cada microorganismo patógeno.

<b>Microorganismo</b>	<b>Horas de retraso en el inicio de la fase</b>	<b>Proteína adicionada</b>
<i>L. monocytogenes</i>	1	680
<i>S. aureus</i>	2	680
<i>Y. enterocolitica</i>	3	680
<i>S. typhimurium</i>	0	1360
<i>P. aeruginosa</i>	0	1360

**Proteína:** microgramos de proteína/ centímetros cuadrados de película

## 8.2 Evaluación de la Película Activa (PA) vs. mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales.

Con los resultados obtenidos en el apartado anterior se determinó que PE sí afectaba el crecimiento de los microorganismos evaluados, por lo que se procedió a la elaboración de la PA.

En la **Tabla 4** se muestra la cantidad de proteína inmovilizada en la película. La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford.

**Tabla 4.** Cantidad de proteína utilizada en la PA contra la microbiota presente de manera inicial en la carne.

<b>Concentración de proteína agregada mg/mL</b>	<b>Cantidad de proteína inmovilizada <math>\left(\frac{\mu g \text{ de proteína}}{cm^2 \text{ de película}}\right)</math></b>
3.595 ± 1.020	57.8

n= 6 repeticiones.

Se realizó el análisis microbiológico en el lote de carne para evaluar la cantidad de microorganismos que se encontraban presente de manera inicial. Se evaluaron mesófilos aerobios, coliformes fecales y totales. Los resultados para mesófilos aerobios se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Cuenta inicial de mesófilos aerobios presentes en la carne de manera inicial

<b>Unidades formadoras de colonias por gramo de carne <math>\left(\frac{UFC}{g \text{ de carne}}\right)</math></b>
13x10 <sup>4</sup> ±13x10 <sup>3</sup>

n= 3 repeticiones

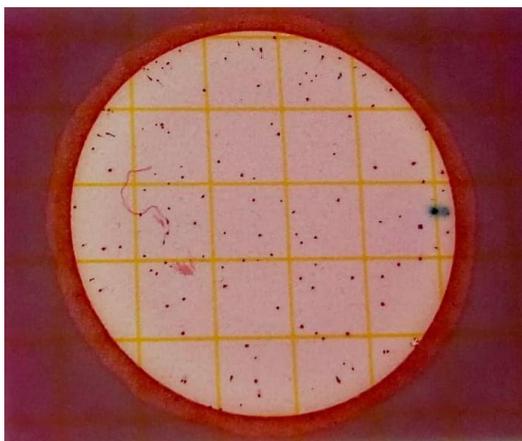
De acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, se eligió la dilución  $10^{-3}$  ya que el conteo de colonias se encuentra dentro del intervalo de 25-250 colonias por placa. González *et al.*, en el 2014 reportó un conteo inicial de mesófilos aerobios en la carne de res de  $16 \times 10^3$  UFC/g, mientras que Galván en el 2011 reportó  $18 \times 10^3$  UFC/g, al compararla con la cantidad de mesófilos aerobios de  $13 \times 10^4$  UFC/g que se muestra en la **Tabla 5**, se observa que es un ciclo logarítmico mayor, sin embargo, el límite máximo reportado en la NOM-034-SSA1-1993 para mesófilos aerobios es de  $50 \times 10^5$ , por lo que, de acuerdo con esta norma, la carne adquirida se encuentra dentro de especificación. La muestra al momento de ser comprada se encontraba en refrigeración y la carne antes de ser empacada se encontraba en un cuarto frío. Un recuento de mesófilos aerobios elevado puede significar contaminación del alimento debido a la deficiente manipulación durante la transformación del músculo a carne y la posibilidad de que existan patógenos, ya que estos son mesófilos (Galván *et al.*, 2011).

En la **Tabla 6** se muestra el resultado para el conteo de coliformes totales iniciales. El conteo se realizó en Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes, este medio contiene nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias (3M, 2018). Para coliformes se llevó a cabo el conteo a las 24 h de incubación, se seleccionaron las colonias rojas o rosas debido a que los coliformes fermentan la lactosa y el ácido producido causa que el indicador rojo neutro vire, además de la precipitación de las sales biliares (MCD LAB). Para *E. coli* se contó a las 48 h, se seleccionaron las colonias azules, ya que cerca del 97% de *E. coli* produce  $\beta$ -glucuronidasa, esto produce una precipitación azul que se asocia a su crecimiento (**Figura 8**). La temperatura de incubación para ambas determinaciones fue de 37°C.

**Tabla 6.** Cuenta inicial de coliformes totales y *E. coli* presentes en la carne.

	$\frac{UFC}{g} \pm \sigma$
<b>Coliformes Totales</b>	$37 \times 10^2 \pm 40 \times 10^1$
<b><i>E. coli</i></b>	$20 \times 10^1 \pm 10 \times 10^1$

**UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne.  **$\sigma$ :** Desviación estándar. **n=3** repeticiones



**Figura 8.** Placa Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes. Colonias rojas: coliformes totales; Colonias azules: coliformes fecales.

En el caso de coliformes totales se tiene  $37 \times 10^2$  UFC/g de carne, los coliformes totales pueden reflejar prácticas higiénicas inadecuadas (Pérez *et al.*, 2008), sin olvidar mencionar que, los coliformes son ubicuos del ambiente. Para evidenciar la contaminación fecal en los alimentos se busca *E. coli* ya que este microorganismo se encuentra en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente y, por tanto, su presencia evidencia contaminación fecal. Mientras que para *E. coli*, la carne presentó  $20 \times 10^1$  UFC/g, esta cantidad se encuentra dentro de especificación al compararla con  $10 \times 10^2$  UFC/g que establece la NOM-194-SSA1-2004 para carne refrigerada de mamíferos.

### 8.2.1 Aplicación de los distintos recubrimientos sobre la carne de res.

Se incubaron 10 g de carne de res con diferentes tratamientos: Carne sin ningún tipo de recubrimiento (**N**), carne con plástico autoadherible Egapack (**L**), biopelícula sin la PE (**P**) y película activa con la adición de PE (**PA**). Cada tratamiento se realizó por duplicado. La carne se almacenó 6 días a 5°C. Después de los 6 días de incubación se realizó la determinación de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales. En la **Tabla 7** se muestran los resultados del vertido en placa de los mesófilos aerobios a las 48 h de incubación.

**Tabla 7.** Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la cuenta de mesófilos aerobios presentes en la carne después de 6 días de refrigeración.

Tratamiento	UFC/g $\pm$ $\sigma$	n
Ni <sup>a</sup>	13x10 <sup>4</sup> $\pm$ 13x10 <sup>3</sup>	3
N	18x10 <sup>8</sup> $\pm$ 15x10 <sup>6</sup>	3
L	10x10 <sup>7</sup> $\pm$ 81x10 <sup>5</sup>	6
P	66x10 <sup>6</sup> $\pm$ 95x10 <sup>5</sup>	4
PA <sup>a</sup>	34x10 <sup>5</sup> $\pm$ 20x10 <sup>4</sup>	4

**UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne.  $\sigma$ : Desviación estándar n=Repeticiones. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos, con  $\alpha= 0.05\%$ . Para el conteo de los microorganismos se utilizó como medio agar cuenta estándar.

Al comparar los diversos tratamientos, se observa que la cantidad de mesófilos aerobios aumenta 4 ciclos logarítmicos después de 6 días de refrigeración (N con respecto a Ni), esto corresponde con el hecho de que N no tenía ningún tipo de recubrimiento, puesto que no existía una barrera al vapor de agua, ni de oxígeno lo que evitaría el desarrollo de microorganismos como, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brochothrix thermosphacta*, *Moraxella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Proteus*, principales microorganismos causantes de la

descomposición de carne y que forman parte de los mesófilos aerobios capaces de desarrollarse en refrigeración (Reséndiz *et al.*, 2013; Woraprayote *et al.*, 2016). Mientras que para los tratamientos L y P se observó la reducción de uno y dos ciclos logarítmicos respectivamente, comparados con N. PA presenta ventaja frente a L, ya que reduce la cantidad de microorganismos presentes, recalcando que L es la película con la que se comercializa la carne normalmente. Al comparar PA con P se observa que hay diferencia entre UFC/g de carne sólo en un ciclo logarítmico, sin embargo, existe diferencia significativa, por la actividad antibacteriana de PE y no al efecto de permeabilidad de  $O_2$  o de los otros componentes de la película, como son el almidón y el glicerol. PA presenta la menor cantidad de microorganismos y estadísticamente es diferente a los demás tratamientos con excepción de Ni, con este tratamiento no existe diferencia significativa, lo que indica que los compuestos inmovilizados en la película activa funcionan como agentes bacteriostáticos para los microorganismos presentes en la carne.

Se ha reportado actividad de la bacteriocina AS-48 contra bacterias relacionadas con el deterioro tales como *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus sakei* entre otras bacterias ácido-lácticas (Grande *et al.*, 2014). Cabe mencionar que con respecto a la NOM-034-SSA1-1993, donde el límite máximo reportado para mesófilos aerobios es de  $50 \times 10^5$ , por lo que para este tratamiento (PA) después de 6 días de refrigeración el número de mesófilos aerobios aún entra en la especificación. Finalmente, al comparar PA con N existe diferencia significativa y se observa una diferencia de tres ciclos logarítmicos. Aguillón en el 2018 evaluó en carne molida de res dos películas a base de quitosano una con ácido láctico y otra con polietilenglicol y ácido láctico, las cuales redujeron más de uno y dos ciclos logarítmicos respectivamente la cantidad de mesófilos aerobios, después de 6 días de incubación a 4°C. Unalan *et al.*, 2011 reportó una biopelícula, aplicada a carne molida para hamburguesas, a base de almidón de maíz con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y lisozima, esta película redujo la cuenta de mesófilos aerobios 0.81 ciclos logarítmicos después de 7 días de

almacenamiento a 4°C. Higuera *et al.*, en el 2013 reportó otra biopelícula a base de quitosano, la cual fue aplicada en filetes de pechuga de pavo, esta película redujo 2 ciclos logarítmicos la cantidad de mesófilos aerobios, con respecto al control después de 8 días de almacenamiento a 4°C. La biopelícula desarrollada en este grupo de trabajo reduce más ciclos logarítmicos la cantidad de mesófilos aerobios presentes en carne cruda, por lo tanto, resulta ser más efectiva que las otras películas reportadas en la literatura.

En la **Tabla 8** se muestran los resultados para el conteo de coliformes en Placas Petrifilm™,

**Tabla 8.** Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la cuenta de coliformes totales en carne de res.

Tratamiento	UFC/g ± σ
Ni <sup>a</sup>	34x10 <sup>2</sup> ± 40x10 <sup>1</sup>
N	73x10 <sup>4</sup> ± 25x10 <sup>3</sup>
L	14x10 <sup>4</sup> ± 35x10 <sup>2</sup>
P	99x10 <sup>3</sup> ± 85x10 <sup>2</sup>
PA <sup>a</sup>	13x10 <sup>3</sup> ± 86x10 <sup>1</sup>

**Ni:** Carne al tiempo 0. **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento. **L:** carne con plástico autoadherible egapack. **P:** biopelícula sin PE. **PA:** Biopelícula Activa. **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n= 3** repeticiones. **σ:** Desviación estándar. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos, con α= 0.05%. El conteo de coliformes totales se realizó en Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes a las 24 h.

En la superficie de la carne bovina suelen encontrarse varios tipos de coliformes totales, tales como *Enterobacter*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* (Carrillo *et al.*, 2007). Se observa el mayor crecimiento de este grupo de microorganismos en el tratamiento N con 73x10<sup>4</sup> UFC/g de carne, en el mismo

ciclo logarítmico se encuentra el tratamiento L, mientras que en el tratamiento P se tiene un ciclo menos. La diferencia significativa entre Ni y N refleja que los coliformes totales presentes en la carne de forma inicial crecieron durante el almacenamiento en refrigerador. En el caso de los tratamientos Ni y PA, se observa que no presentan diferencia significativa entre ellos, lo que indica que la presencia de la PA en la carne funciona como bacteriostático para los coliformes totales presentes en la carne, ya la cuenta de este grupo de microorganismos que no aumenta de forma significativa. Al comparar PA con los tratamientos L y P, la cantidad de coliformes que se cuantificó es menor. Grande *et al.*, en el 2014 reportó actividad de la bacteriocina AS-48 contra *Klebsiella*, sin embargo, la actividad antibacteriana de PA es más amplia para el grupo de coliformes totales, a partir de lo observado en este experimento.

Unalan *et al.*, en 2011 reportó una biopelícula, aplicada a carne molida para hamburguesas, a base de almidón de maíz con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y lisozima, esta película a los 5 días de refrigeración a 4°C redujo la cuenta de coliformes totales 1.18 ciclos logarítmicos, sin embargo, después de 7 días de almacenamiento a 4°C la película perdió actividad, contrario a la película elaborada en el grupo de trabajo en donde la actividad se conservó después de 6 días, la cual redujo 1 ciclo logarítmico la cantidad de UFC/g.

En **Tabla 9** se muestra el resultado del conteo de las coliformes fecales en placas petrifilm.

**Tabla 9.** Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la cuenta de *E. coli* en carne de res.

Tratamiento	UFC/g $\pm \sigma$
Ni <sup>a</sup>	20x10 <sup>1</sup> $\pm$ 10x10 <sup>1</sup>
N	20x10 <sup>2</sup> $\pm$ 58x10 <sup>1</sup>
L <sup>b</sup>	80x10 <sup>1</sup> $\pm$ 10x10 <sup>1</sup>

<b>P<sup>b</sup></b>	90x10 <sup>1</sup> ± 20x10 <sup>1</sup>
<b>PA<sup>a</sup></b>	14x10 <sup>1</sup> ± 20x10 <sup>0</sup>

**Ni:** Carne al tiempo 0 **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento **L:** carne con plástico autoadherible egapack **P:** biopelícula sin PE **PA:** Biopelícula Activa **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n** = 3 repeticiones **σ:** Desviación estándar. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos, con  $\alpha = 0.05\%$ . El conteo de *E. coli* se realizó en Placas Petrifilm™ para el Recuento de *E. coli*/Coliformes a las 48 h.

Se observa que el tratamiento que presenta mayor cantidad de UFC/g de carne es N, puesto que no cuenta con ningún tipo de recubrimiento, cabe señalar que después de los 6 días de refrigeración la cuenta de *E. coli* en la carne sin la biopelícula activa es mayor a 10x10<sup>2</sup> UFC/g límite establecido en la NOM-194-SSA1-2004, por lo que la carne con este tratamiento se encuentra fuera de especificación. La diferencia entre Ni y PA, no fue significativa, lo que indica que la presencia de la PA ayudó a mantener la cuenta de *E. coli* en este tratamiento, durante 6 días en refrigeración. Al comparar PA con N se observa una diferencia de un ciclo logarítmico de UFC/g de carne esto se debe a que la bacteriocina AS-48 presenta actividad antagonista contra *E. coli* (Grande *et al.*, 2014).

La carne de res recubierta con la biopelícula que contiene los compuestos antibacterianos (PA), presenta ventaja frente a los otros tres tratamientos evaluados, porque reduce en más ciclos logarítmicos la cantidad de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. coli*. Es importante recalcar la ventaja de utilizar PA frente a L ya que normalmente la carne se comercializa con esta película.

La disminución de los microorganismos de deterioro es un proceso importante para la conservación de la carne, puesto que los microorganismos son los principales agentes que disminuyen su vida de anaquel (Kalalou *et al.*, 2010).

### 8.3 Inoculación intencional de microorganismos en carne de res.

Al observar actividad antagonista de PE mediante las cinéticas de crecimiento contra: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella entérica Typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* se decidió elaborar PA para la evaluación de estos microorganismos inoculados intencionalmente en carne.

#### 8.3.1 Evaluación de la PA contra *Listeria monocytogenes*.

##### 8.3.1.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra *L. monocytogenes*.

En la **Tabla 10** se muestra la determinación de proteína por el método de Bradford, para la elaboración de la PA, que se utilizó para la evaluación la biopelícula activa contra *L. monocytogenes* inoculado de forma intencional en la carne.

**Tabla 10.** Cantidad de proteína utilizada en la PA contra *L. monocytogenes*.

Concentración de proteína $\left(\frac{mg}{mL}\right)$	Cantidad de proteína inmovilizada $\frac{\mu g \text{ de proteína}}{cm^2 \text{ de película}}$
3.329 ± 0.432	53.99

n= 6 repeticiones

La cuantificación de este microorganismo se realizó en agar Poliximina, Acriflavina, LiCl, Ceftazidima, Agar, Manitol (PALCAM, Biomériux) y se seleccionaron las colonias verdes que alrededor tenían un halo de color negro (**Figura 9**), debido a que este microorganismo hidroliza la esculina presente en el medio (Oxoid, 2018). Se realizó un análisis antes de inocular la carne para evidenciar la presencia de algún microorganismo que pudiera intervenir en el experimento, es decir, que el microorganismo a ser evaluado se encontrara en cantidades que pudieran intervenir con el experimento. El resultado para esta determinación fue negativo. Para la evaluación de *L. monocytogenes* vs. PA se inocularon  $14 \times 10^4$  UFC/g de carne de res.



**Figura 9.** Colonias de *L. monocytogenes* en medio PALCAM

Después de los 6 días de incubación a 4°C se realizó el análisis microbiológico de la carne que se inoculó intencionalmente con *L. monocytogenes*, Los resultados se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos en carne inoculada intencionalmente con *L. monocytogenes*.

Tratamiento	UFC/g $\pm \sigma$
<b>Ni</b>	$14 \times 10^4 \pm 55 \times 10^2$
<b>N</b>	$20 \times 10^4 \pm 87 \times 10^2$
<b>L</b>	$34 \times 10^4 \pm 50 \times 10^3$
<b>P</b>	$43 \times 10^4 \pm 38 \times 10^3$
<b>PA</b>	$50 \times 10^3 \pm 10 \times 10^2$

**Ni:** Carne al tiempo 0. **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento. **L:** carne con plástico autoadherible egapack. **P:** biopelícula sin PE. **PA:** Biopelícula Activa. **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n = 3** repeticiones.  **$\sigma$ :** Desviación estándar. Todos los tratamientos presentaron diferencia significativa entre ellos, con  $\alpha = 0.05\%$ .

Se observa que los tratamientos L y P no funcionan como barrera para el crecimiento de *L. monocytogenes* presente en la carne, como sucedió en la evaluación de la microbiota de deterioro (**Tablas 7, 8 y 9**). Por el contrario, al ser un microorganismo anaerobio facultativo (Donnelly, 2013), la colocación de estas dos películas reduce el paso de oxígeno, por lo que el crecimiento de este microorganismo es mayor con estos dos tratamientos (Reséndiz *et al*, 2013). Se observa que PA es el tratamiento que contiene la menor cantidad de *L. monocytogenes* (UFC/g de carne) incluso la cantidad es menor que en Ni, lo que indica que PA tiene la función de bactericida en este microorganismo. De acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014 *L. monocytogenes* es uno de los patógenos más peligrosos dentro de los causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), con una tasa de mortalidad entre un 20% a 30%, más alta que casi todas ETA, por lo que no debe haber presencia de este microorganismo en el alimento. Las bacteriocinas son de amplio interés por su actividad antilisterial (Ming *et al.*, 1997). Grande *et al.*, 2014 reportó que al exponer a este microorganismo frente a la bacteriocina AS-48 presentó una alta sensibilidad.

Ravishankar en el 2012 reportó una película a base de pectina con 3% de carvacrol, que redujo la cantidad de *L. monocytogenes* 2 ciclos logarítmicos en jamón cocido. También reportó otra película con cinamaldehído que redujo 0.5 a 1.5 ciclos logarítmicos igual en jamón cocido, al compararla con la película elaborada en el grupo de trabajo solo redujo un ciclo logarítmico.

### **8.3.2 Evaluación de la PA contra *S. aureus*.**

#### **8.3.2.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra *S. aureus*.**

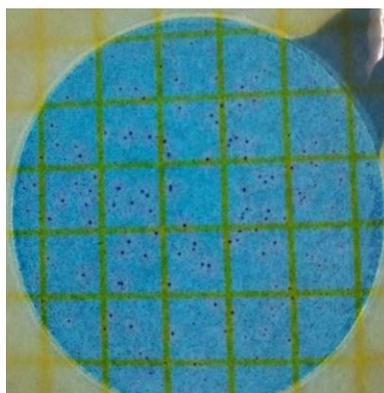
En la **Tabla 12** se muestra la determinación de proteína por el método de Bradford, para la elaboración de la PA, que se utilizó para la evaluación contra *S. aureus* inoculado de forma intencional.

**Tabla 12.** Cantidad de proteína utilizada en la PA contra *S. aureus*.

Concentración de proteína mg/mL	Cantidad de proteína inmovilizada $\frac{\mu\text{g de proteína}}{\text{cm}^2 \text{ de película}}$
3.895 $\pm$ 0.363	63.19

n= 6 repeticiones

La cuantificación de este microorganismo se realizó en Placas Petrifilm™ Staph Express, las cuales contienen medio modificado cromogénico Baird-Parker, en este medio pueden crecer distintas especies de *Staphylococcus*. Las colonias de *S. aureus* se observan de color rojo violeta, sin embargo, al no encontrarse únicamente colonias de este color, se colocó el disco Disco Staph Express, que contiene un indicador y ácido desoxirrebonucleico (ADN). *S. aureus* produce desoxirribonucleasa (DNasa) y esta reacciona con el indicador para formar zonas rosadas (3M, 2009) como se muestra en la **Figura 10**.



**Figura 10.** Disco Staph Express en Placa Petrifilm™ Staph Express, con el cual se observan halos rosas alrededor de cada colonia positiva para *S.*

Se realizó un análisis antes de inocular la carne para verificar que no existiera algún microorganismo que pudiera intervenir en el experimento. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**. De acuerdo con la NOM-034-SSA1-1993 el límite

máximo para este microorganismo es de 1000 UFC/g de carne, por lo que la carne está dentro de la especificación. *S. aureus* se encuentra de forma natural en la piel de humanos por lo que un exceso de este microorganismo en el alimento indica malas prácticas de higiene en los operarios (Moreno, 2006).

**Tabla 13.** Análisis microbiológico de la carne antes de inocular con *S. aureus* para cuantificar la presencia de este microorganismo.

Tiempo (h)	UFC/g $\pm\sigma$
0	16x10 <sup>1</sup> $\pm$ 51x10 <sup>0</sup>

**UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n=** 3 repeticiones  
 **$\sigma$ :** Desviación estándar

Para la evaluación de *S. aureus* vs PA se inocularon 33x10<sup>4</sup> UFC/g de carne de res. Después de los 6 días de incubación a 4°C se realizó el análisis microbiológico de la carne. Los resultados se muestran en la **Tabla 14**. Se observa que los tratamientos L, P y PA no ejercen ningún efecto antimicrobiano sobre *S. aureus*, esto coincide con lo reportado por Robles, 2019 (**Tabla 2**), donde la actividad antibacteriana de la película en la difusión en agar se mantiene por completo con la mayoría de los microorganismos que se evaluaron, excepto con *S. aureus*. Con base en lo reportado por Robles, se observa que en el día 1 sí hay actividad de la PA, y al pasar los días la actividad disminuyó, ya que el microorganismo continuó con su desarrollo. Posiblemente esto sucedió en la carne al finalizar el tiempo de almacenamiento, no se encontró evidencia de la inhibición.

**Tabla 14.** Efecto de la aplicación de diferentes tratamientos sobre la cuenta de *S. aureus* inoculado intencionalmente en carne de res.

Tratamiento	UFC/g $\pm \sigma$	n
<b>Ni</b>	$33 \times 10^4 \pm 24 \times 10^3$	3
<b>N</b>	$76 \times 10^4 \pm 13 \times 10^4$	4
<b>L</b>	$10 \times 10^5 \pm 87 \times 10^3$	4
<b>P</b>	$12 \times 10^5 \pm 13 \times 10^4$	4
<b>PA</b>	$11 \times 10^5 \pm 15 \times 10^4$	4

**Ni:** Carne al tiempo 0. **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento. **L:** carne con plástico autoadherible egapack. **P:** biopelícula sin PE. **PA:** Biopelícula Activa. **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n=**Repeticiones.  **$\sigma$ :** Desviación estándar. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos,  $\alpha= 0.05\%$ . Para la cuenta en placa de este microorganismo se utilizaron Placas Petrifilm™ Staph Express.

### 8.3.3 Evaluación de la PA contra *Yersinia enterocolitica*.

#### 8.3.3.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra *Y. enterocolitica*

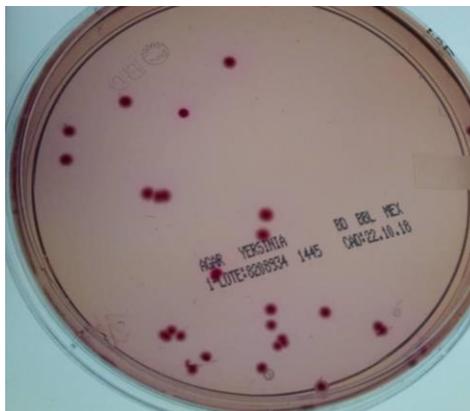
En la **Tabla 15** se muestra la determinación de proteína por el método de Bradford, para la elaboración de la PA, que se utilizó para la evaluación contra *Y. enterocolitica* inoculada intencionalmente en carne.

**Tabla 15.** Cantidad de proteína utilizada en la PA contra *Y. enterocolitica*

Concentración de proteína $\left(\frac{mg}{mL}\right)$	Cantidad de proteína inmovilizada $\frac{\mu g \text{ de proteína}}{cm^2 \text{ de película}}$
$3.020 \pm 0.432$	48.99

**n= 6** repeticiones

La cuantificación de este microorganismo se realizó en agar selectivo *Yersinia* Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina (CIN), la fermentación del Manitol en presencia del rojo neutro da como resultado unas típicas colonias de *Y. enterocolítica* traslúcidas con el centro rosado y una característica forma de ojo de buey (Becton Dickinson, 2013) (**Figura 11**). Para la evaluación de *Y. enterocolítica* vs PA se inocularon  $26 \times 10^4$  UFC/g de carne de res. Se realizó un análisis microbiológico antes de inocular la carne para verificar que no existiera algún microorganismo que pudiera intervenir en el experimento. En el medio *Yersinia* (Biomériux) pueden crecer enterobacterias, debido a la similitud de los medios en donde crecen estas bacterias (Becton Dickinson, 2013) en el análisis preliminar se observaron colonias rojas, sin embargo, no se identificaron colonias características de *Y. enterocolítica*, por lo que el resultado fue negativo.



**Figura 11.** Colonias de *Yersinia enterocolitica* en medio

Después de 7 días de incubación a 4°C se realizó el análisis microbiológico de la carne que se inoculó intencionalmente con *Y. enterocolitica*. Los resultados se muestran en la **Tabla 16**.

**Tabla 16.** Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre *Y. enterocolitica* inoculada intencionalmente en carne de res.

Tratamiento	UFC/g $\pm\sigma$
<b>Ni<sup>a</sup></b>	26x10 <sup>4</sup> $\pm$ 17x10 <sup>4</sup>
<b>N</b>	28x10 <sup>9</sup> $\pm$ 76x10 <sup>7</sup>
<b>L</b>	65x10 <sup>9</sup> $\pm$ 42x10 <sup>8</sup>
<b>P</b>	18x10 <sup>9</sup> $\pm$ 20x10 <sup>7</sup>
<b>PA<sup>a</sup></b>	84x10 <sup>7</sup> $\pm$ 18x10 <sup>7</sup>

**Ni:** Carne al tiempo 0. **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento. **L:** carne con plástico autoadherible egapack. **P:** biopelícula sin PE. **PA:** Biopelícula Activa. **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n=** 3 repeticiones.  **$\sigma$ :** Desviación estándar. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos, con  $\alpha= 0.05$

El crecimiento de *Y. enterocolitica* después de 7 días de refrigeración se debe a que es un microorganismo psicrófilo (Moreno, 2006). En la cinética de crecimiento de este microorganismo (Anexo 1, **Figura 16**) se observó que el periodo de adaptación al medio donde se encuentra (fase lag) es de 1 hora, es la más pequeña con respecto a los demás microorganismos evaluados, lo cual refleja la rápida adaptación del microorganismo al medio en el que crece, esto también se observó en la cuenta en placa ya que la cantidad de este microorganismo aumentó a más del doble al comparar Ni contra N. Con respecto a N, el tratamiento L no mostró ejercer efecto antibacteriano contra este microorganismo. Estadísticamente entre los tratamientos Ni y PA no existe diferencia significativa, sin embargo, en PA, *Y. enterocolitica* aumenta 3 ciclos logarítmicos. PA reduce dos ciclos logarítmicos la cantidad de *Y. enterocolitica* con respecto al tratamiento N, por lo que la biopelícula sí ejerce actividad antibacteriana frente a este microorganismo; sin embargo, no es suficiente para evitar el crecimiento *Y. enterocolitica* en la carne. Cabe resaltar que no se encontró reportado en la

literatura la actividad de la bacteriocina As-48 contra este microorganismo, esta actividad antagonista es importante para la inocuidad del alimento, puesto que la carne es un alimento que se almacena en refrigeración y esta temperatura no impide el crecimiento de esta bacteria, por lo que aplicar la biopelícula activa ayudaría a evitar el desarrollo de este microorganismo.

### 8.3.4 Evaluación de la PA contra *Salmonella entérica* Typhimurium.

#### 8.3.4.1 Elaboración de la PA para su utilización contra *S. enterica*.

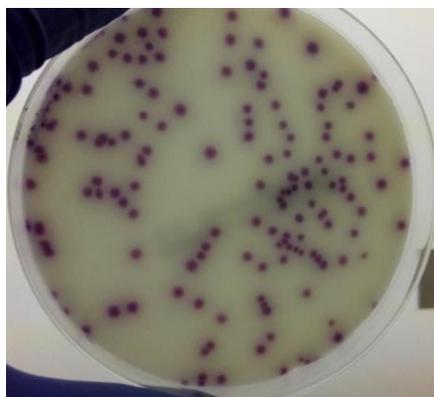
En la **Tabla 17** se muestra la determinación de proteína por el método de Bradford, para la elaboración de la PA, que se utilizó para la evaluación contra *S. enterica* inoculado intencionalmente en la carne de res.

**Tabla 17.** Cantidad de proteína utilizada en la PA contra *S. enterica* en carne intencionalmente inoculada.

Concentración de proteína $\left(\frac{mg}{mL}\right)$	Cantidad de proteína inmovilizada $\frac{\mu g \text{ de proteína}}{cm^2 \text{ de película}}$
3.058 ± 0.410	49.60

n= 6 repeticiones

La cuantificación de este microorganismo se llevó a cabo en agar Chrom ID Salmonella Elite (Biomérieux) en el cual, se identifica como *S. enterica* a las colonias de color morado (**Figura 12**), debido a que este microorganismo produce una esterasa que hidroliza a los ésteres presentes en la mezcla selectiva del medio (BioMérieux, 2018). Para la evaluación de *S. enterica* contra PA se inocularon  $18 \times 10^4$  UFC/g de carne de res, de dicho microorganismo. Se realizó un análisis antes de inocular la carne para verificar que no existiera algún microorganismo que pudiera intervenir en el experimento, el resultado fue negativo.



**Figura 12.** *S. enterica* en agar chrom ID Salmonella Elite.

Después de los 6 días de incubación a 4°C se realizó el análisis microbiológico de la carne que se inoculó intencionalmente. Los resultados se muestran en la **Tabla 18**.

**Tabla 18.** Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre *S. enterica* inoculada intencionalmente en carne.

Tratamiento	UFC/g $\pm \sigma$
<b>Ni</b>	$18 \times 10^4 \pm 19 \times 10^3$
<b>N<sup>a b</sup></b>	$12 \times 10^5 \pm 22 \times 10^4$
<b>L<sup>a b</sup></b>	$98 \times 10^4 \pm 95 \times 10^3$
<b>P<sup>a b</sup></b>	$14 \times 10^5 \pm 25 \times 10^4$
<b>PA</b>	$49 \times 10^4 \pm 31 \times 10^3$

**Ni:** Carne al tiempo 0. **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento. **L:** carne con plástico autoadherible egapack. **P:** biopelícula sin PE. **PA:** Biopelícula Activa. **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n= 3** repeticiones.  **$\sigma$ :** Desviación estándar. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos, con  $\alpha= 0.05\%$ .

Se observa que el mayor crecimiento se da para el tratamiento P ya que *S. enterica* es un microorganismo anaerobio facultativo (Ricke *et al.*, 2013), sin embargo, debido a su amplia capacidad por adaptarse al medio, también crece bien en condiciones aerobias (Li *et al.*, 2013), por lo que al hacer el análisis estadístico se observa que no existe diferencia significativa entre N, L y P. Se observa diferencia significativa entre Ni y N debido a que algunas cepas de *Salmonella* son capaces de crecer en alimentos almacenados entre 2°C y 4°C (Li *et al.*, 2013). Con respecto al tratamiento con PA, se observa que es mayor que Ni, pero un ciclo logarítmico menor que N, esto nos sugiere que los compuestos inmovilizados en PA tienen actividad antibacteriana contra este microorganismo. De acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014 *Salmonella* sp. debe estar ausente en 25 g de alimento.

Aguillón en el 2018 evaluó en carne molida de res dos películas a base de quitosano una con ácido láctico y otra con polietilenglicol y ácido láctico, las cuales redujeron más de uno y dos ciclos logarítmicos respectivamente la cantidad de *S. typhimurium*, después de 6 días de incubación a 4°C. Al comparar con las películas que reportó Aguillón se observó que la biopelícula elaborada en el grupo de trabajo tiene la misma eficacia que la película de quitosano con ácido láctico; sin embargo, es menos eficiente que la segunda película que tiene también adicionado polietilenglicol.

### **8.3.5 Evaluación de la PA contra *Pseudomonas aeruginosa*.**

#### **8.3.5.1 Elaboración de la PA para su evaluación contra *P. aeruginosa*.**

En la **Tabla 19** se muestra la determinación de proteína por el método de Bradford, para la elaboración de la PA, que se utilizó para la evaluación contra *P. aeruginosa*.



**Tabla 20.** Efecto de la aplicación de los tratamientos sobre *P. aeruginosa* en carne inoculada intencionalmente.

Tratamiento	UFC/g $\pm \sigma$	n
<b>Ni<sup>c</sup></b>	58x10 <sup>4</sup> $\pm$ 30x10 <sup>3</sup>	3
<b>N<sup>a c</sup></b>	75x10 <sup>4</sup> $\pm$ 73x10 <sup>3</sup>	4
<b>L<sup>b</sup></b>	93x10 <sup>4</sup> $\pm$ 13x10 <sup>4</sup>	4
<b>P<sup>a b</sup></b>	91x10 <sup>4</sup> $\pm$ 14x10 <sup>4</sup>	3
<b>PA<sup>c</sup></b>	65x10 <sup>4</sup> $\pm$ 63x10 <sup>3</sup>	4

**Ni:** Carne al tiempo 0. **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento. **L:** carne con plástico autoadherible egapack. **P:** biopelícula sin PE. **PA:** Biopelícula Activa. **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **n=**Repeticiones.  **$\sigma$ :** Desviación estándar. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencia significativa entre ellos, con  $\alpha= 0.05\%$ .

Se observa que PA no mostró actividad antibacteriana con respecto a los tratamientos N y Ni, ya que al hacer el análisis estadístico no hay diferencia significativa. Cabe resaltar que P y PA son estadísticamente diferentes, se observa que PA tiene una cuenta menor que P, si los compuestos que se encuentran inmovilizados en PA no tuvieran efecto sobre este microorganismo las UFC tendrían que ser similares. *P. aeruginosa* utiliza al glicerol como fuente de carbono (Oxoid, 2018), por esta razón no se observa diferencia entre PA y N, Ni. Los compuestos presentes en la película sí tienen efecto sobre el microorganismo; sin embargo, el consumo de glicerol por parte de este microorganismo evita que sea significativo, por lo que el efecto de esta película contra *P. aeruginosa* no es significativo.

#### 8.4 Resumen del conteo en placa de cada microorganismo evaluado.

En la **Tabla 21** se muestra el resumen del conteo en placa de la microbiota presente en la carne evaluada como mesófilos aerobios, coliformes totales y coliformes fecales se observa que en las tres formas de evaluar la aplicación de la PA sobre la microbiota se reducen ciclos logarítmicos las cantidad de microorganismos presentes en la carne por lo que la película presenta una alternativa para disminuir la carga microbiológica y de esta manera usarse como envase en carne de res.

**Tabla 21.** Resumen de la aplicación de los tratamientos sobre la microbiota presente de manera inicial en la carne.

Microorganismo	Tratamiento	UFC/g	Proteína <i>μg de proteína</i> <i>cm<sup>2</sup> de película</i>	Influencia de PA		
Mesófilos aerobios	N	18x10 <sup>8</sup>	58.7	+++		
	PA	34x10 <sup>5</sup>				
Coliformes totales	N	73x10 <sup>4</sup>		58.7	++	
	PA	13x10 <sup>3</sup>				
Coliformes fecales	N	20x10 <sup>2</sup>			58.7	+++
	PA	14x10 <sup>1</sup>				

**Ni:** Carne al tiempo 0 **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento **L:** carne con plástico autoadherible Egapack **P:** biopelícula sin PE **PA:** Biopelícula Activa **UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne.

En la **Tabla 22** se muestra el resumen de los resultados de la cuenta en placa de los 5 microorganismos inoculados intencionalmente en carne después de la aplicación de PA por 6 días. En la **Tabla 22** se observa que la presencia de la PA actuó como bactericida para el caso de *L. monocytogenes* en donde las UFC redujeron 1 ciclo logarítmico comparadas con el tratamiento N. Al observar la **Figura 14**, donde se presenta un zimograma contra *L. monocytogenes* en el carril 3, se hace más claro el porqué del efecto bactericida de PA sobre este microorganismo ya que se observan alrededor de distintas bandas de actividad lítica, en donde la banda de 14 kDa corresponden a la bacteriocina AS-48 y las restantes a PGHs presentes en el extracto (Robles, 2019), para este

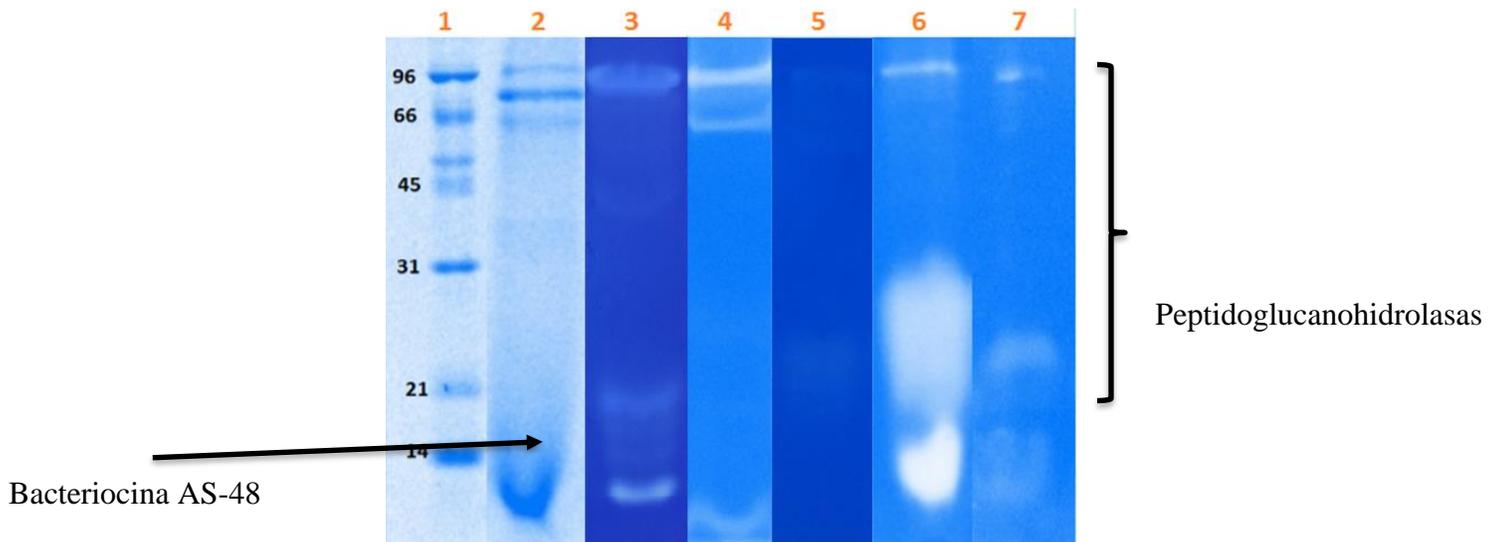
microorganismo se evidenció el efecto de sinergia producido por las PGHs que degradan el peptidoglucano presente en la pared celular, en conjunto con la bacteriocina AS-48 a la que le es más fácil llegar a la membrana celular y hacer poros (Maliniová *et al.*, 2010; Cotter *et al.*, 2013). Para el caso de *S. aureus* no se observó efecto antimicrobiano, lo cual corresponde con lo visto en la Figura 14 puesto que no se observan bandas de lisis y Grande *et al.*, 2014 reporta que la Bacteriocina AS-48 no era efectiva para este microorganismo.

El efecto de los compuestos antimicrobianos inmovilizados en PA sobre los microorganismos Gram - se muestran en la **Tabla 22**, ya que hubo una disminución de al menos un ciclo logarítmico en las UFC/g de cada microorganismo, esto también se muestra en la **Figura 14** en donde en los carriles 4 y 5 se muestran zimogramas contra *S. enterica* y *Y. enterocolitica*, se observan bandas de lisis donde la banda cercana a 14 kDa corresponde a la bacteriocina AS-48 y las restantes corresponden a PGHs. En las bacterias Gram - las bacteriocinas entra al interior de la célula por medio de porinas que les ayudan a atravesar la membrana externa e interna afectando el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos (Cotter *et al.*, 2013).

**Tabla 22.** Resumen de la aplicación de los tratamientos en cada microorganismo evaluado.

Microorganismo	Tratamiento	UFC/g	Proteína $\frac{\mu\text{g de proteína}}{\text{cm}^2 \text{ de película}}$	Influencia de PA
<i>L. monocytogenes</i>	N	20x10 <sup>4</sup>	53.99	+++
	PA	50x10 <sup>3</sup>		
<i>S. aureus</i>	N	76x10 <sup>4</sup>	63.19	-
	PA	11x10 <sup>5</sup>		
<i>Y. enterocolitica</i>	N	28x10 <sup>9</sup>	48.99	++
	PA	84x10 <sup>7</sup>		
<i>S. enterica</i>	N	12x10 <sup>5</sup>	49.60	+
	PA	49x10 <sup>4</sup>		
<i>P. aeruginosa</i>	N	75x10 <sup>4</sup>	59.43	+/-
	PA	65x10 <sup>4</sup>		

**Ni:** Carne al tiempo 0 **N:** Carne sin ningún tipo de recubrimiento **L:** carne con plástico autoadherible Egapack **P:** biopelícula sin PE **PA:** Biopelícula Activa  
**UFC/g:** Unidades formadoras de colonias por gramo de carne. **Proteína:** microgramos de proteína/ centímetros cuadrados de proteína.



**Figura 14.** SDS-PAGE, carril 1, marcador de peso molecular, carril 2 perfil proteínico del PE, tinción con azul de Coomasie, Zimogramas de actividad lítica, carriles 3 a 7, contra *L. monocytogenes*, *S. enterica*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica* y *Micrococcus lysodeikticus*, respectivamente (Tomada y modificada de Robles, 2019)

Con los resultados mostrados en la **Tabla 23** y **Figura 14** se sustenta la sinergia que existe entre la Bacteriocina AS-48 y las PGHs presentes en PE, esto es importante puesto que no habría que purificar PE y con esto aumentar costos en la producción de PE a escala industrial.

## 6. Aspectos económicos en la producción de la biopelícula activa.

Después de la realización de los experimentos correspondientes y una vez demostrada la actividad antibacteriana de la película activa sobre diversos microorganismos evaluados en carne de res es importante pensar en el objetivo a

largo plazo de este trabajo, la aplicación de esta biopelícula en la industria, para alargar la vida de anaquel y disminuir la cantidad de enfermedades causadas por microorganismos causantes de ETAs. Como primer paso se investigó el costo de las materias primas que se utilizaron para elaborar la película activa y la cantidad que se utilizaría para elaborar 1  $m^2$  de película (**Tabla 23**).

**Tabla 23.** Materias primas y costo para la realización de la biopelícula activa

<b>Materia prima</b>	<b>Costo por kilo</b>	<b>Cantidad para <math>1m^2</math></b>	<b>Aporte en el costo de elaboración</b>
Almidón	\$27	0.075 kg	\$ 2
Glicerol	\$334	0.06 kg	\$20.04
Amortiguador de fosfatos pH 7	\$176	170 mL	\$29.30
Agua destilada	\$27.5	1.175 kg	\$32.31
Caldo BHI	\$6770.68	0.0648 kg	\$438.40
<b>Total</b>			<b>\$522.05</b>

En la **Tabla 23** se observa que la materia prima que más impacta en el costo de la elaboración de la biopelícula es el medio comercial, este medio se utiliza para producir los compuestos antibacterianos durante la fermentación. Para hacer competitiva la película en el mercado se deben disminuir los costos, lo cual se lograría sustituyendo el medio comercial de crecimiento de la bacteria con otro medio menos costoso. Se ha reportado la utilización de líquido de remojo de maíz (Tellez *et al.*, 2003) y mezcla de leche pasteurizada con triptona (Telke *et al.*, 2019), para el crecimiento de BAL que producen bacteriocinas. Otra alternativa podría ser la expresión heteróloga en una bacteria recombinante (Serrano, 2019).

## 7. Conclusiones.

Al aplicar la biopelícula con la actividad antibacteriana inmovilizada de *Enterococcus faecalis* FAIR E-77 sobre la carne de res fresca se logró mejorar su calidad microbiológica, a través de la disminución significativa ( $\alpha= 0.05\%$ ) de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, de esta manera, después de 6 días de almacenamiento a 4°C.

Esta biopelícula funcional también mostró actividad antibacteriana contra el desarrollo de microorganismos transmitidos por alimentos como *Y. enterocolitica*, *S. enterica* y *L. monocytogenes*. Actividad bacteriostática para los dos primeros y bactericida para el último.

De esta manera, la aplicación de PA, después de 6 días a una temperatura de 5 °C, contribuyó de manera significativa en la inocuidad de la carne. además, mostró mejores resultados que el empaque primario comercial que se utiliza para este producto.

## 8. Perspectivas

- Evaluar las características sensoriales de la carne con los diferentes tratamientos a lo largo del periodo de incubación.
- Evaluar la viabilidad e impacto en la industria cárnica de la biopelícula, además de optimizar y escalar su producción-
- Ampliar la cantidad de microorganismos de importancia en alimentos con la que es evaluada la biopelícula funcional, por ejemplo, *Campylobacter jejuni*.
- Determinar la funcionalidad de la biopelícula funcional en otro tipo de carne y/o productos derivados, así como su efecto sinérgico con otras técnicas de conservación de carne, tales como envasado al vacío y atmósferas modificadas.
- Evaluar la actividad antibacteriana de la biopelícula funcional en otro punto de la cadena de abasto de la carne.

## 9. Bibliografía

- 3M, 2007. Placas Petrifilm™ Staph Express para Recuento de *Staphylococcus aureus* [En línea] (Enero 2007). Disponible en <https://multimedia.3m.com/mws/media/467012O/3mpetrifilmstaphexpressinterpretation-guidespanish.pdf> [Último acceso Diciembre 28, 2018].
- 3M, 2006. Placas Petrifilm para el recuento de *E. coli*/coliformes, Guía de interpretación. [En línea] (Enero 2006). Disponible en <https://multimedia.3m.com/mws/media/444950O/3m-petrefilm-e-coli-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf> [Último acceso Noviembre 11, 2018]
- Abriouel, H., Maqueda, M., Galvez, M. & Valdivia A. (2002). Inhibition of Bacterial Growth, Enterotoxin Production, and Spore Outgrowth in Strains of *Bacillus cereus* by Bacteriocin AS-48. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (3), 1473-1477.
- Aguillón, A. 2018. Preparación y caracterización de películas a base de quitosano entrecruzado con ácido láctico, aplicado en la conservación de carne cruda. Tesis que para obtener el grado de Química de Alimentos.
- Ahn, D., Lee, E. & Mendonca, A. 2006. Meat Decontamination by Irradiation. En: Nollet, L. & Toldrá F. eds. *Advanced Technologies for meat processing*. CRC Taylor & Francis, capítulo 7.
- Amal, A., Seham, A. & Marouf, A. (2014). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and its toxins in some meat products. *Global Journal of Agricultural and Food Safety Sciences*, 1, 39-50.
- Appendini, P. & Hotchkiss, H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126.
- BioMérieux. *chromID™ Salmonella Agar*. [En línea]. Disponible en: [https://www.mediray.co.nz/media/15758/om\\_biomerieux\\_reagents\\_ot-04920\\_package\\_insert-04920.pdf](https://www.mediray.co.nz/media/15758/om_biomerieux_reagents_ot-04920_package_insert-04920.pdf) [Último acceso Noviembre 23, 2018].
- Bosques, E. & Colina, M. 1999. *Fundamentos y aplicaciones del procesamiento térmico de frutas y hortalizas*, UAM, México.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B. & Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos*. Segunda Edición. Facultad de Química UNAM. 6-38.
- Carrillo, L., Audisio, C., Bejarano, N. Gómez, S., Ancasi, G. & Benítez M. 2007. *Manual de Microbiología de los Alimentos*. San Salvador de Jujuy. 112- 116.
- Consejo Mexicano de la Carne, 2016. *Consumo y demanda de la carne*. [En

línea] (Mayo, 2016). Disponible en: <http://comecarne.org/wp-content/uploads/2018/05/2.4-Consumo-y-Demanda.pdf> Último acceso Noviembre 2, 2018.

- Cotter, P., Hill, C. & Ross, P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Cotter, P., Ross, D. & Hill, C. (2013). Bacteriocins. A viable alternative to antibiotics? *Nature Review Microbiology*, 11.
- De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 13, 194–199
- Donnelly, C. & Diez, F. *Listeria monocytogenes*. En: Labbé, R. & García, S. *Guide to Foodborne Pathogens* eds. Segunda edición. Wiley Blackwell. Capítulo 3.
- Fagundes, H., Barchesi, L., Filho, A., Ferreira, L., & Oliveira, A. (2010). Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. *Brazilian Journal of microbiology*, 41(2), 376–380
- FIRA, 2017. *Panorama Agroalimentario: Carne de Bovino*. [En línea] (2017). Último acceso Enero 3, 2019. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama\\_Agroalimentario\\_Carne\\_de\\_bovino\\_2017\\_\\_1\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017__1_.pdf)
- Galván, A., Rosales, A. & Díaz, J. (2011). Estudio comparativo sobre los microorganismos presentes en la carne molida proveniente de una cadena de supermercados y mercados del Municipio de Ecatepec. *Nacameh*, 5(1), 1-9.
- García, T., Martín, R., Sanz, B. & Hernández, E. (1995). Extensión de la vida útil de la carne fresca envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas. *Revista Española Ciencia y Tecnología*, 35 (1), 1-18.
- González, H., Mesa, G. & Quintero C. (2014). Estimación de la vida útil de almacenamiento de carne de res y de cerdo con diferente contenido graso. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 21 (3), 201-210.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J., Christensen, A. & Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 79-97.
- Grande, M., Pérez, R., López, M., Gálvez, A. & Lucas, R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 22706-22727.

- Guillet, C., Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer, M., Bielecka, M., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez, J., Lortholary, O. & Lecuit, M. (2010). Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging infectious Diseases*, 16(1), 136–138.
- Han, J. 2000. *Antimicrobial food packaging*. En: Ahvenainen, R. *Novel food packaging techniques*. Cambridge: CRC Press. Capítulo 4.
- Heredia, N. & García, S. (2018). *Animal as sources of food-borne pathogens: A review*. *Animal Nutrition*, 4, 250-255.
- Heredia, N., Dávila, J., Solis, L. & García, S. (2014) Productos cárnicos: Principales patógenos y estrategias no térmicas de control. *Nacameh, Ciencia y Tecnología de la Carne*, 8 (1), 20-42.
- Hernández, A., Alfaro, I. & Arrieta, R. 2003. *Microbiología Industrial*. San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia. 47-49.
- Higuera, L., López, G., Hernández, P., Gavara, R. Rollini, M. (2013). Development of a novel antimicrobial film based on chitosan with LAE (ethyl-N $\alpha$ -dodecanoyl-L-arginate) and its application to fresh chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 339-345.
- Hugas, M., Garriaga, M. & Monfort, J. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.
- Huss, H., 1998. *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. Copenhague: FAO. 15.
- Irkin, R. & Esmer, O. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobials agents. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (10).
- Jay, J., Loessner, M. & Golden, D. 2005. *Modern Food Microbiology*. Séptima edición. Nueva York: Springer. 473-476.
- Jiménez, M., Chaidez, C. & León, J. (2012). Calidad microbiológica de carne de res comercializada en el mercado municipal de Culiacán, Sinaloa. *Revista Veterinaria México*, 43 (4), 273-284.
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. & Gutiérrez, G. (2009) *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma.
- Kurpas, M., Wiczorek, K. & Osek, J. (2018). Ready-to-eat meat products as source of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Veterinary Research*, 61, 49-55.

- Latiful, B., Anwar, M., Isshiji, K. & Ukuku., D. (2011). Review Article: Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *Journal of Pathogens*, 2011, 13.
- Li, H., Wang, H., D'Aoust, J. & Maurer, J. *Salmonella* Species. En Doyle, M & Buchanan, R., eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Cuarta edición: Washington: American Society for Microbiology. Capítulo 10.
- Malinicová, L., Píknová, M., Pristas., P. & Javorsky. (2010). Peptidoglycan hydrolases as novel tool for anti-enterococcal therapy. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.
- MCDLab. *Ficha técnica de agar bilis y rojo violeta*. [En línea]. Disponible en: <http://www.mcclab.net/Fichas%20Tecnicas/Agar%20Bilis%20y%20Rojo%20Violeta.pdf> Último acceso Noviembre 21, 2018
- McDonald, K. & Sun W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1-27
- Milena, S., Suárez, H. & Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por Bacterias Ácido Lácticas en la conservación de carne. *Revista chilena de nutrición*, 36 (1), 64-71.
- Montville, T., & Matthews, K. (2013). *Physiology, Growth, and Inhibition of Microbes in Foods*. En Doyle, M & Buchanan, R. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Cuarta edición: Whashington: American Society for Microbiology. Capítulo 1.
- Moreira, M., Pereda, M., Marcovich, N. and Roura, S. (2011). Antimicrobial Effectiveness of Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan and Casein Polymers: Assessment on Carrot, Cheese, and Salami. *Journal of Food Science*, 76 (1), 54-63.
- Moreno, B., 2006. *Higiene e inspección de carnes, Volumen I*. España: Díaz de Santos. 507.
- NOM-009-Z00-1994, Proceso sanitario de la carne.
- NOM-034-SSA1-1993, bienes y servicios. Productos de la carne. Carne molida y carne molida moldeada. Envasadas. Especificaciones sanitarias.
- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

- NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Norma Oficial Mexicana. México.
- NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
- NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
- NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Normanno, G., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N., Corrente, M., Parisi, A., Santagada, G., Firinu, A., Crisseti, E. & Celano, G. (2007). Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 290-296.
- Ordoñez, J. & De la Hoz, L. (1999). Carnes, pescados y huevos. En: Hernández, M & Sastre, A. eds. *Tratado de nutrición*. Madrid: Díaz de Santos. Capítulo 23.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2014. *Producción y Sanidad animal: Carne y productos cárnicos*. [En línea] (Noviembre, 2014). Último acceso mayo 20, 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/aq/againfo/themes/es/meat/background.html>
- Organización Mundial de la Salud, 2015. *Carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria: estimaciones de la OMS*. [En línea]. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/areas\\_work/foodbornediseases/fergonepaper\\_es.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodbornediseases/fergonepaper_es.pdf?ua=1) Último acceso mayo 19, 2018
- Oxoid Microbiology Products. 2018. *PALCAM Agar Base*. [En línea] (Noviembre, 2018). Disponible en: [http://www.oxoid.com/UK/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=CM0877&c=UK&lang=EN](http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0877&c=UK&lang=EN)- Último acceso Noviembre 23, 2018.
- PAHO/ WHO, 2015. *Peligros biológicos: Inocuidad de Alimentos*. [En línea]. Disponible en: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=en) Último acceso Noviembre 19, 2018.

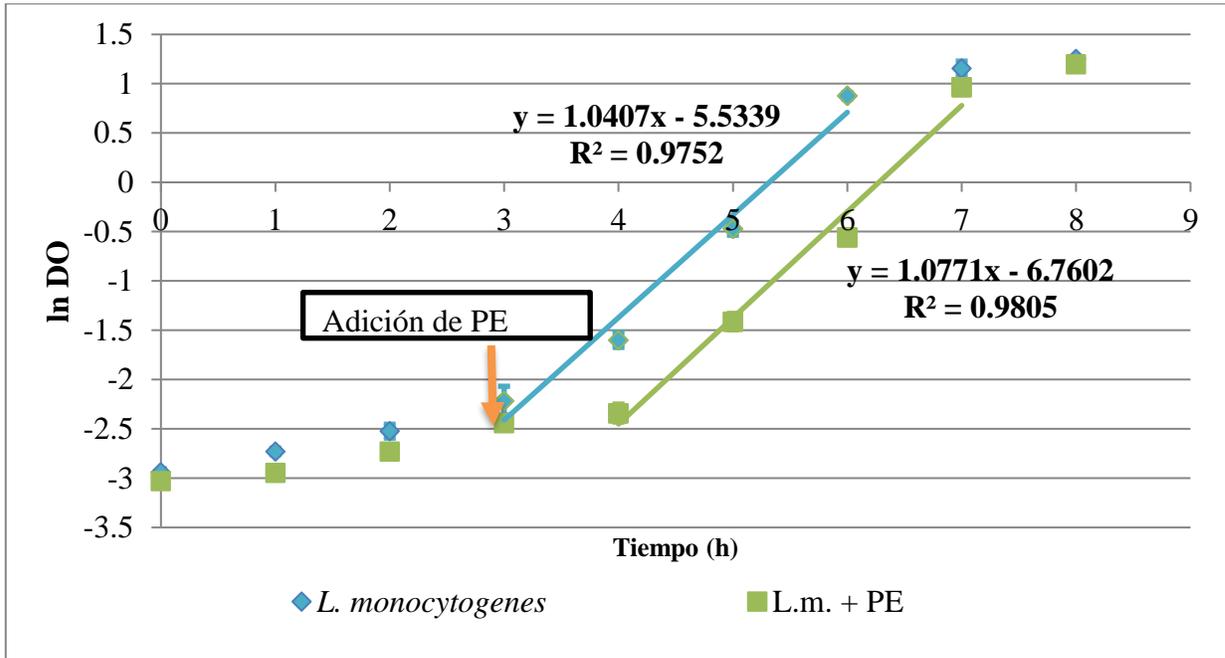
- Padgett, T., Han, I. & Dawson, P. (1998). Incorporation of Food-Grade Antimicrobial Compounds into Biodegradable Packaging Films. *Journal of Food Protection*, 61 (10), 1330-1335.
- Pérez, C. 2012. *Empaques y embalajes*. Estado de México. 10,11.
- Pérez, M., Guerrero, I. & Ponce, E. (2008). Detección de microorganismos patógenos e indicadores en carne de bovino que se expende en supermercados de la Ciudad de México. *Nacameh*, 2 (2), 188-194.
- Quintavalla, S. & Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Raftari, M., Azizi, F., Abdulmir, A., Son, R., Sekawi, Z. & Fatimah, A. (2009). Effect of Organic Acids on Escherichia coli O157: H7 and Staphylococcus aureus Contaminated Meat. *The Open Microbiology Journal*, 3, 121-127.
- Ravishankar, S., Jaroni, D., Zhu, L., Olsen, C., McHugh, T. & Friedman, M. (2012). Inactivation of Listeria monocytogenes on ham and bologna using pectin-based apple, carrot, and hibiscus edible films containing carvacrol and cinnamaldehyde. *Journal of Food Science*, 77, (7), 377–382.
- Reséndiz, V., Ramírez, J. Guerrero, I. & Cruz, R. (2013). Empaque para la conservación de carne y productos cárnicos. *Agroproductividad*. 10-16.
- Ricke, S., Koo, O., Foley, S. & Nayak, R. (2013). Salmonella. En: Labbé, R. & García, S. *Guide to Foodborne Pathogens*. Segunda edición. Wiley Blackwell.
- Robins, R. 2013. *Yersinia enterocolitica*. En Doyle, M & Buchanan, R. eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Cuarta edición: Washington: American Society for Microbiology. Capítulo 14.
- Robles, T. 2019. Elaboración de una película activa utilizando compuestos antibacterianos producidos por *enterococcus* spp. Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Facultad de Química, UNAM.
- Rocha, M., Ferreira, F., Souza, M. & Precentice, C. (2013). *Antimicrobial films: a review*. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 23-31.
- Rodríguez, R., Rojo, G., Martínez, R., Piña, H., Ramírez, B., Vaquera, H. & Cong, M. (2014). Envases inteligentes para la conservación de alimentos. *Ra Ximhai*, 151-173.
- Rubio, M., Braña, D. & Méndez, R., 2012. *Carne de res mexicana*. México: SAGARPA. 7-9.

- Ryser, E. & Buchanan, R. 2013. *Listeria monocytogenes*. En Doyle, M & Buchanan, R. eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Cuarta edición: Washington: American Society for Microbiology. Capítulo 20.
- SAGARPA & SIAP, 2018. *Atlas agroalimentario 2012-2018*. 172
- Sánchez, I., García, B., Santos, E., Amaro, A., Barboza, J. & Regalado, C. (2014). Review Article: Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. *The Scientific World Journal*, 18.
- Sánchez, M., Montalbán, M., Cebrián, R., Valdivia, E., Martínez, M. & Maqueda, M. (2011). AS-48 bacteriocin: close to perfection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 2845-2857.
- Santos, J., Sousa, R., Otoni, C., Moraes, A., Souza, V., Medeiros, E., Espitia, P., Pires, A., Coimbra, J. & Soares, N. (2018). Nisin and other antimicrobial peptides: Production, mechanisms of action, and application in active food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 48, 178-194.
- Science.gov. 1999. *Sample records for chromogenic agar media*. [En línea]. Disponible en: <https://www.science.gov/topicpages/c/chromogenic+agar+media.html>. Último acceso Noviembre 24, 2018.
- Seo, K. & Bohach, G. 2013. *Staphylococcus aureus*. En Doyle, M & Buchanan, R. eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Cuarta edición: Washington: American Society for Microbiology. Capítulo 21.
- Serrano, C., García, I., González, A., Ruiz, E., Elizalde, J. & Quirasco, M. (2018). *Cloning and Characterization of a Novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28, 14-27.
- Serrano, C. (2019) Expresión de la enterocina a en una cepa de *enterococcus faecalis* para mejorar su capacidad antibacteriana. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Química, UNAM.
- Sofos, J., Flick, G., Nychas, G., O' Bryan, C., Ricke, S. & Crandall, P. 2013. Meat, Poultry, and Seafood. En Doyle, M & Buchanan, R. eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Cuarta edición: Washington: American Society for Microbiology. Capítulo 6.
- Sung, S., Sin, L., Tee, T., Bee, S., Rahmat, A., Rahman, W., Tan, A. & Vikhraman. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 110-123.
- Szabo., E. & Cahill, M. (1998). The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria*

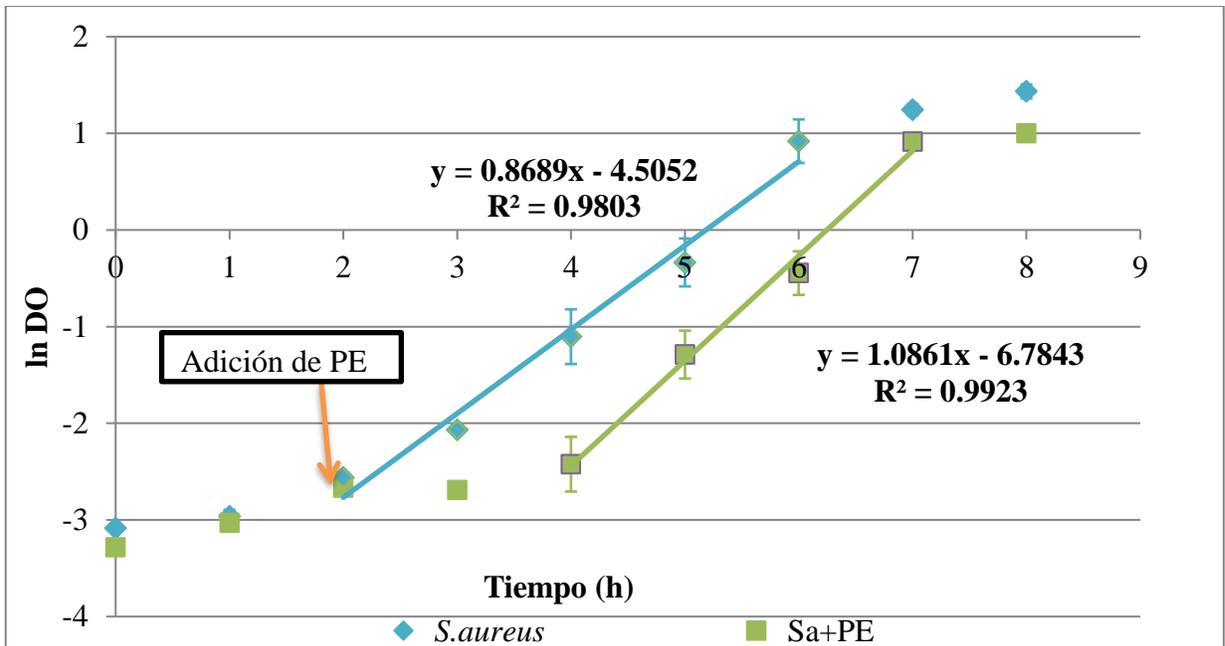
- monocytogenes*. *International Journal Food Microbiology*, 43(1-2):21-31
- Telke, A. A., Ovchinnikov, K. V., Vuoristo, K. S., Mathiesen, G., Thorstensen, T., & Diep, D. B. (2019). Over 2000-Fold Increased Production of the Leaderless Bacteriocin Garvicin KS by Increasing Gene Dose and Optimization of Culture Conditions. *Frontiers in microbiology*, 10, 389.
  - Uehara, T. & Bernhardt, T. (2011). More than just lysins: peptidoglycan hydrolases tailor the cell wall. *Current opinion in Microbiology*, 4 (6):698-703.
  - Unalan, I., Korel, F. & Yemenicioglu, A. (2011). Active packaging of ground beef patties by edible zein films incorporated with partially purified lysozyme and Na<sub>2</sub>EDTA. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1289-1295.
  - Varela, G., Beltrán, B., Cuadrado, C., Moreiras, O., Ávila, J., Cerdeño, A., & Ruiz, A., 2001. *La carne de vacuno en la alimentación humana*. Fundación Española de la Nutrición.
  - Vásquez, S., Suárez, H. & Montoya, O. (2009). Efecto del extracto crudo de bacteriocinas sobre las características microbiológicas y sensoriales de solomo redondo (*Longissimus dorsi*) empacado al vacío. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 16, 2, 191-200.
  - Worapayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swerwiwathana, A., Benjakul, S. & Visessenguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, 120, 118-132.
  - Zendejas, G., Avalos, H. & Soto, Y. (2014) Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25, 129-143.

**Anexo I. Cinéticas de Crecimiento de microorganismos de interés en la inocuidad alimentaria de Alimentos evaluadas contra el Preparado Extracelular (PE).**

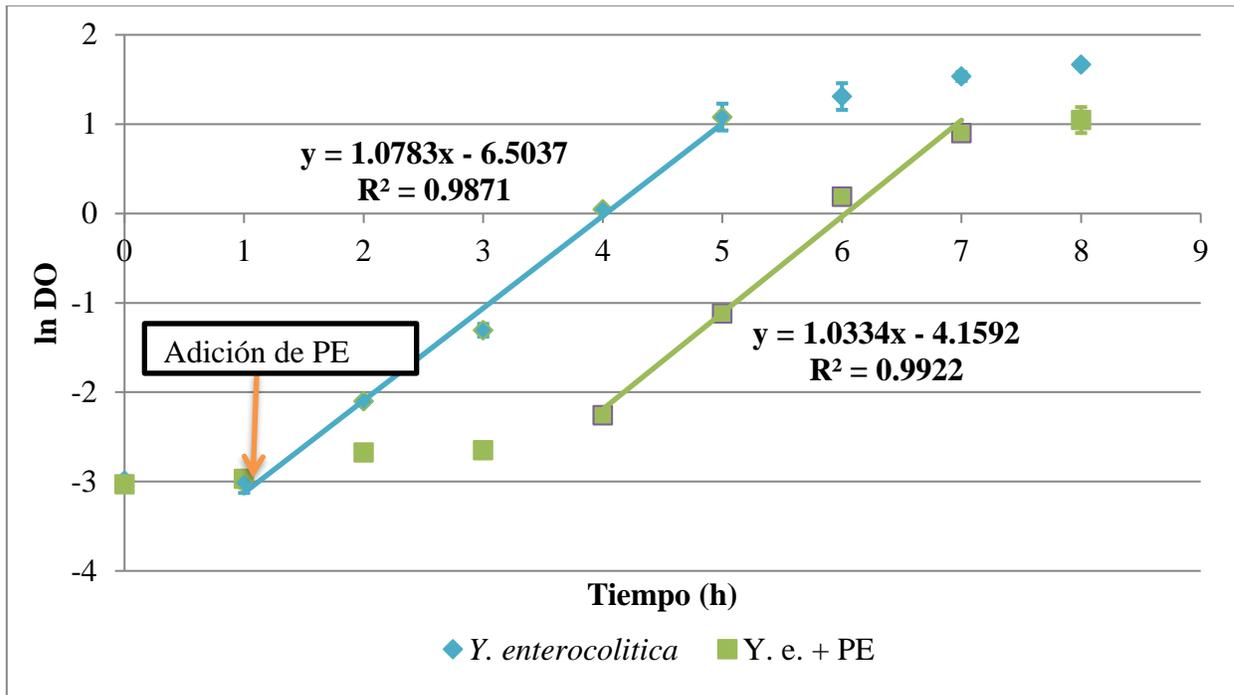
**Figura 15.** Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* contra el PE



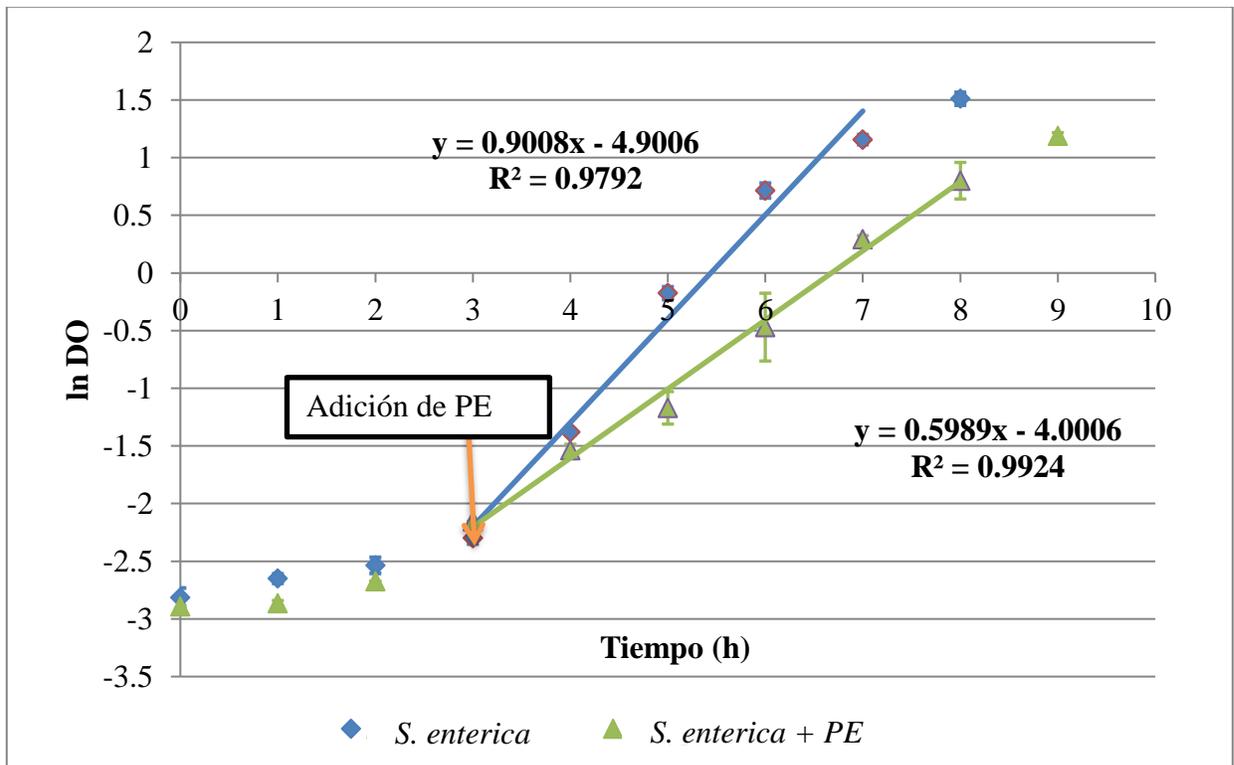
**Figura 16.** Cinética de crecimiento de *S. aureus* contra el PE.



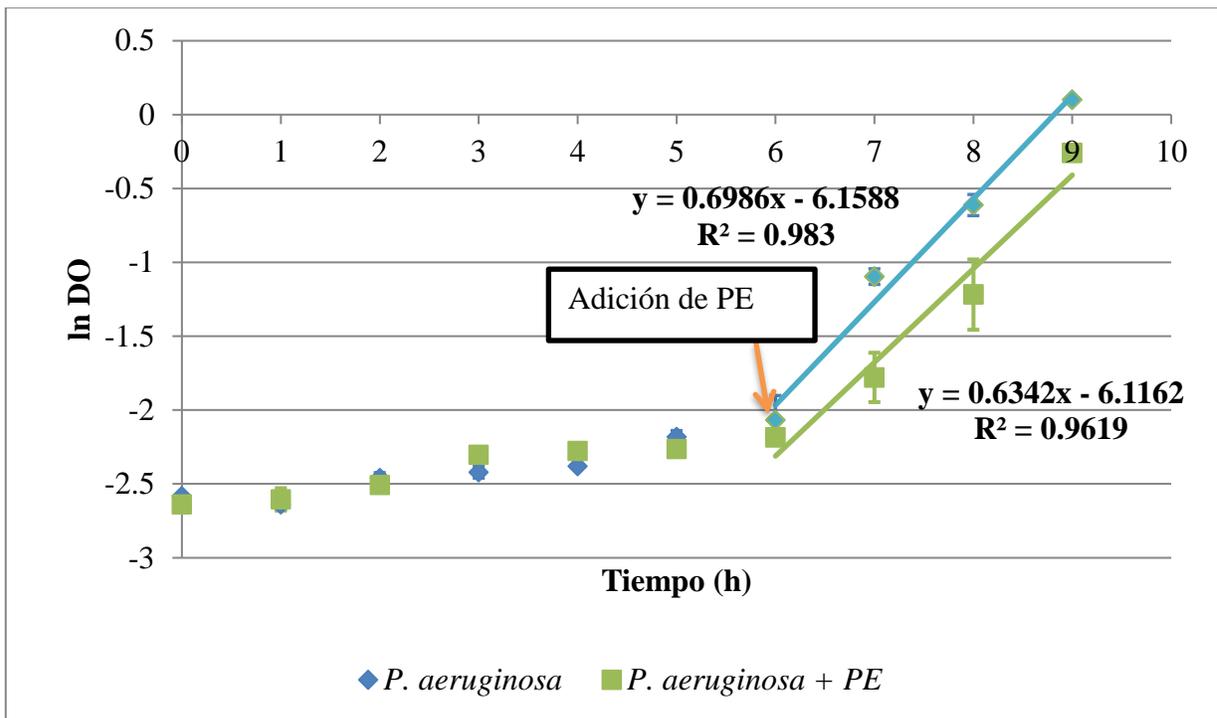
**Figura 17.** Cinética de crecimiento de *Y. enterocolitica* contra el PE.



**Figura 18.** Cinética de crecimiento de *S. enterica* contra el PE.



**Figura 19.** Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* contra el PE.



**ANEXO II. Análisis de Varianza y Diferencia Mínima Significativa (DMS) de la cuenta en placa de los distintos microorganismos evaluados.**

**Mesófilos aerobios.**

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales. H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 24.** Análisis de Varianza para mesófilos aerobios.

<b>SUMA CUAD</b>	9.87E+18	<b>FC</b>	1.72E+18	<b>ALPHA</b>	0.05	
<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>T</sub></b>	<b>PROB</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>	8.15E+18	4	2.04E+18	3.42E+04	2.93	1.19E-34
<b>ERROR</b>	1.07E+15	18	5.96E+13		<b>[H1]</b>	
<b>TOTAL</b>	8.15E+18	22				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 25.** DMS para mesófilos aerobios.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ERROR ESTÁNDAR</b>		
<b>Ni</b>	1.26E+05	3.15E+06		
<b>N</b>	1.81E+09	4.46E+06		
<b>L</b>	9.97E+07	3.15E+06		
<b>P</b>	6.63E+07	3.86E+06		
<b>PA</b>	1.72E+06	3.86E+06		
			<b>Tt</b>	2.10092 2
<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>S<sub>COMP</sub></b>	<b>DMS</b>	<b>0.05</b>
<b>μP - μNi</b>	6.61E+07	4.98E+06	1.05E+07	H1
<b>μP - μPA</b>	6.45E+07	5.46E+06	1.15E+07	H1
<b>μN - μP</b>	1.74E+09	5.90E+06	1.24E+07	H1

$\mu L - \mu P$	3.34E+07	4.98E+06	1.05E+07	H1
$\mu L - \mu Ni$	9.95E+07	4.46E+06	9.36E+06	H1
$\mu L - \mu PA$	9.80E+07	4.98E+06	1.05E+07	H1
$\mu N - \mu L$	1.71E+09	5.46E+06	1.15E+07	H1
$\mu N - \mu Ni$	1.81E+09	5.46E+06	1.15E+07	H1
$\mu N - \mu PA$	1.80E+09	5.90E+06	1.24E+07	H1
$\mu PA - \mu Ni$	1.59E+06	4.98E+06	1.05E+07	H0

### Coliformes totales

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$ .

**Tabla 26.** Análisis de Varianza para coliformes totales.

<b>SUMA CUAD</b>	1.70E+12	<b>FC</b>	5.88E+11	<b>ALPHA</b>	0.05	
<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>T</sub></b>	<b>PROB</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>	1.12E+12	4.00	2.79E+11	1.94E+03	3.48	2.13E-14
<b>ERROR</b>	1.44E+09	10	1.44E+08		[H1]	
<b>TOTAL</b>	1.12E+12	14				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 27.** DMS para coliformes totales.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ERROR ESTÁNDAR</b>
<b>Ni</b>	3.47E+03	6.93E+03
<b>N</b>	7.33E+05	6.93E+03
<b>L</b>	1.42E+05	6.93E+03
<b>P</b>	9.90E+04	6.93E+03

<b>PA</b>	1.27E+04	6.93E+03		
			<b>Tt</b>	2.23
<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>S<sub>COMP</sub></b>	<b>DMS</b>	0.05
$\mu P - \mu Ni$	9.55E+04	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu P - \mu PA$	8.63E+04	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu N - \mu P$	6.34E+05	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu L - \mu P$	4.27E+04	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu L - \mu Ni$	1.38E+05	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu L - \mu PA$	1.29E+05	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu N - \mu L$	5.92E+05	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu N - \mu Ni$	7.30E+05	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu N - \mu PA$	7.21E+05	9.80E+03	2.18E+04	H1
$\mu PA - \mu Ni$	9.27E+03	9.80E+03	2.18E+04	H0

### Coliformes fecales

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$ .

**Tabla 28.** Análisis de Varianza para coliformes fecales.

<b>SUMA CUAD</b>	1.35E+07	<b>FC</b>	8.08E+06	<b>ALPH A</b>	0.05	
<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>T</sub></b>	<b>PROB</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>	4.60E+06	4.00	1.15E+06	14.5	3.48	3.64E-04
<b>ERROR</b>	7.94E+05	10.0	7.94E+04		<b>[H1]</b>	
<b>TOTAL</b>	5.40E+06	14.0				

Como  $H_0$  Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 29.** DMS para coliformes fecales.

TRATAMIENTO	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR		
Ni	2.00E+02	1.63E+02		
N	1.67E+03	1.63E+02		
L	8.00E+02	1.63E+02		
P	8.67E+02	1.63E+02		
PA	1.37E+02	1.63E+02		
			<b>Tt</b>	2.23
<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>S<sub>COMP</sub></b>	<b>DMS</b>	<b>0.05</b>
$\mu P - \mu Ni$	6.67E+02	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu P - \mu PA$	7.30E+02	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu N - \mu P$	8.00E+02	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu P - \mu L$	6.67E+01	2.30E+02	5.13E+02	H0
$\mu L - \mu Ni$	6.00E+02	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu L - \mu PA$	6.63E+02	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu N - \mu L$	8.67E+02	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu N - \mu Ni$	1.47E+03	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu N - \mu PA$	1.53E+03	2.30E+02	5.13E+02	H1
$\mu Ni - \mu PA$	6.33E+01	2.30E+02	5.13E+02	H0

***Listeria monocytogenes.***

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$ .

**Tabla 30.** Análisis de Varianza para *Listeria monocytogenes*.

SUMA CUAD	1.08E+12	FC	7.97E+11	ALPHA	0.05	
FV	SC	GL	CM	F <sub>c</sub>	F <sub>T</sub>	PROB
TRATAMIENTOS	2.80E+11	4.00	6.99E+10	8.65E+01	3.48	1.03E-07
ERROR	8.08E+09	10.00	8.08E+08		[H1]	
TOTAL	2.88E+11	14.00				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 31.** DMS para *Listeria monocytogenes*.

TRATAMIENTO	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR		
Ni	1.35E+05	1.64E+04		
N	2.01E+05	1.64E+04		
L	3.40E+05	1.64E+04		
P	4.27E+05	1.64E+04		
PA	4.97E+04	1.64E+04		
			Tt	2.23
COMPARACIONES	DIFERENCIA	S <sub>COMP</sub>	DMS	0.05
$\mu P - \mu Ni$	2.92E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu P - \mu PA$	3.77E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu P - \mu N$	2.25E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu P - \mu L$	8.67E+04	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu L - \mu Ni$	2.05E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1

$\mu L - \mu PA$	2.90E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu L - \mu N$	1.39E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu N - \mu Ni$	6.67E+04	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu N - \mu PA$	1.52E+05	2.32E+04	5.17E+04	H1
$\mu Ni - \mu PA$	8.49E+04	2.32E+04	5.17E+04	H1

***Sthapylococcus aureus.***

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$ .

**Tabla 32.** Análisis de Varianza para *Sthapylococcus aureus*.

<b>SUMA CUAD</b>	1.70E+13	<b>FC</b>	1.53E+13	<b>ALPHA</b>	0.05	
<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>T</sub></b>	<b>PROB</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>	1.54E+12	4.00	3.86E+11	2.82E+01	3.11	1.44E-06
<b>ERROR</b>	1.91E+11	14.00	1.37E+10		[H1]	
<b>TOTAL</b>	1.73E+12	18.00				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 33.** DMS para *Sthapylococcus aureus*.

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ERROR ESTÁNDAR</b>		
<b>Ni</b>	3.27E+05	6.75E+04		
<b>N</b>	7.58E+05	5.85E+04		
<b>L</b>	1.02E+06	5.85E+04		
<b>P</b>	1.19E+06	5.85E+04		
<b>PA</b>	1.05E+06	5.85E+04		
			<b>Tt</b>	2.14

COMPARACIONES	DIFERENCIA	S <sub>COMP</sub>	DMS	0.05
μP - μNi	8.63E+05	8.93E+04	1.92E+05	H1
μP - μPA	1.45E+05	8.27E+04	1.77E+05	H0
μP - μN	4.33E+05	8.27E+04	1.77E+05	H1
μP - μL	1.70E+05	8.27E+04	1.77E+05	H0
μL - μNi	6.93E+05	8.93E+04	1.92E+05	H1
μPA - μL	2.50E+04	8.27E+04	1.77E+05	H0
μL - μN	2.63E+05	8.27E+04	1.77E+05	H1
μN - μNi	4.30E+05	8.93E+04	1.92E+05	H1
μPA - μ N	2.88E+05	8.27E+04	1.77E+05	H1
μPA - μNi	7.18E+05	8.93E+04	1.92E+05	H1

### *Yersinia enterocolitica*

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes. α=0.05%.

**Tabla 34.** Análisis de Varianza para *Yersinia enterocolitica*

SUMA CUAD	1.62E+22	FC	7.60E+21	ALPHA	0.05	
FV	SC	GL	CM	F <sub>c</sub>	F <sub>T</sub>	PROB
TRATAMIENTOS	8.52E+21	4.00	2.13E+21	4.84E+02	3.48	2.15E-11
ERROR	4.40E+19	10.00	4.40E+18		[H1]	
TOTAL	8.56E+21	14.00				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un α=0.05%

**Tabla 35.** DMS para *Yersinia enterocolitica*

TRATAMIENTOS	MEDIA	ERROR ESTÁNDAR		
Ni	2.60E+05	1.21E+09		
N	2.83E+10	1.21E+09		
L	6.51E+10	1.21E+09		
P	1.83E+10	1.21E+09		
PA	8.43E+08	1.21E+09		
			<b>Tt</b>	2.23
<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>S<sub>COMP</sub></b>	<b>DMS</b>	0.05
$\mu P - \mu Ni$	1.83E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu P - \mu PA$	1.74E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu N - \mu P$	1.01E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu L - \mu P$	4.68E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu L - \mu Ni$	6.51E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu L - \mu PA$	6.42E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu L - \mu N$	3.67E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu N - \mu Ni$	2.83E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu N - \mu PA$	2.75E+10	1.71E+09	3.82E+09	H1
$\mu PA - \mu Ni$	8.43E+08	1.71E+09	3.82E+09	H0

***Salmonella enterica***

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$ .

<b>SUMA CUAD</b>	1.58E+13	FC	1.23E+13	ALPHA	0.05	
<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>T</sub></b>	<b>PROB</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>	3.27E+12	4.00	8.16E+11	3.09E+01	3.36	6.25E-06
<b>ERROR</b>	2.90E+11	10.00	2.64E+10		[H1]	
<b>TOTAL</b>	3.56E+12	15.00				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 37.** DMS para *Salmonella enterica*

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ERROR ESTÁNDAR</b>		
<b>Ni</b>	1.75E+05	9.38E+04		
<b>N</b>	1.22E+06	8.12E+04		
<b>L</b>	9.83E+05	9.38E+04		
<b>P</b>	1.40E+06	9.38E+04		
<b>PA</b>	4.87E+05	9.38E+04		
			<b>Tt</b>	2.20
<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>S<sub>COMP</sub></b>	<b>DMS</b>	0.05
<b>μP - μNi</b>	1.23E+06	1.33E+05	2.92E+05	H1
<b>μP - μPA</b>	9.17E+05	1.33E+05	2.92E+05	H1
<b>μP - μN</b>	1.86E+05	1.24E+05	2.73E+05	H0
<b>μP - μL</b>	4.20E+05	1.33E+05	2.92E+05	H1
<b>μL - μNi</b>	8.09E+05	1.33E+05	2.92E+05	H1

$\mu L - \mu PA$	4.97E+05	1.33E+05	2.92E+05	H1
$\mu N - \mu L$	2.34E+05	1.24E+05	2.73E+05	H0
$\mu N - \mu Ni$	1.04E+06	1.24E+05	2.73E+05	H1
$\mu N - \mu PA$	7.31E+05	1.24E+05	2.73E+05	H1
$\mu PA - \mu Ni$	3.12E+05	1.33E+05	2.92E+05	H1

***Pseudomonas aeruginosa***

H<sub>0</sub>: Las medias de los tratamientos son iguales.

H<sub>1</sub>: Las medias de los tratamientos son diferentes.  $\alpha=0.05\%$ .

**Tabla 38.** Análisis de Varianza para *Pseudomonas aeruginosa*

<b>SUMA CUAD</b>	1.10E+13	<b>FC</b>	1.05E+13	<b>ALPHA</b>	0.05	
<b>FV</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F<sub>c</sub></b>	<b>F<sub>T</sub></b>	<b>PROB</b>
<b>TRATAMIENTOS</b>	3.22E+11	4	8.06E+10	8.8549489	3.1791170	1.12E-03
<b>ERROR</b>	1.18E+11	13	9.10E+09		[H1]	
<b>TOTAL</b>	4.41E+11	17				

Como H<sub>0</sub> Se rechazó se realizó DMS como prueba a posteriori con un  $\alpha=0.05\%$

**Tabla 39.** DMS para *Pseudomonas aeruginosa*.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIA</b>	<b>ERROR ESTÁNDAR</b>		
<b>Ni</b>	5.80E+05	5.51E+04		
<b>N</b>	7.50E+05	4.77E+04		
<b>L</b>	9.28E+05	4.77E+04		
<b>P</b>	9.07E+05	5.51E+04		
<b>PA</b>	6.50E+05	4.77E+04		
			<b>Tt</b>	2.16

<b>COMPARACIONES</b>	<b>DIFERENCIA</b>	<b>S<sub>COMP</sub></b>	<b>DMS</b>	<b>0.05</b>
<b>μP - μNi</b>	3.27E+05	7.79E+04	1.68E+05	H1
<b>μP - μPA</b>	2.57E+05	7.29E+04	1.57E+05	H1
<b>μP - μN</b>	1.57E+05	7.29E+04	1.57E+05	H0
<b>μL - μP</b>	2.08E+04	7.29E+04	1.57E+05	H0
<b>μL - μNi</b>	3.48E+05	7.29E+04	1.57E+05	H1
<b>μL - μPA</b>	2.78E+05	6.75E+04	1.46E+05	H1
<b>μL - μN</b>	1.78E+05	6.75E+04	1.46E+05	H1
<b>μN - μNi</b>	1.70E+05	7.29E+04	1.57E+05	H1
<b>μN - μ PA</b>	1.00E+05	6.75E+04	1.46E+05	H0
<b>μPA - μNi</b>	7.00E+04	7.29E+04	1.57E+05	H0