



EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE ENSILADOS MICROBIOLÓGICOS SOBRE DESECHOS PESQUEROS



Alumno: Andrés Maldonado

Director: Dr. Hernan Gongora





Abreviaturas

- BAL Bacteria del ácido láctico
- BHI Infusión cerebro corazón
- XLD medio de cultivo Xilosa, Lisina y Desoxicolato
- DS Desvío estándar
- EB Ensilado microbiológico
- EQ Ensilado químico
- ES Error estándar
- FAO Organización para la alimentación y agricultura
- MRS medio de cultivo Man Rogosa Sharpe
- OMS Organización mundial de la salud
- PBS Solución amortiguadora buffer fosfato salina
- UFC Unidades formadoras de colonias





Introducción

En la provincia del Chubut, los residuos de la Industria pesquera se depositan en basurales a cielo abierto o en cuencos receptores de residuos orgánicos sin adecuadas barreras impermeables que eviten la contaminación del suelo. La gestión de estos residuos recae en los municipios afectados por esta problemática. De esta manera, estos desechos contaminan el suelo y el agua subterránea con los productos de su degradación, provocan la proliferación de vectores sanitarios (roedores, insectos, gaviotas) y la generación de olores nauseabundos.

En la provincia del Chubut, los Municipios de Dolavon, Gaiman, Rawson, Trelew y Puerto Madryn han formado un consorcio para el tratamiento de los residuos sólidos urbanos y residuos agropecuarios, mediante el Sistema de Gestión Integral de Residuos Sólidos Urbanos (GIRSU) de la región del VIRCH. Este Sistema no contempla en sus instalaciones el tratamiento de las fracciones de residuos pesqueros orgánicos.

Este residuo conformado por pieles, vísceras y esqueleto, puede destinarse a la elaboración de subproductos, como suplementos alimenticios para consumo animal, entre ellos harinas, ensilados y aceites y otros productos como hormonas, concentrados proteicos, productos farmacéuticos, abonos, colas, gelatinas y pieles curtidas. Sin embargo la mayoría de las empresas dedicadas al procesamiento de pescado en la provincia no realiza su aprovechamiento, a pesar que existe la tecnología para hacerlo tanto a escala experimental como industrial.

Según lo afirmado por la FAO (2001), la conversión de residuos de pescado en subproductos, fue en los últimos años, el mayor factor de prevención de la contaminación por residuos pesqueros y juega un rol muy útil para facilitar el progreso de la industria pesquera a través de la optimización de la materia prima capturada.

Entre 2005 y 2011, desembarcaron aproximadamente 1 millón de toneladas de merluza en los puertos de Chubut (Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, 2012) (Figura 1). En la actualidad, el NE del Chubut, que involucra las ciudades portuarias de Rawson y Puerto Madryn, no cuenta con plantas de fabricación de harina de pescado, por lo que aproximadamente unas 35.000 t anuales de restos de merluza han sido desechados y depositados en basurales a cielo abierto, perjudicando de manera directa al ambiente (Sarsa *et al.*, 2015).



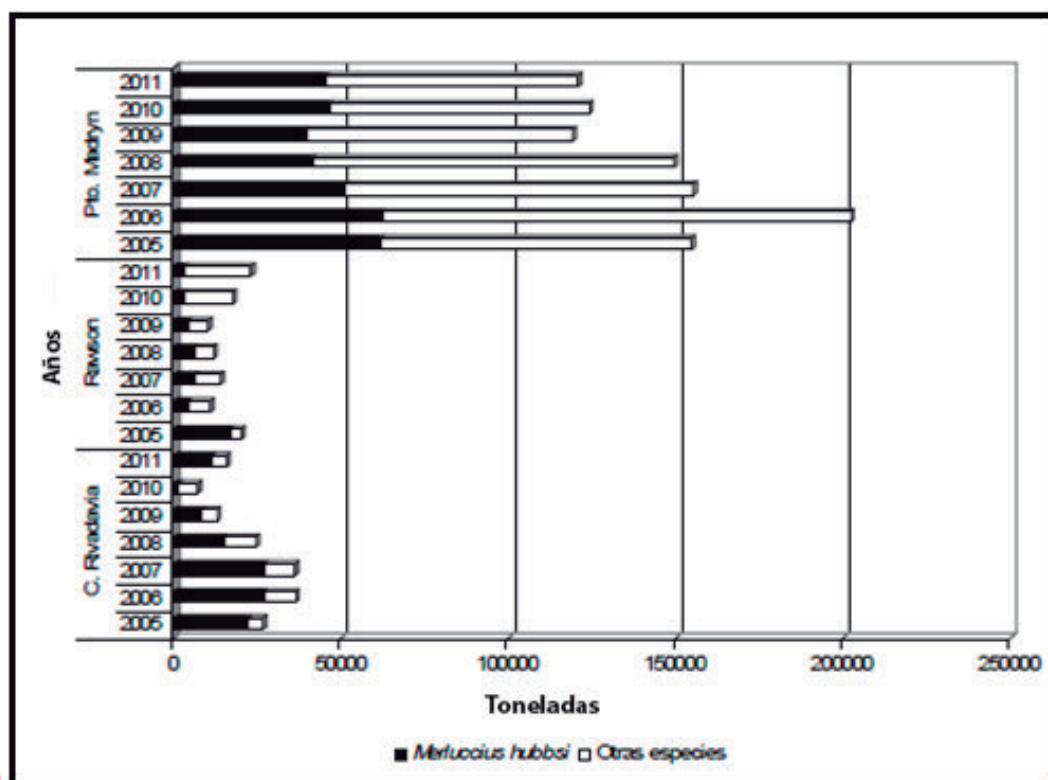


Figura 1. Desembarque anual de *Merluccius hubbsi* y otras especies en los principales puertos de la provincia del Chubut (Gongora, 2013)

La solución para el tratamiento de los desechos orgánicos en pesquerías podría ser la instalación de plantas que aprovechen estos restos para elaborar harinas (de pescado), pero la estacionalidad de las capturas hace que los volúmenes de materia prima disponibles (desechos) no sean suficientes para justificar esa inversión en esta región.

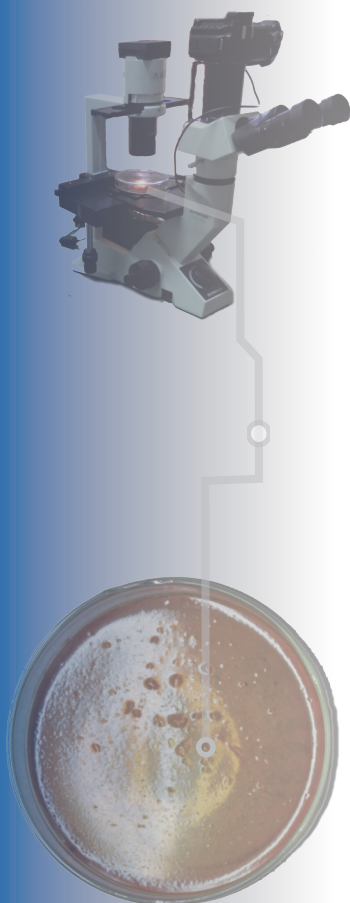
La problemática de los desechos orgánicos industriales en la provincia del Chubut exige una pronta solución para evitar el alto impacto ambiental negativo de estas industrias sobre sus comunidades.

Esta situación es especialmente difícil en los municipios pequeños, donde las limitaciones técnicas y económicas no permiten poner en funcionamiento medidas de manejo ambiental apropiadas al problema de contaminación, en forma definitiva.

Sin embargo, la implementación de medidas preventivas simples y de bajo costo, como el manejo ambientalmente saludable de los residuos orgánicos hace viable abordar el problema de forma eficiente en cuanto a requerimientos y resultados, al exigir pocos recursos y generar valor agregado a los residuos manejados (Pons Balbe, 2004).

Una alternativa a la fabricación de harinas, y que constituye una forma de aprovechar estos restos orgánicos, es el tratamiento por acidificación para producir ensilados, un subproducto que puede ser utilizado en la alimentación animal o en la producción de fertilizantes orgánicos.

El ensilado ácido de residuos de pesquerías puede definirse como un producto semilíquido, rico en proteínas, calcio y fósforo, y con un perfil de aminoácidos, que lo hace apto para sustituir harinas proteicas en la alimentación animal.



La acidificación de la masa de pescado, no sólo inhibe la descomposición del material sino también activa las enzimas proteolíticas (pepsinas, catepsinas) contenidas en los tejidos y favorece su hidrólisis (Góngora, 2013)

Estas enzimas presentan su mayor actividad cuando el pH se reduce a valores cercanos a 4, por efecto de la adición de ácidos orgánicos o inorgánicos.

A este pH, el producto puede conservarse en perfecto estado por periodos de tiempo prolongados, sin necesidad de refrigeración. El proceso de ensilado es un método sencillo y barato de aprovechar los desperdicios y recortes de faena. Estos desechos presentan una alta carga bacteriana que promueve la rápida descomposición del material (Dapkevicius *et al.*, 2000). Se han detectado bacterias patógenas en este tipo de desechos, que pueden ser eliminadas mediante tratamiento térmico o acidificación (Castillo *et al.*, 1998; O'Sullivan *et al.*, 2002).

Las Bacterias lácticas poseen la propiedad de producir ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico. En general los valores de pH que se encuentran en un cultivo de este tipo de Bacterias esta entre 3 y 5. Estos valores de pH y la producción de sustancias antibióticas, pueden constituir un proceso eficaz para eliminar o disminuir la presencia de bacterias patógenas en los desechos pesqueros y cárnicos. Entre los mecanismos de inhibición microbiana desarrollada por las BAL se describen la producción de ácidos orgánicos, formación de metabolitos de O₂ y compuestos orgánicos antibióticos (bacteriocinas) (Larrea *et al.*, 2007).

Existen gran cantidad de cepas de bacterias lácticas que han demostrado su acción inhibitoria sobre otras bacterias patógenas. Por ejemplo la cepa *Lactobacillus casei* GG, modifica la habilidad de *Salmonella typhimurium* C5 para invadir células de eritrocitos humanos in vitro (Hudault *et al.*, 1996).

Por otro lado Moghaddam *et al.* (2006), realizó un experimento en el que evaluó la capacidad antibacterial de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus* contra *Escherichia coli* O157:H7. Los resultados mostraron que las bacteriocinas juegan un papel significativo en la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7. Asimismo previene la producción de verotoxinas a concentraciones más bajas que la dilución mínima inhibitoria. (Moghaddam *et al.*, 2006)

En cuanto a la utilización de bacterias lácticas para la elaboración de ensilado biológico, facilitan la acidificación pero además dan un valor adicional al alimento en las que se incorporen, ya que pueden actuar como probióticos y aumentar las propiedades nutricionales y sanitarias del alimento.

Algunos Lactobacilos, como *Lactobacillus arizonensis*, han aumentado la eficiencia en la alimentación de ratones de laboratorio, pero además han controlado in vitro, el crecimiento de cepas patógenas en desechos orgánicos, como *Salmonella enteritidis*, *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus* (Góngora, 2013).

Lactobacillus arizonensis es una especie que pertenece al grupo *L. plantarum* (Kostinek *et al.*, 2005). Aunque no se han realizado estudios que comprueben la eficacia de *L. arizonensis* para inhibir patógenos, existen abundantes antecedentes sobre la capacidad antimicrobiana de varias cepas de *L. plantarum* tanto en ensilados como en cultivos (Skrede y Nes, 1988; Alakomi *et al.*, 2000; Ranjit y Kung, 2000; Borghesi, 2004; Todorov y Dicks, 2005; Calo-Mata *et al.*, 2008



Los estudios sobre ensilado biológico de pescado, generalmente se han dirigido a la comprobación de su efectividad como sustituto proteico en la alimentación animal, dejando de lado la acción de las bacterias lácticas como reguladoras de la flora microbiana del sustrato de pescado.

Por otro lado, en los trabajos de caracterización de ensilados de pescado, se resalta su acción antimicrobiana sobre el material original, pero no se define cuantitativamente su efecto inhibitorio sobre cepas patógenas que puede tener el material original.

Las células aisladas cultivadas en un volumen finito de medio de cultivo apropiado utilizan los nutrientes que tienen disponibles, sintetizan sus propios componentes celulares y se dividen, duplicando su masa y su material genético. El tiempo que tarda una célula en cumplir ese proceso se denomina tiempo de generación y puede variar desde unos 20 minutos en condiciones óptimas hasta varios meses según las condiciones ambientales. Cada vez que transcurre un tiempo de generación, el número de células se duplica, siguiendo, por tanto, un incremento exponencial (Salminen *et al.*, 2004).

Cinética de crecimiento microbiano

Es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos para predecir cómo va a evolucionar un cultivo.

Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división forman una suspensión de células libres.

En un cultivo discontinuo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Figura 2) (Perez Granados *et al.*, 1997):

1.- **Fase lag o de adaptación:** durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo). En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células.

2.- **Fase exponencial o logarítmica:** en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es constante. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase estacionaria y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad.

3.- **Fase estacionaria:** en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial.



Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente presente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

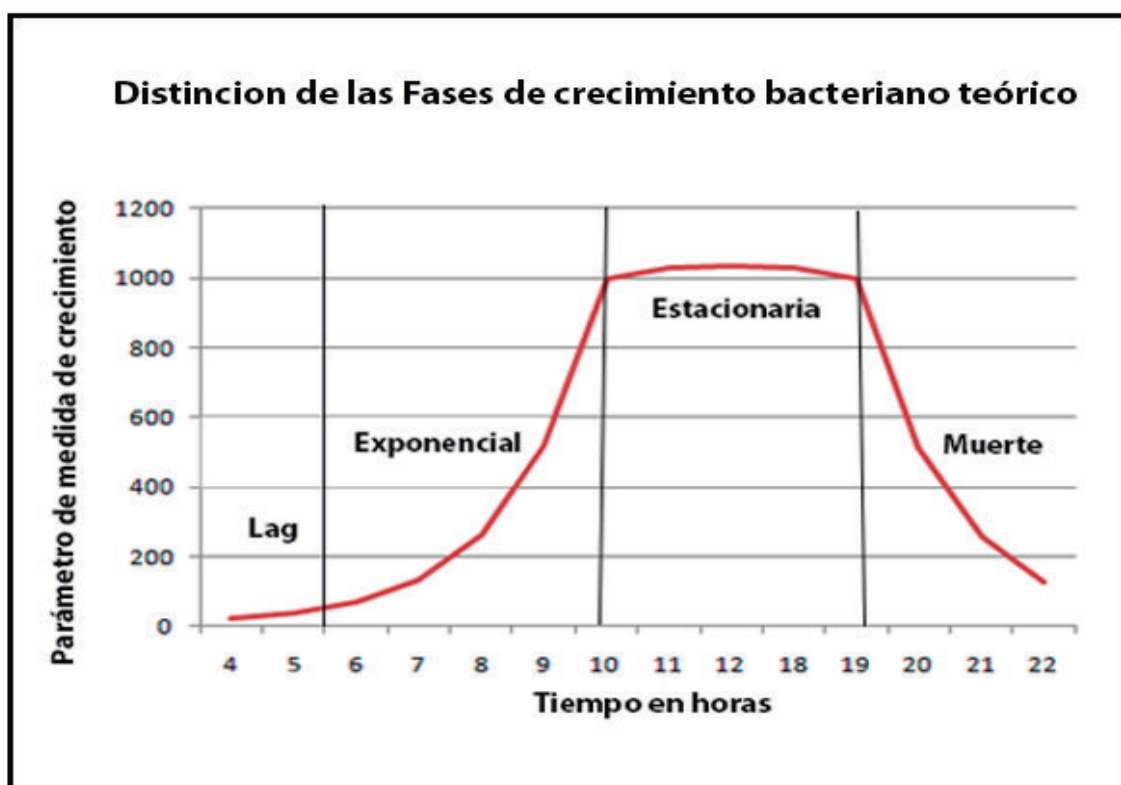


Figura 2. Fases de un crecimiento bacteriano teórico
(Perez Granados *et al.*, 1997)

4.- **Fase de muerte:** Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento en cultivos líquidos se presentan también en cultivos sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de sustrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo.

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos.



Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente presente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en los ambientes naturales.

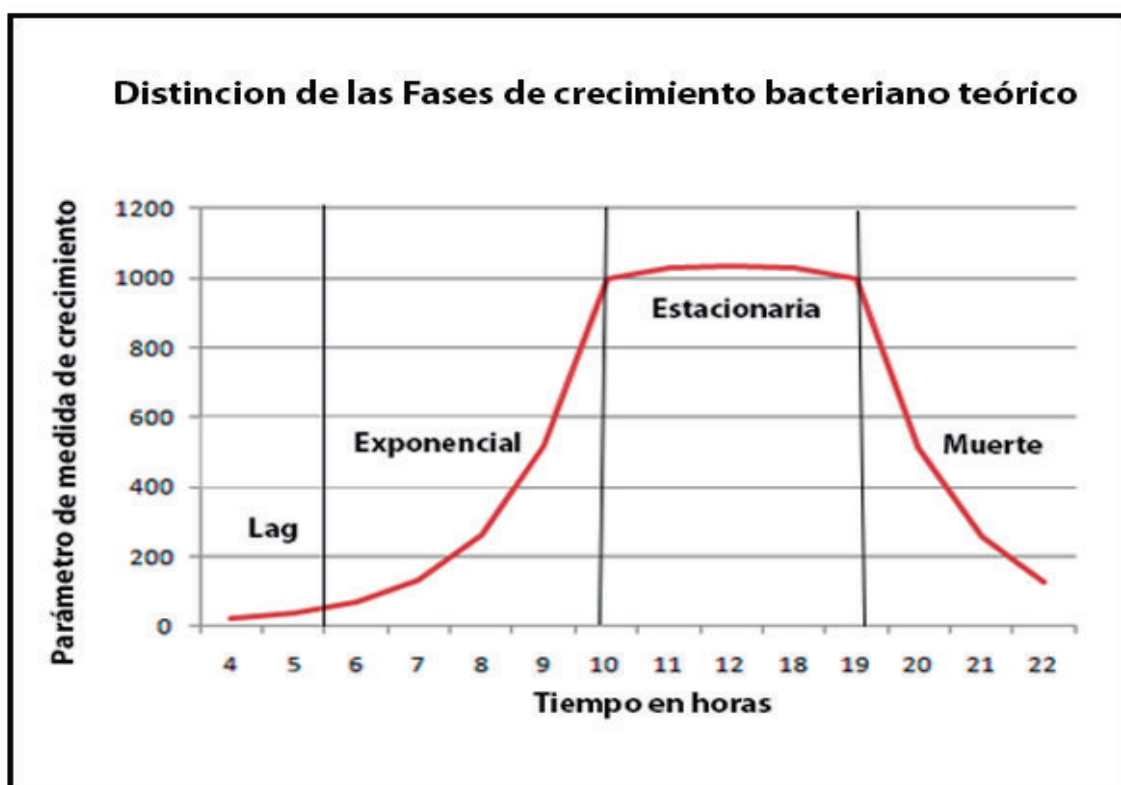


Figura 2. Fases de un crecimiento bacteriano teórico
(Perez Granados *et al.*, 1997)

4.- **Fase de muerte:** Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

Las fases, parámetros y cinética de crecimiento en cultivos líquidos se presentan también en cultivos sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, se puede estudiar siguiendo la evolución del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

Cuando una célula aislada e inmóvil comienza a crecer sobre un sustrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia. Por consiguiente, se denomina unidad formadora de colonia (UFC) a una célula bacteriana viva y aislada que si se encuentra en condiciones de sustrato y ambientales adecuadas da lugar a la producción de una colonia en un breve lapso de tiempo.

Existen diferentes sistemas para detectar y medir el crecimiento de microorganismos.



Los métodos mas utilizados son el recuento de viables en placa y el método turbidimétrico:

Recuento de viables: Consiste en la dilución de una muestra con bacterias (con solución salina estéril, buffer fosfato, agua peptona), hasta que se diluya lo suficiente como para contar con precisión. Se siembra un volumen determinado de la muestra sobre el medio de cultivo sólido adecuado. Para estimar el número de viables se cuenta el número de colonias que se forman de cada una de las célula aisladas contenidas en la muestra inicial. Las placas de final de la serie debe tener entre 25 y 250 colonias (o entre 30 y 300 colonias). Menos de 25 las colonias no son aceptables por razones estadísticas, y más de 250 colonias en una placa es probable que produzcan colonias muy cerca unos de otros para ser distinguidos como distintas unidades formadoras de colonias (UFC).

Método turbidimétrico: Los sistemas para la medición de turbidez operan sobre la base de los fenómenos ópticos que se producen al incidir un haz de luz a través de un medio. La luz se dispersa debido a la existencia de partículas suspendidas en el interior del medio en análisis, que también intervienen en la reducción de la intensidad del haz de luz resultante. La manera en que la muestra suspendida en el medio interfiere con la luz está relacionada con el tamaño, la forma, la composición de las partículas en la suspensión y la longitud de onda de la luz incidente (González *et al.*, 2013). La densidad de células debe ser del orden de 10^5 por ml. Esta metodología se basa en la ley de Lambert-Beer.

Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano

La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo a lo largo del tiempo de estudio (Perez Granados *et al.*, 1997).

De las cuatro fases de la curva de crecimiento detalladas anteriormente, habitualmente la fase de crecimiento exponencial o logarítmica es la que presenta mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Durante esta fase el tiempo de generación (g) de los microorganismos (el tiempo que la población de microorganismo necesita para duplicar su número) se mantiene constante (Madigan *et al.*, 2004).

Para entender el proceso de crecimiento en esta fase si se hicieran diversos cálculos a partir de un ejemplo muy sencillo, como podría ser un cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial en el que el número de células inicial del cultivo es de 1 bacteria viable por mililitro; este cultivo duplicará el número de células cada hora durante un periodo de estudio, que podríamos decir que es de 10 horas. Por tanto, a lo largo del experimento tendríamos el número de células indicadas en la Tabla 1 y representada en la Figura 3.



Tabla 1. Datos teóricos para representar un crecimiento bacteriano hipotético

Tiempo (t) en horas	Número de Células
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024

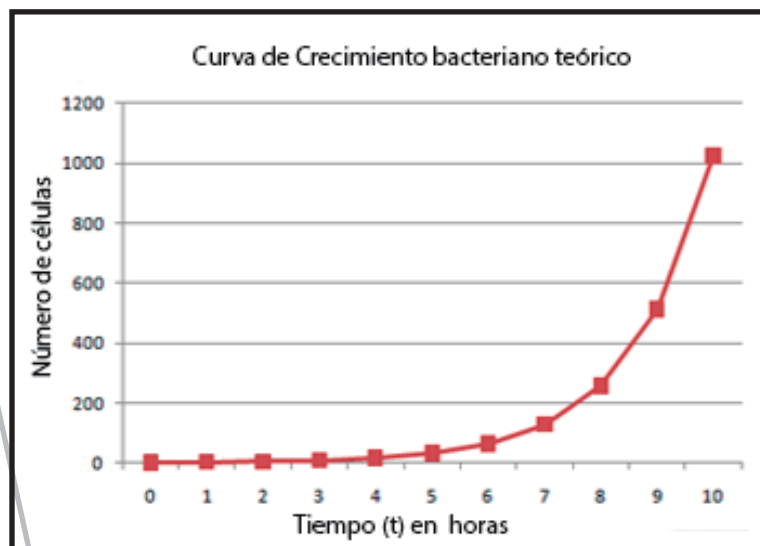


Figura 3. Representación gráfica de los datos de la Tabla 1.

Crecimiento Exponencial: Pendiente de la Gráfica

Estudiar la cinética del crecimiento en una gráfica como la mostrada más arriba es complicado porque la relación entre el tiempo y el número de células no es lineal. En estadística, las relaciones que no son lineales son a menudo modificadas mediante la aplicación de logaritmos a los valores de la abscisas (valores x) o a los valores de las ordenadas (valores y). En el caso de las curvas de crecimiento microbiano se suelen aplicar logaritmos a los valores de concentración de los microorganismos en el cultivo. Esto permite que en la fase de crecimiento exponencial la relación entre las abscisas y ordenadas sea lineal (Madigan *et al.*; 2004).

Una relación lineal esta determinada por una recta, cuya ecuación es:

$$y = ax + b$$

donde

$$a = \Delta y / \Delta x$$

y = log del número de células

a es la pendiente (que a su vez depende de la gráfica).

x es el tiempo (t).

b es igual a cero en el ejemplo, pues la gráfica de la recta que resulta de la aplicación de logaritmo, pasa por el punto (0,0)

Por ello: $\log(\text{células}) = \text{pendiente} * \text{tiempo}$

Donde: $\text{pendiente} = (\text{Log}(2N) - \text{Log}(N)) / (t - t_0)$



Como se ha indicado anteriormente, el tiempo de generación (g) de la fase exponencial de crecimiento es constante durante toda la fase, y también lo es la pendiente. Estos dos parámetros están estrechamente relacionados. El problema radica en que la pendiente depende de la gráfica que hayamos representado, mientras que el tiempo de generación (el tiempo que tarda la población en duplicarse) es un valor que no cambia con la representación gráfica.

Por lo tanto:

$$\text{Pendiente} = \Delta y / \Delta x = (\text{Log}(2N) - \text{Log}(N)) / g = (\text{Log } 2) / g$$

Δx ha sido reemplazado por el tiempo de generación (g). Durante este tiempo el número de células si incrementará de N a 2N.

En síntesis:

$$k = (\text{Log}(2N) - \text{Log}(N)) / (t - t_0), \text{ donde } k \text{ tiende a ser la pendiente (a)}$$

k es la constante de la velocidad específica de crecimiento (Madigan *et al.*, 2012).

t_0 : tiempo inicial

N: Número de células en t_0

2N: determina el valor de t (el tiempo que tarda la población en duplicarse)

Madigan *et al.* (2004) definen k como constante de la velocidad de crecimiento y lo relacionan con g (tiempo de generación en la fase exponencial) del siguiente modo:

$$k = \log 2 / g$$

Valor límite de la Fase exponencial: Velocidad máxima de crecimiento

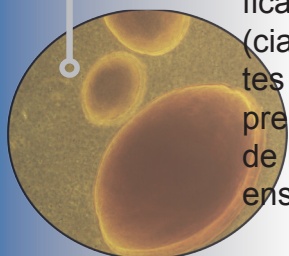
Durante la fase exponencial queda establecido que el valor k es constante, en tanto no supere los límites a la fase estacionaria. En virtud de ello es fundamental encontrar el valor límite entre ambas fases. La fórmula que permite encontrar este punto es:

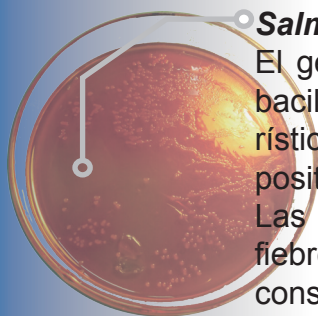
$$V_{\text{max}} = \frac{N^{\circ} \text{ UFC}}{\text{ml } t}$$

Caracterización de Bacterias

Lactobacillus arizonensis

Existen pocos antecedentes bibliográficos sobre *L. arizonensis*, ya que su aislamiento es reciente. Los pocos trabajos sobre esta especie, la describen como una cepa heterofermentativa facultativa, que ha sido aislada de harina de jojoba fermentada e identificada como una nueva especie de BAL capaz de degradar el glicósido simmonsina [2-(cianometileno)-3-hidroxi-4,5-dimetoxiciclohexil- β -D-glucósido], uno de los componentes tóxicos del aceite de jojoba (Swezey *et al.*, 2000). *Lactobacillus arizonensis* se presenta como la cepa más eficiente en cuanto a la acidificación, al aprovechamiento de la fuente de carbono y a los valores de pH finales alcanzados para el proceso de ensilado biológico de pescado (Góngora, 2013)





• *Salmonella enteritidis* ATCC 13076

El género *Salmonella* se incluye en la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y suelen ser móviles.

Las personas infectadas con bacteria *Salmonella enteritidis* usualmente padece fiebre, calambres abdominales y diarrea, iniciando 12 a 72 horas después de haber consumido alimentos contaminados. La diarrea puede ser severa, debiendo en algunos casos hospitalizar a la persona afectada (Alonso Melero, 1994)



• *Staphylococcus aureus* ISO 6888-1

S. aureus es un miembro de la Familia Micrococcaceae. Estos microorganismos aparecen como cocos Gram-positivo. *S. aureus* se distingue de otras especies Staphylococales sobre la base de pigmentación oro de las colonias, resultando positivo para la reacción de la coagulasa, fermentación de manitol y el test de desoxyribonucleasa.

Los humanos son un reservorio natural de *Staphylococcus*. La velocidad de colonización es alta en pacientes con el tipo de Diabetes 1, uso de drogas intravenosas, pacientes de hemodiálisis y pacientes con SIDA (Franklin, 1998). *Staphylococcus aureus* es causante de infecciones de la piel y ocasionalmente causa infecciones graves tales como infecciones de las heridas quirúrgicas y pulmonares.

En el presente trabajo se evalúa el efecto inhibitorio de la cepa *Lactobacillus arizonensis* sobre desechos de pescado contaminados con inóculos definidos de los patógenos *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*, durante el proceso de ensilado biológico. Modificaciones en la cinética normal de crecimiento de las bacterias patógenas permitirían demostrar si existe acción inhibitoria inducida por el proceso de ensilado elaborado con esta BAL.

El financiamiento parcial de insumos y equipamiento utilizado en la presente Tesis, es a través de la ejecución de los proyectos: “**Aprovechamiento integral de las capturas - Estrategias para la reutilización de desechos pesqueros**” dirigido por la Dra. María Eva Góngora y co dirigido por el Dr. Hernán Góngora, aprobado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNPSJB; y el proyecto “**Desarrollo de alimentos balanceados en Chubut**” (CORFO-CHUBUT) dirigido por el Dr. Hernán Góngora.



Hipótesis de Trabajo

Hipótesis 1:

En los ensilados microbiológicos, utilizando *Lactobacillus arizonensis*, se reducen las poblaciones de *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* en la materia original.

Hipótesis 2:

El proceso de ensilado microbiológico puede constituir una alternativa técnica viable para reducir el impacto ambiental de los desechos del procesamiento de pescado, que actualmente se arrojan en los basurales a cielo abierto en la provincia de Chubut.



Objetivos

- Elaborar ensilados microbiológicos con desechos orgánicos de la industria pesquera, para evaluar su factibilidad técnica a escala experimental.
- Evaluar el efecto inhibitorio del proceso de ensilado microbiológico elaborado con la cepa *Lactobacillus arizonensis* sobre los desechos orgánicos pesqueros infectados con *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*.

Material y Métodos

Residuos de pescado

Los residuos del fileteado de merluza (*M. hubbsi*), fueron transportados desde una planta procesadora de pescado ubicada en la ciudad de Rawson (Provincia del Chubut, Argentina), 12 horas después de su captura, en un recipiente refrigerado (4°C). Estos fueron triturados, homogeneizados y luego fraccionados

Bacterias utilizadas durante el trabajo

La cepa de *Lactobacillus arizonensis* fue cedida por el cepario del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA). Las cepas *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Staphylococcus aureus* ISO 6888-1 fueron cedidas a través de un acuerdo con el Laboratorio de la Dirección de Salud Ambiental de Chubut (Secretaría de Salud, Provincia del Chubut). En el acuerdo se presentó un plan de seguridad (Anexo I), con protocolos para la manipulación de las cepas patógenas.

Este acuerdo fue rubricado por las autoridades de la Dirección de Salud Ambiental, autoridades de la Facultad de Ciencias Naturales (UNPSJB) y el Director de la presente tesis.

Medios de Cultivos utilizados en el trabajo

Se utilizó el medio MRS (Man Rogosa Sharpe) para los cultivos de *Lactobacillus arizonensis*. Este medio permite un abundante desarrollo de todas las especies de Lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

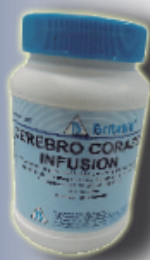
(http://www.britanialab.com/productos/404_hoja_tecnica_es.pdf)

Para los cultivos de *Salmonella enteritidis* se usó XLD agar. Es un medio selectivo diferencial (Xilosa, Lisina, Desoxicolato), utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, especialmente del género *Salmonella*. Tiene la capacidad de detectar la producción de H₂S, a través del sistema indicador tiosulfato de sodio y citrato férrico amonio. Cuando el microorganismo produce H₂S se observan colonias con el centro negro. Los microorganismos no patógenos productores de H₂S no descarboxilan la lisina; cuando están presentes estos microorganismos la reacción ácida producida por la utilización de los carbohidratos previene el ennegrecimiento de las colonias.

(http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts/XL_Agar_Base.pdf)

Para los cultivos de *Staphylococcus aureus* se utilizaron el medio Baird-Parker agar y la Infusión de Cerebro y Corazón (BHI) para el repique. El medio Baird-Parker es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos y muestras ambientales.





El agar Baird-Parker se utiliza ampliamente y se incluye en numerosos procedimientos estándar para el análisis de alimentos, cosméticos o agua de piscinas con el fin de detectar la presencia de *Staphylococcus aureus*.

La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos. Brain Heart Infusion (BHI) Agar sin suplemento se recomienda actualmente como medio universal para bacteriología aerobia. (<http://www.bd.com> ; <http://www.bd.com/europe/regulatory/>)

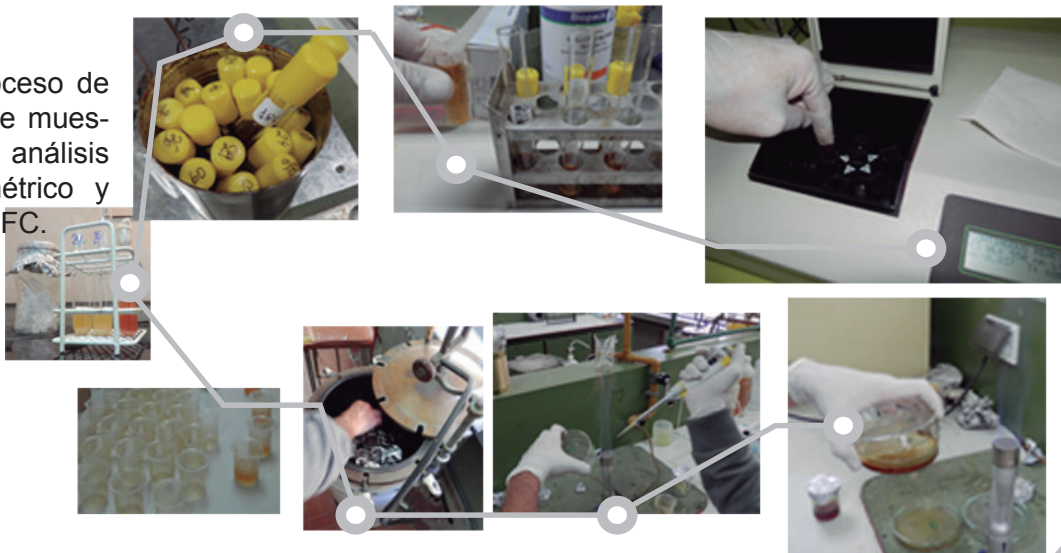
Composición de los medios de cultivos utilizados

MRS	BHI	BAIRD PARKER	XLD
Proteosa peptona Nº 3 10 g	Infusión de cerebro y corazón de (sólidos) 8,0 g	Tryptona 10,0 gr	Xilosa 3,75 g
Extracto de carne 8 g	Digerido péptico de tejido animal 5,0	Extracto de carne 5,0 gr	L- Lisina 5,0 g
Extracto Levadura 4 g	Digerido pancreático de caseína 16,0	Extracto de Yeast 1,0 gr	Lactosa 7,5 g
Glucosa 20 g	Cloruro sódico 5,0	Cloruro de litio 5,0 gr	Sacarosa 7,5 g
Monoleato de sorbitan 1 ml	Glucosa 2,0	Glicina 12,0 gr	Cloruro de Sodio 5,0 g
Fosfato dipotásico 2 g	Fosfato disódico de hidrógeno 2,5	Piruvato sódico 10,0 gr	Extracto de Levadura 3,0 g
Acetato de sodio 5 g	Agua dest. 1000 ml	Telurito potásico 0,1 gr	Rojo FenoI 0,08 g
Citrato de amonio 2 g		Agar 20,0 gr	Desoxicolato de Sodio 2,5 g
Sulfato de Mg 0,2 g		Agua dest. 1000 ml	Tiosulfato de Sodio 6,8 g
Sulfato de Mn 0,05 g			Citrato Férrico de Amonio 0,8 g
			Agar 15,0 g
			Agua destilada c.s.p. 1000 ml

Cinética de crecimiento de *Lactobacillus arizonensis*

Cultivos liofilizados de *Lactobacillus arizonensis* suministrados, se activaron utilizando medio Man-Rogosa-Sharp (MRS), mediante su incubación en estufa a 38 ± 1 °C. El crecimiento poblacional de la cepa se monitoreó mediante la lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Uv Vis Spectrophotometer Metrolab M 1700 V2.090) a 550 nm de longitud de onda y recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) por siembra en placas con medio MRS en profundidad. Las muestras se tomaron a las 3; 6; 9; 12; 15; 18; 21; 24; 36 y 48 horas.

Figura 4. Proceso de preparación de muestras para el análisis espectrofotométrico y recuento de UFC.





Del cultivo inicial se tomo una muestra de 1 ml y se colocó en 100 ml de medio MRS esterilizado, incubándose a 38 ± 1 °C por 24 horas aproximadamente. Se preparo una batería de 30 tubos de ensayo con 5 ml de MRS esterilizado cada uno. Luego de 24 horas se inoculó a cada tubo una muestra de 50 μ l del cultivo de *L. arizonensis* en medio MRS. Los tubos fueron incubados en estufa a 38 ± 1 °C por el lapso de tiempo correspondiente a cada tubo.

El procedimiento para el monitoreo fue el siguiente (Figura 4):

Lecturas de Absorbancia

- 1*. Se tomaron tres Muestras de 1 ml del cultivo a las 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 y 48 horas y se colocaron en tubos Eppendorf estériles, para su centrifugación (3000 rpm durante 10 min).
2. El sobrenadante de cada muestra fue descartado y el pellet fue lavado con 1 ml de PBS buffer (estéril a pH=7,0). Este procedimiento se repitió 3 veces.
3. Finalmente a cada tubo se le adicionaron 2 ml de PBS buffer (estéril a pH=7,0) y se agitó hasta la homogeneización del pellet en la solución.
4. A cada tubo se le realizó una lectura de absorbancia con espectrofotómetro (Uv Vis Spectrophotometer Metrolab M 1700 V2.090) a una longitud de onda de 550 nm.

Recuento de UFC en placas

1. Se preparó una solución de 660 ml de MRS agar y se distribuyó en 30 vasos de precipitados, llevandose a autoclave a 120°C durante 20 minutos.
2. Se esterilizaron 30 placas de Petri y rotuladas con: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 y 48 horas (tres por cada uno de los tiempos consignados).
3. Cada vaso de precipitado esterilizado y con tapa, fue calentado hasta la fusión del medio de cultivo, en una estufa termostatizada a 40°C (Figura 5)
4. De los tubos de ensayo utilizados en el proceso de lecturas de absorbancia (señalados en el punto 1* ut supra), se tomó un muestra de 200 μ l y fueron inoculados en cada placa de Petri con el rótulo correspondiente a cada tiempo.
5. Cada vaso de precipitado con MRS agar fue vertido en la placa antes de la solidificación, junto con el inóculo del cultivo de *L. arizonensis*.
6. Con un proceso de agitación lenta circular se llevo a cabo la distribución del inóculo en el volúmen del medio MRS agar.
7. Se incubó a 38 ± 1 °C por un período de 24 horas
8. El recuento de unidades formadoras de colonias (ufc/ml) se realizó con un microscopio invertido Olympus CKX 41 (Figura 6). Para el conteo se dividió la placa en campos de 25 mm por 25 mm y se seleccionaron 10 campos al azar.
9. Se realizaron los cálculos para obtener la cantidad UFC/ml

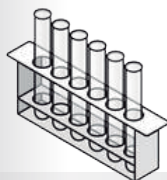




Figura 5. Vasos de precipitado con MRS esterilizado en Estufa termostatzada.

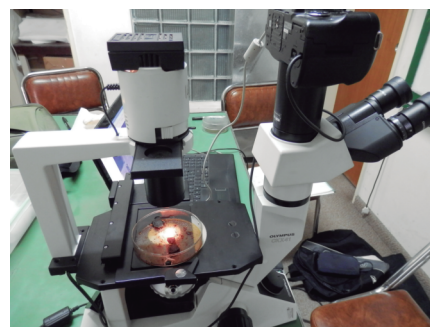


Figura 6. Microscopio invertido para el recuento de UFC

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis estadístico para describir la relación entre Lecturas de Absorbancia y Recuento de UFC/ml. Para ello los datos se analizaron utilizando ANOVA con Statgraphic Plus Versión 5.1, ajustando al modelo lineal para describir la relación entre ambos métodos (Absorbancia y Recuento). Se determinó la intensidad de la relación de los datos a través del análisis del Modelo de Correlación.

Cinética de crecimiento de *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*

Los Cultivos conservados a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ de *S. enteritidis* y *S. aureus* provistos por la Dirección de Salud Ambiental de la provincia del Chubut se activaron en medio de cultivo líquido Infusión Cerebro Corazón (BHI), mediante su incubación en estufa a $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.

La cinética de crecimiento de la cepa se monitoreó mediante la lectura de absorbancia en espectrofotómetro (Uv Vis Spectrophotometer Metrolab M 1700 V2.090) a 550 nm de longitud de onda. Las muestras se tomaron a las 0; 6; 12; 18; 24; 36; 48; 60 y 72 horas.

El procedimiento fue el siguiente:

Se prepararon 27 tubos de ensayo (tres por cada tiempo) con 5 ml de BHI esterilizado. Una vez enfriado a temperatura ambiente, se inocularon 50 μl de cultivo de *S. enteritidis* o *S. aureus* según corresponda y se incubaron a $38 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por el lapso de tiempo detallado de cada uno de los tubos. El ensayo se realizó por triplicado.

El monitoreo de la cinética de crecimiento se realizó según el siguiente procedimiento:

1. Un inóculo de 1 ml de cada cultivo de *S. enteritidis* y *S. aureus* según corresponda, fue colocado en un tubo Eppendorf. Los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 min.
2. Se extrajo el sobrenadante y al pellet precipitado en el fondo, se le adicionó 1 ml de PBS buffer y se centrifugó nuevamente (3000 rpm durante 10 min)
3. Esta operación se repitió dos veces más, adicionando en la última 2 ml de PBS buffer y agitado fuertemente hasta la total disolución de pellet en suspensión.
4. A cada tubo se le realizó una lectura de absorbancia con espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm.



Tolerancia “in vitro”. Efecto inhibitorio de *L. arizonensis* en cultivos de bacterias patógenas.

Se prepararon cultivos de 12 horas en infusión cerebro corazón (BHI) (Britania, Argentina) de las cepas *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Staphylococcus aureus* ISO 6888-1. Cumplido este plazo, se tomaron muestras de 100 µl de estos cultivos y se sembraron en placas con 20 ml de medio BHI-agar en profundidad. A cada una de estas placas se les efectuaron con sacabocados 3 pocillos de 5 mm de diámetro cada uno (Figura 15).

Luego, inóculos de 25 µL de sobrenadante libre de células de cada ensilado elaborado con *L. arizonensis*, (centrifugados a 3000 rpm durante 15 min), se sembraron en los pocillos realizados en las placas con cultivos patógenos. Las placas fueron incubadas a 38 ± 1 °C. Transcurridas 24 horas, se midió con Calibre análogo 150 Mm el halo inhibitorio producido alrededor de cada pocillo. Cada ensayo se realizó por triplicado.



Evaluación del efecto del proceso de ensilado con *L. arizonensis* sobre la cinética de crecimiento de *S. enteritidis* y *S. aureus*.

Se preparó

- 42 placas de Petri, con 20 ml de medio XLD ó Baird Parker agar esterilizados, según el caso
- La misma cantidad de tubos de ensayo con 5 ml de PBS buffer cada uno

Se preparó

- 1 litro de solución de sacarosa al 2,5 %
- 20 ml de medio MRS
- 20 ml de medio BHI

Activación de Bacterias

De los tubos de ensayos provistos por Dirección de Salud Ambiental, con medio sólido conteniendo las bacterias patógenas, se extraen una muestra con anza y son sembrados en medios líquidos específicos.

Para la siembra de *Salmonella enteritidis* ó *Staphylococcus aureus* se utiliza 10 ml de BHI. En cambio para la *L. arizonensis* la activación se realiza en 10 ml de MRS. Posteriormente se dejan 24 horas en Estufa de cultivo a 38 ± 1 °C.

Preparación del medio de Residuo de pescado

- Se colocan 10 gr de residuo de pescado en 42 vasos de precipitado
- Se adiciona 5 ml de solución de sacarosa
- Se esteriliza.

Por cada hora se prepararon seis (6) vasos con este respectivo medio. Si tenemos en cuenta la secuencia mencionada anteriormente, corresponderán cuarenta y dos (42) vasos con medio de residuo de pescado y sacarosa. (Figura 7).



Figura 7. Preparados de medios con residuo de pescado

Repique para bioensayo de inhibición

Para poder determinar la efectividad inhibitoria de *L. arizonensis* en el sustrato contaminado con *S. aureus* y *S. enteritidis*, se realizaron los bioensayos de inhibición luego de haber analizado las curvas de crecimiento de cada una de estas cepas de la prueba, por separado. Esto es (dadas las constantes de cinética de crecimiento especifica (k) respectivas, definidas por la velocidad de crecimiento por unidad de tiempo de cada cepa), determinar el momento en el cual realizar los inóculos.

Para el repique de las cepas patógenas se utilizaron 10 ml de medio BHI y 10 ml de MRS para *L. arizonensis*, previamente esterilizados.

Preparación de las muestras con desecho del fileteado de Merluza (*Merluccius hubssi*)

10 gr de desecho de pescado triturado manualmente en trozos no mayores a 1cm³, se colocaron en 42 vasos de precipitado de 40 ml con una solución de sacarosa de 25 g/L, y se esterilizaron a 120°C durante 45 min.

Siembra del desecho de pescado con *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*

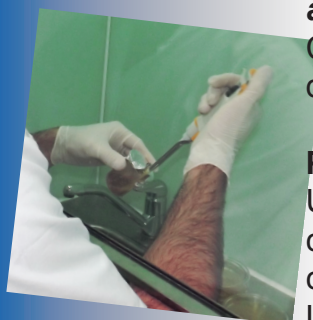
Cada vaso de precipitado con desecho de pescado (10 g) fue inoculado con 0,45 ml de un cultivo de *S. enteritidis* ó *S. aureus* en medio BHI.

Preparación de las muestras de desecho de pescado con y sin *L. arizonensis*

Una vez enfriados a temperatura ambiente, 21 vasos de precipitados con el desecho de pescado estéril y el inóculo de *S. enteritidis* ó *S. aureus* fueron inoculados con 100 µl de un cultivo de *L. arizonensis* en medio MRS.

Los otros 21 vasos de precipitados con desecho de pescado, no fueron inoculados con la BAL para ser utilizados como Control.

Los 42 vasos de precipitados con desecho de pescado e inóculos fueron incubados en estufa de cultivo a 38 ±1 °C durante el tiempo correspondiente a cada muestra (0; 3; 6; 9; 12; 18 y 24h). A medida que se cumplen cada uno de los horarios especificados se agitó levemente, y se tomó una muestra de 50 ó 100 µl del sobrenadante de cada vaso y se sembraron 3 tubos de ensayo con 10 ml de PBS, resultando en una dilución del cultivo en 1:100 ó 1:200 de la muestra original. En cada caso, se extrajeron 50 µl de cada tubo y fueron sembrados en la capsula de Petri correspondiente, para siembra en superficie.





La siembra en superficie se realizó utilizando un ansa modificada (estéril) para extensión de muestras, sobre la superficie de los medios de cultivo específicos XLD y Baird Parker sólidos, para *S. enteritidis* y *S. aureus* respectivamente . (Figura 8). Las placas son incubadas en estufa de cultivo a 38 ± 1 °C por 24 horas para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC/ml).

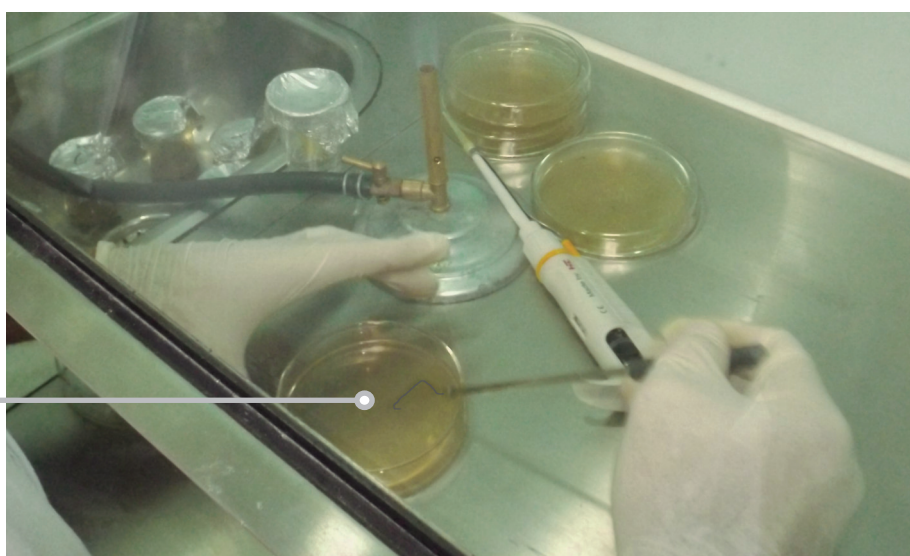
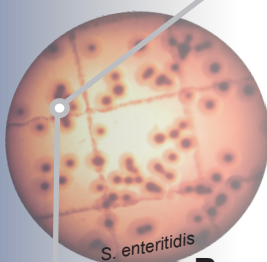


Figura 8. Siembra en superficie con ansa modificada



S. enteritidis

Recuento

Cumplido el plazo en estufa de cultivo, cada cápsula fue observada en lupa óptica para el recuento de UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Se trazó una cuadrícula de 625 mm² y se contabilizaron las UFC. Se realizaron los cálculos pertinentes por el factor de superficie y de dilución, estableciendo la cantidad de UFC por mililitros (UFC/ml), con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC observadas} \times \text{factor de dilución} \times \text{sup placa} \times 1000}{\text{Sup. Cuadrícula} \times \text{inoculo}} = \text{UFC/ml}$$

Cinética de crecimiento

Se hizo un seguimiento de la cinética de crecimiento monitoreando a las 0, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas iniciando cada una de ellas con una concentración de microorganismos contenidos en 100 µl de medio de cultivo para cada tipo.

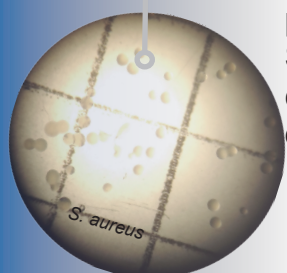
Dada la constante de velocidad específica de crecimiento en la aplicación de la Ecuación de Madigan *et al.* (2012), Δt es el intervalo de tiempo que en la fase exponencial refiere a g (tiempo de generación constante)

$$k = (\text{Log}(2N) - \text{Log}(N)) / \Delta t$$

Donde

N : Número de células en *t* inicial

2N : Número de células en *t*, donde el incremento de células es el doble de N



S. aureus



Asimismo se estableció de forma proporcional la evolución del proceso de inhibición, teniendo en cuenta el valor Control como el 100% para cada horario.

$$\% \text{ ufc/ml tratamiento} = \frac{\text{ufc/ml trat.} \times 100 \%}{\text{ufc/ml ctrl.}}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ ufc/ml tratamiento}$$

Resultados

Estandarización de Curvas de Crecimiento

Lactobacillus arizonensis

De los ensayos realizados se obtuvieron lecturas que permitieron establecer las curvas de crecimiento. Para *Lactobacillus arizonensis* se realizaron lecturas de absorbancia y recuento de UFC/ml.

Las Tablas 2 y 3, mostraron las siguientes lecturas:

Tiempo en horas	Promedios de las Lecturas Abs. x Dilución
0	0,07
3	0,04
6	0,94
9	5,23
12	6,68
15	8,07
18	7,04
21	7,72
24	7,12
36	6,62
48	6,41

Tabla 2. Lecturas de Absorbancia por factor de dilución en *L. arizonensis*.

Tiempo en horas	Promedios de Conteos (UFC/ml)	Logaritmo Promedio de Conteos (Log UFC/ml)
0	150,50	2,18
3	804,53	2,91
6	2488,03	3,4
9	1212160,00	6,08
12	2744747,00	6,44
15	2479573,00	6,39
18	1973973,00	6,3
21	1127893,00	6,05
24	1430400,00	6,16
36	322021,10	5,51
48	194844,40	5,29

Tabla 3. Valores promedios de los recuentos de células de *L. arizonensis* en UFC/ml y logaritmos.

Las figuras 9 y 10 muestran las curvas de crecimiento de *L. arizonensis* en medio MRS líquido y MRS agar, en la determinación turbidimétrica y recuento de UFC respectivamente.

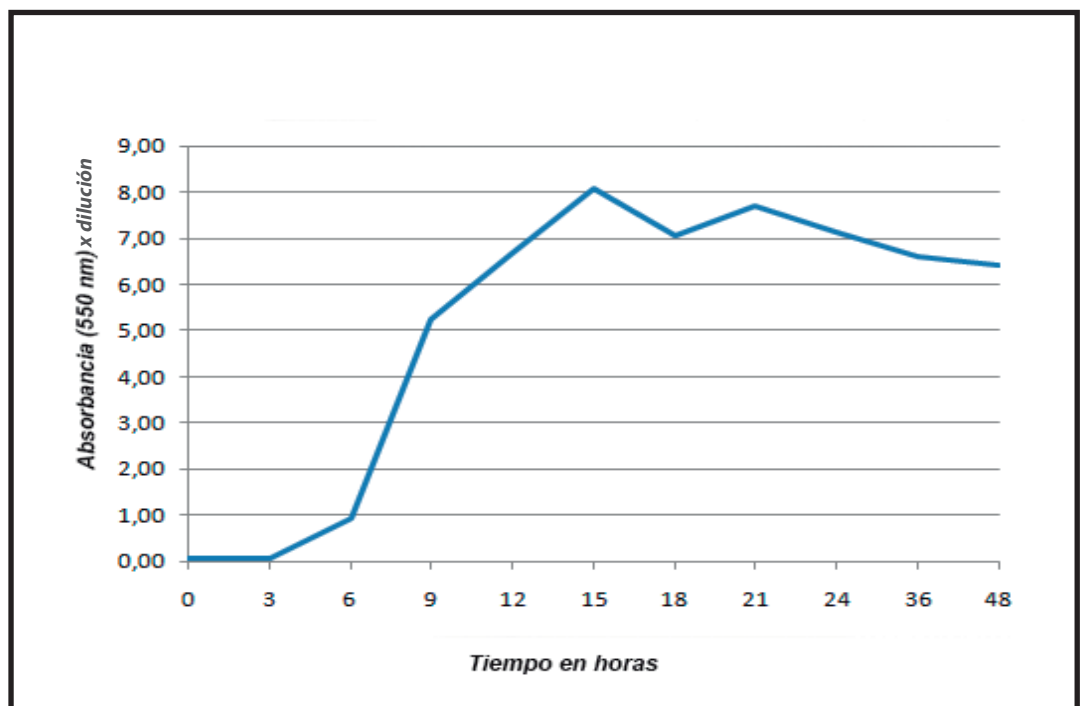


Figura 9. Evolucion del Crecimiento de *L. arizonensis* en medio MRS liquido.
Curva construida a partir de las Absorbancias observadas

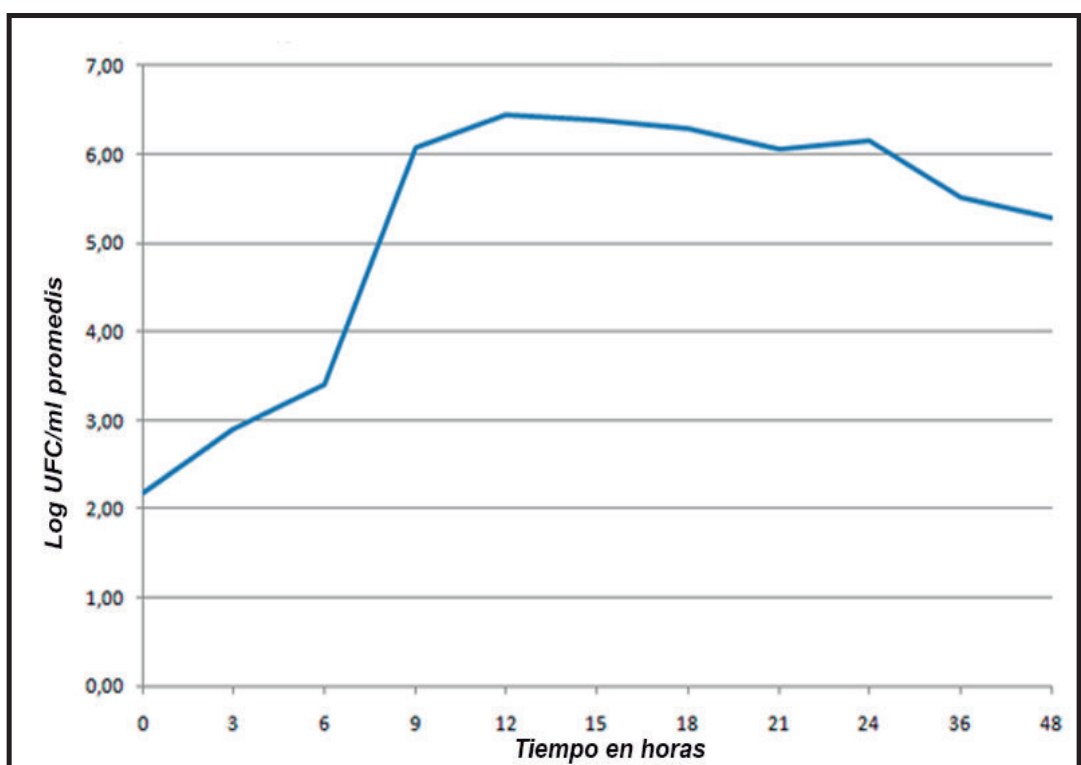


Figura 10. Evolucion del Crecimiento de *L. arizonensis* en MRS agar.
Curva construida a partir del recuento de UFC/ml



El Análisis Estadístico de Correlación, en el uso de ambos métodos para la medición de la evolución del crecimiento de la bacteria *Lactobacillus arizonensis*, arrojó lo siguiente

Análisis de la Varianza

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Cociente-F	P-Valor
Modelo	98,2184	1	98,2184	55,50	0,0000
Residuo	15,9267	9	1,76963		
Total	114,145	10			

Coefficiente de Correlación = 0,927615

Estadístico de Durbin-Watson = 0,776814 (P=0,0019)

Autocorrelación residual en Lag 1 = 0,510522

Dado que el p-valor en la tabla ANOVA es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y conteo de UFC para un nivel de confianza del 99 %.

El coeficiente de correlación 0,93; muestra una relación relativamente fuerte entre las variables. Esto indica que ambas metodologías utilizadas en la evaluación de crecimiento (Absorbancia y Recuento UFC/ml), manifiestan un comportamiento similar en ambas curvas (Figura 9 y 10).

Estandarización de Curvas de Crecimiento

Salmonella enteritidis

En la Tabla 4 se detallan el promedio de las lecturas del método turbidimétrico para determinar la evolución de crecimiento de *S. enteritidis*.

Tiempo en horas	Promedio Lecturas Abs. (550 nm)
0	0,0233
6	0,0453
12	0,2537
18	0,3113
24	0,341
36	0,403
48	0,464
60	0,504
72	0,451



<https://www.pinterest.com/cdcgov/drug-resistance/>

Tabla 4. Promedio de las lecturas de absorbancia en *S. enteritidis* para curva de crecimiento.



Estas lecturas permitieron construir la curva de crecimiento de *S. enteritidis* tal como lo presenta la Figura 11.

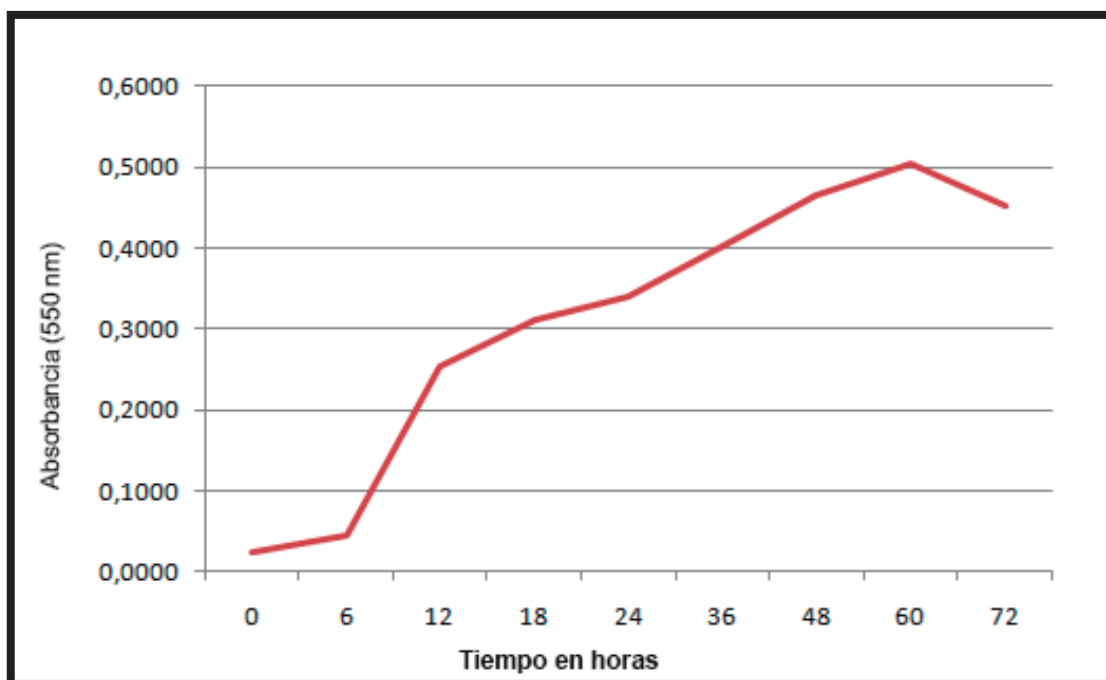


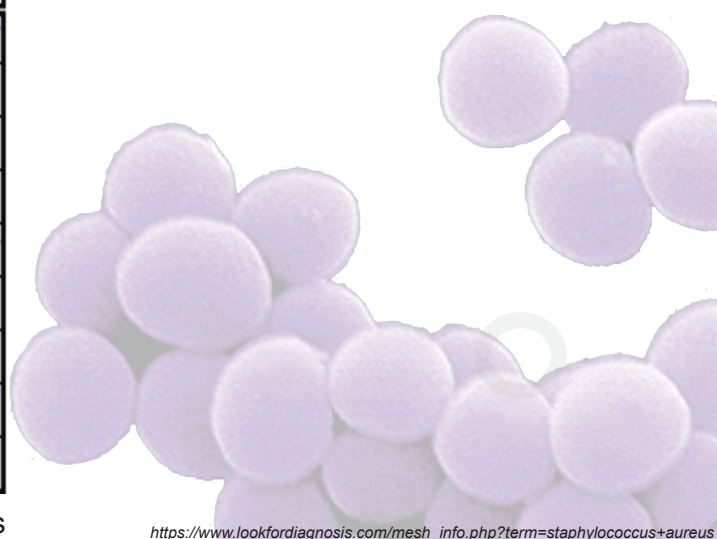
Figura 11. Curva de crecimiento de *Salmonella enteritidis* en BHI

Estandarización de Curvas de Crecimiento *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 5 se detallan el promedio de las lecturas del método turbidimétrico para determinar la evolución de crecimiento de *S. aureus*.

Tiempo en horas	Promedio Lecturas Abs. (550 nm)
0	0,0027
6	0,0043
12	0,1
18	0,202
24	0,2277
36	0,2793
48	0,269
60	0,288
72	0,1973

Tabla 5. Promedio de las lecturas de absorbancia en *S. aureus* para curva de crecimiento



https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=staphylococcus+aureus



Estas lecturas permitieron construir la curva de crecimiento de *S. aureus* tal como lo presenta la Figura 12.

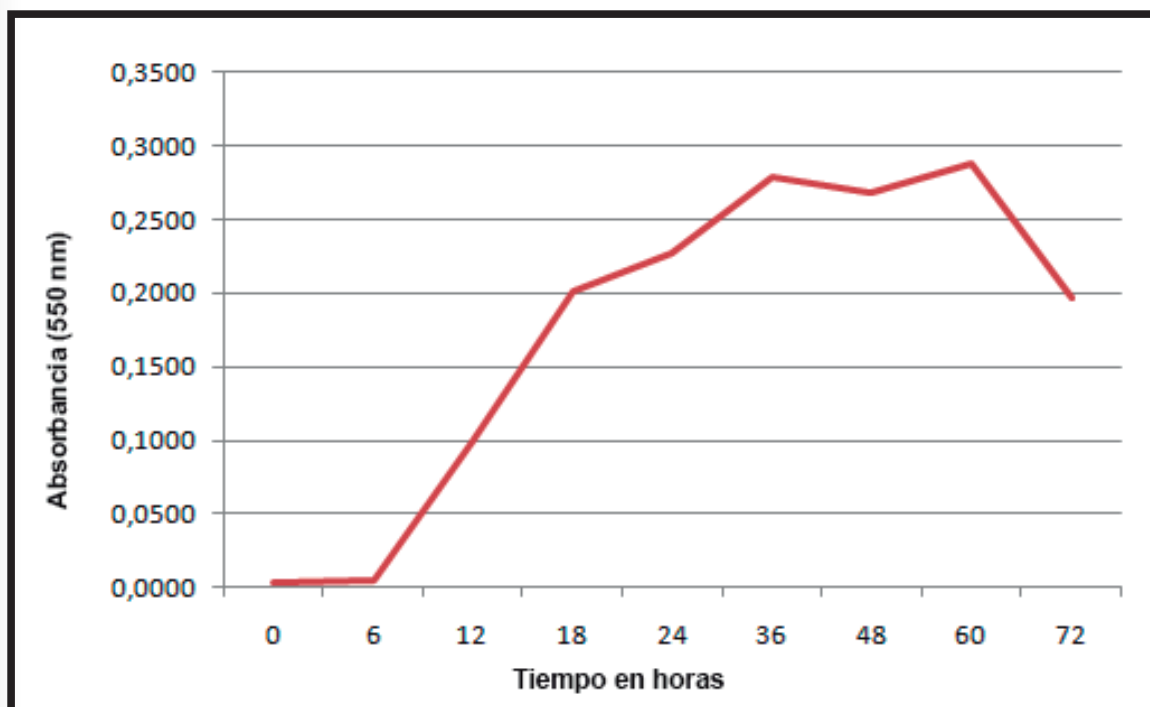


Figura 12. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en BHI

Evaluación de la cinética en la fase exponencial de las curvas de crecimiento en *Lactobacillus arizonensis*; *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*

En la aplicación del modelo de Madigan *et al* (2012) según el cual:

$$k = \frac{\log 2N - \log N}{g}$$

En la fase exponencial determina que $k = \log 2/g$

El tiempo de generación (g) de la fase exponencial de crecimiento, es constante durante toda la fase

Para establecer el valor límite de la fase exponencial, en el punto de inflexión que inicia la fase estacionaria, se calcula la velocidad de crecimiento en cada hora con la siguiente formula:

$$V_{max} = \frac{N^{\circ} \text{ UFC}}{\text{ml } t}$$

ó

$$V_{max} = \frac{\text{Absorbancia}}{t}$$

Se toma este valor como velocidad de crecimiento en cada uno de los intervalos de tiempo (0; 3; 6; ...; 60 y 72 hs). El máximo de velocidad en la fase exponencial; es el valor límite que establece el inicio de la fase estacionaria.



Lactobacillus arizonensis

En la Tabla 6 se muestran los valores de la cinética de crecimiento y su correspondiente gráfica en la Figura 13.

Tiempo en horas (t)	Velocidad Crecimiento (Absorbancia) / t
0	0
3	0,0148
6	0,1567
9	0,5816
12	0,5564
15	0,5381
18	0,3914
21	0,3675
24	0,2966
36	0,1839
48	0,1336

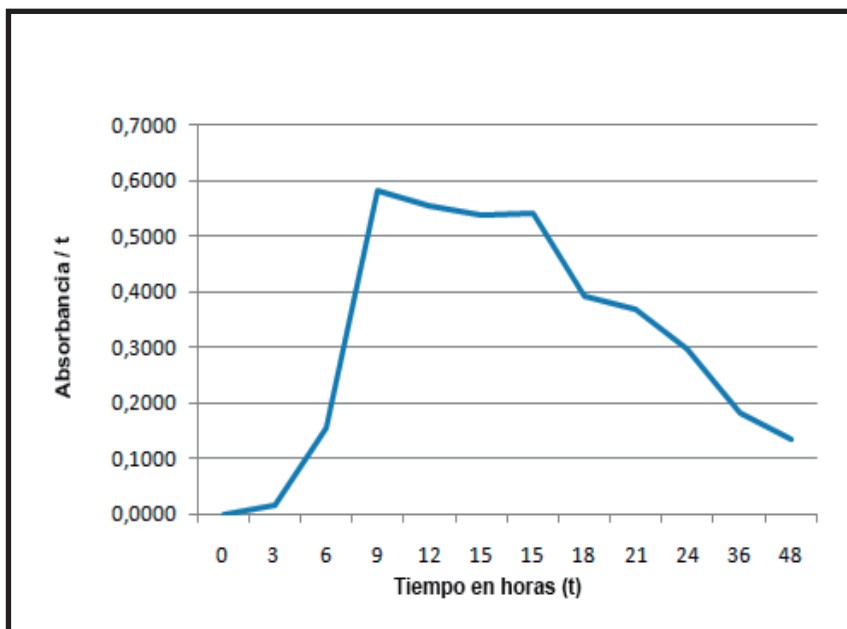


Tabla 6. Cinética de Crecimiento de *Lactobacillus arizonensis*

Figura 13. Evolución de la velocidad de crecimiento. Absorbancia por unidad de tiempo en *Lactobacillus arizonensis*.

Salmonella enteritidis

En la Tabla 7 se muestran los valores de la cinética de crecimiento y su correspondiente grafica en la Figura 14.

Tiempo en horas (t)	Velocidad Crecimiento (Absorbancia) / t
0	0
6	0,0076
12	0,0211
18	0,0173
24	0,0142
36	0,0112
48	0,0097
60	0,0084
72	0,0063

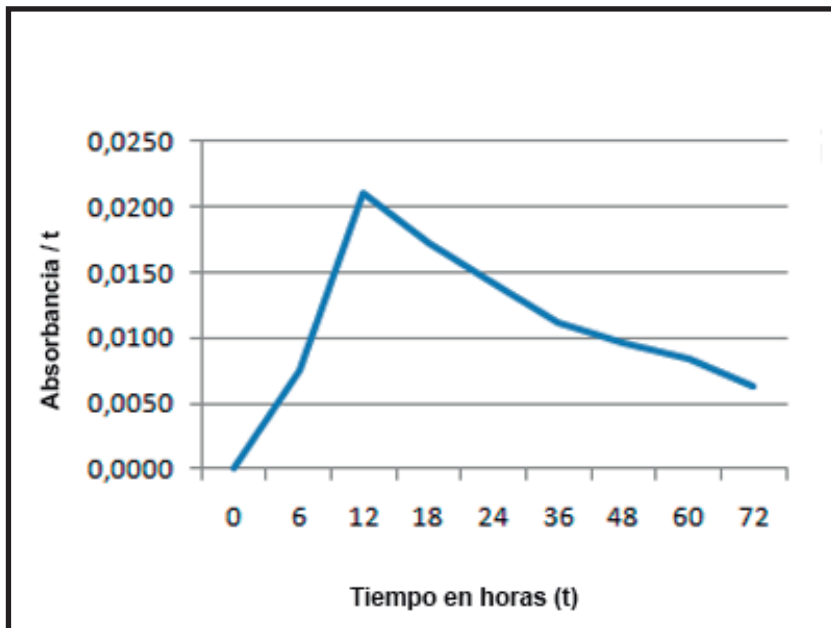


Tabla 7. Cinética de Crecimiento de *Salmonella enteritidis*

Figura 14. Evolución de la velocidad de crecimiento. Absorbancia por unidad de tiempo en *Salmonella enteritidis*.



Staphylococcus aureus

En la Tabla 8 se muestran los valores de la cinética de crecimiento y su correspondiente grafica en la Figura 15.

Tiempo en horas (t)	Velocidad Crecimiento ($\frac{\text{Absorbancia}}{t}$)
0	0
6	0,0007
12	0,0083
18	0,0112
24	0,0095
36	0,0078
48	0,0056
60	0,0048
72	0,0027

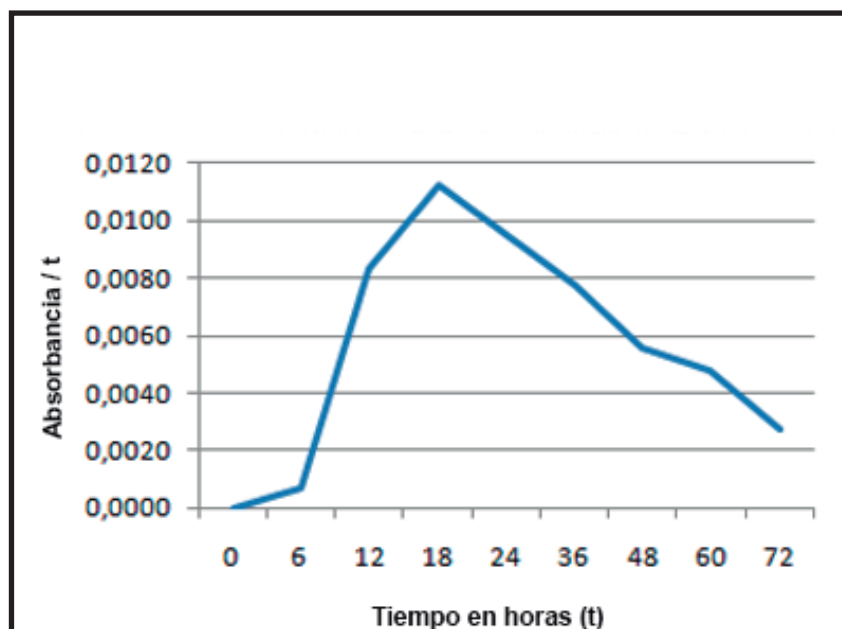


Tabla 8. Cinética de Crecimiento de *Staphylococcus aureus*

Figura 15. Evolución de la velocidad de crecimiento. Absorbancia por unidad de tiempo en *Staphylococcus aureus*.

El valor de velocidad de crecimiento máximo, determina el punto límite entre la fase exponencial y fase estacionaria de cada uno de los cultivos bacterianos. Los ensayos realizados a cada una de las cepas arrojó los siguientes resultados:

<i>Lactobacillus arizonensis</i> NRRLB-14768	09 horas
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	12 horas
<i>Staphylococcus aureus</i> ISO 6888-1	18 horas

Efecto inhibitorio in vitro de *Lactobacillus arizonensis*

Evaluando las placas para determinar dicho efecto, se observó la existencia de halos inhibitorios en los medios con cultivos de bacterias patógenas (*Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*). Los diámetros de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes libres de células de los ensilados por la cepa *L. arizonensis*, fueron evidentes para ambos (Tabla 9). En la Figura 16 se distinguen los halos inhibitorios en cada una de las placas.

Placas con cultivos de:	Halos inhibitorios producidos por <i>L. arizonensis</i> en mm
<i>Salmonella enteritidis</i>	11 +/- 1,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,33 +/- 0,57

Tabla 9. Resultados del ensayo de inhibición in vitro de *L. arizonensis* sobre cultivos de *S. enteritidis* y *S. aureus*

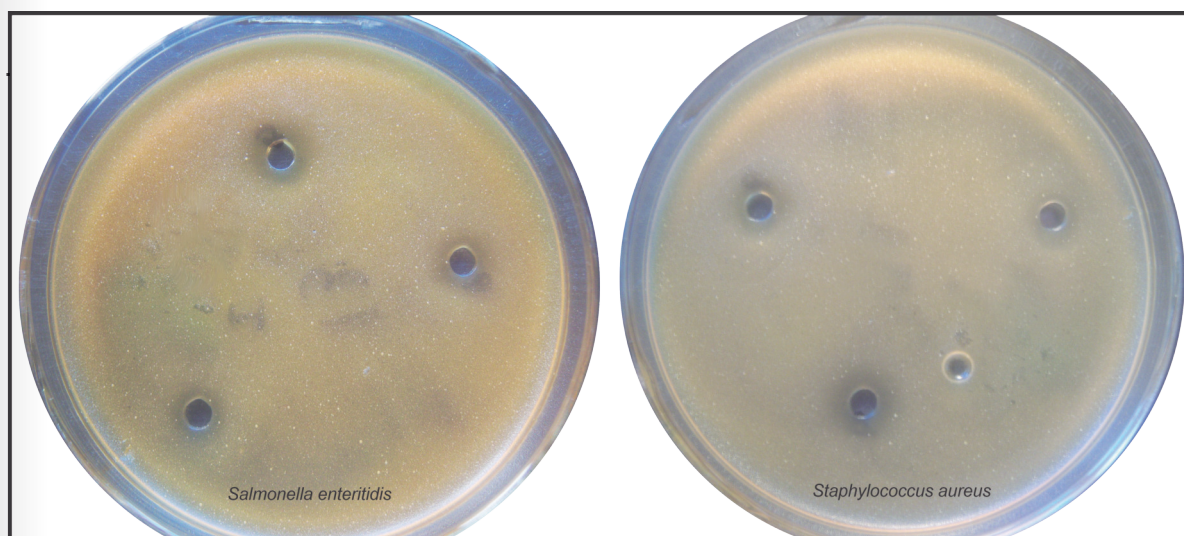


Figura 16. Halos inhibitorios producidos por *L.arizonensis* en los cultivos de *S.enteritidis* y *S. aureus*

Ensayo de inhibición de BAL a los patógenos en los ensilados de residuos pesqueros

Los resultados de los efectos inhibitorios se presentan en tablas y gráficos, para *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus*.

En ambos casos se efectuó un Ensayo **Control** y un Ensayo **Tratamiento**. En el primero se realizó el cultivo de cada una de las cepas patógenas en el medio de residuo de pescado con la solución de sacarosa (2,5 %). En el segundo caso se realizó el cultivo en el mismo medio, con el inóculo de cada una de las cepas patógenas conjuntamente con la bacteria láctica *Lactobacillus arizonensis*. Los inóculos se realizaron en el tiempo (t) de la *Vmax* de cada una de las cepas.

Para le Ensayo tratamiento con *Salmonella enteritidis*:

Inóculo *S. enteritidis*: 12 horas después del repique en caldo de cultivo BHI.

Inóculo BAL: 9 horas después del repique en caldo de cultivo MRS.

En el momento de realizar los inóculos, ambas cepas se encontraban en su máximo potencial de crecimiento.

Para le Ensayo tratamiento con *Staphylococcus aureus*:

Inóculo *S. aureus*: 18 horas después del repique en caldo de cultivo BHI.

Inóculo BAL: 9 horas después del repique en caldo de cultivo MRS.

En el momento de realizar los inóculos, ambas cepas se encontraban en su máximo potencial de crecimiento.



En la Figura 18 se presentan los datos de los Ensayos Control y Tratamiento para *Salmonella enteritidis*.

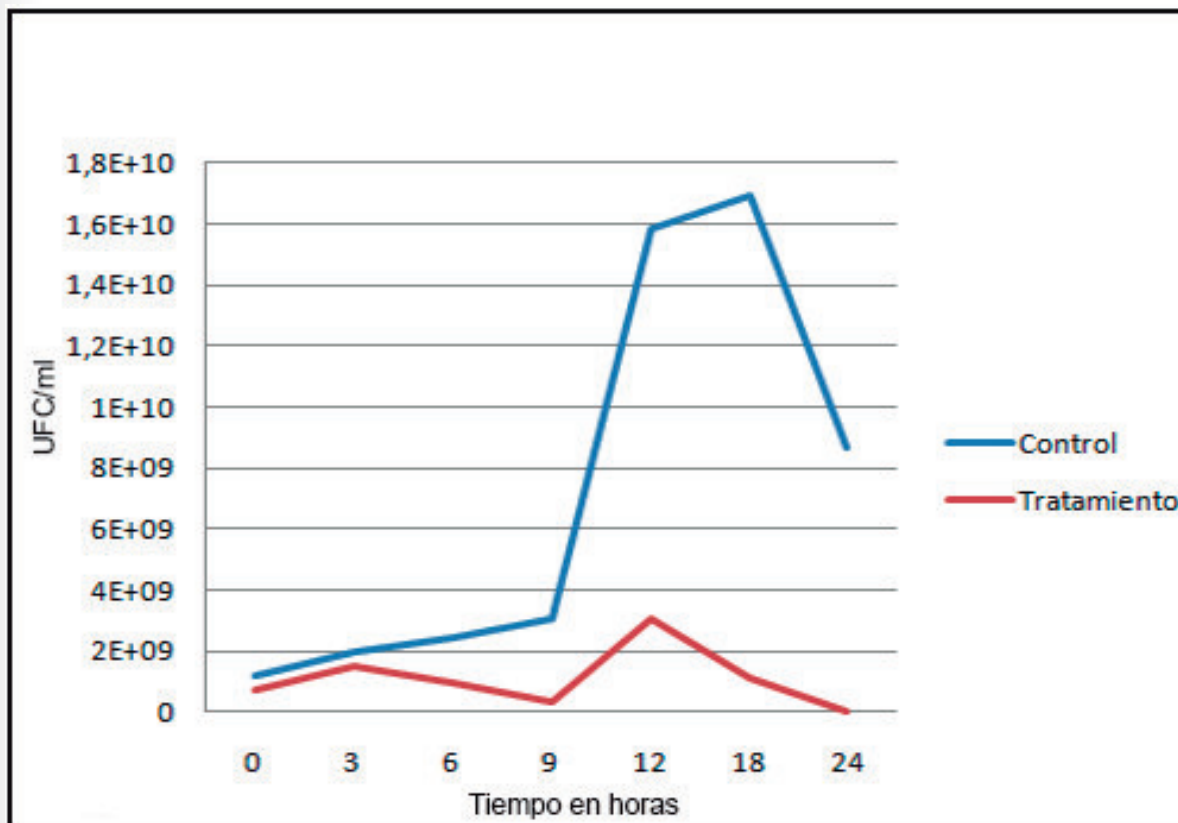


Figura 18. Evolución del Crecimiento de *Salmonella enteritidis* en medio de cultivo pescado fresco con solución de sacarosa, sin (control) y con (tratamiento) inóculo de *Lactobacilus arizonensis*.

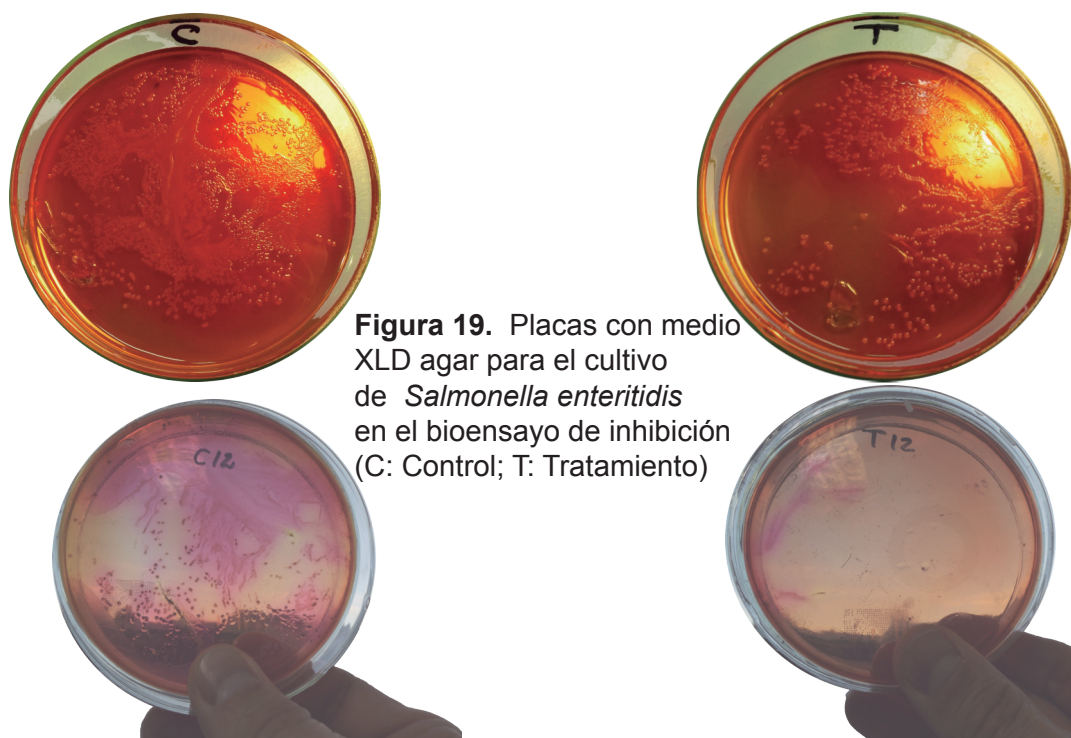


Figura 19. Placas con medio XLD agar para el cultivo de *Salmonella enteritidis* en el bioensayo de inhibición (C: Control; T: Tratamiento)



Bioensayo de inhibición competitiva con *Salmonella enteritidis*

En la Tabla 11 se presentan los datos del Ensayo Control y en la Tabla 12 los correspondientes al Ensayo Tratamiento, inóculos conjunto de *S. enteritidis* y *L. arizonensis*. En la Figura 19 se presentan algunos ejemplos de los dos tipos de cultivos.

Tiempo en horas	Promedio recuentos UFC	UFC x factor dilución	UFC en superficie total de placa	UFC/ml
0	53,67	5367,00	60840,31	1216806240
3	86,67	8667,00	98249,11	1964982240
6	107,00	10700,00	121295,20	2425904000
9	135,67	13567,00	153795,51	3075910240
12	140,00	28000,00	317408,00	1,587E+10
18	149,67	29934,00	339331,82	1,6967E+10
24	76,33	15266,00	173055,38	8652768800

Tabla 11 Recuento de colonias de *S. enteritidis* en bioensayo Control

Tiempo en horas	Promedio recuentos UFC	UFC x factor dilución	UFC en Superficie total de placa	UFC/ml
0	33,33	3333,00	37782,89	755657760
3	65,50	6550,00	74250,80	1485016000
6	43,33	4333,00	49118,89	982377760
9	15,00	1500,00	17004,00	340080000
12	27,00	5400,00	61214,40	3060720000
18	10,00	2000,00	22672,00	1133600000
24	0,33	66,00	748,18	37408800

Tabla 12. Recuento de colonias de *S. enteritidis* en bioensayo Tratamiento



Bioensayo de inhibición competitiva con *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 13 se presentan los datos del Ensayo Control y en la Tabla 14 los correspondientes al Ensayo Tratamiento, inóculos conjunto de *S. aureus* y *L. arizonensis*. En la Figura 21 se presentan ejemplos de los dos tipos de cultivos.

Tiempo en horas	Promedio recuentos UFC	UFC x factor dilución	UFC en superficie total de placa	UFC/ml
0	36,67	3667,00	41569,11	831382240
3	48,67	4867,00	55172,31	1103446240
6	159,33	15933,00	180616,49	3612329760
9	16,333	1633,30	18515,09	370301776
12	45,33	9066,00	102772,18	4110887040
18	37,67	7534,00	85405,42	3416216960
24	163,33	32666,00	370301,78	1,4812E+10

Tabla 13. Recuento de colonias de *S. aureus* en bioensayo Control

Tiempo en horas	Promedio recuentos UFC	UFC x factor dilución	UFC en superficie total de placa	UFC/ml
0	35,67	3567,00	40435,51	808710240
3	36,00	3600,00	40809,60	816192000
6	25,33	2533,00	28714,09	574281760
9	8,33	833,00	9442,89	188857760
12	4,00	800,00	9068,80	362752000
18	1,00	200,00	2267,20	90688000
24	0,33	66,00	748,18	29927040

Tabla 14. Recuento de colonias de *S. aureus* en bioensayo Tratamiento



En la Figura 20 se presentan los datos de los Ensayos Control y Tratamiento para *Staphylococcus aureus*.

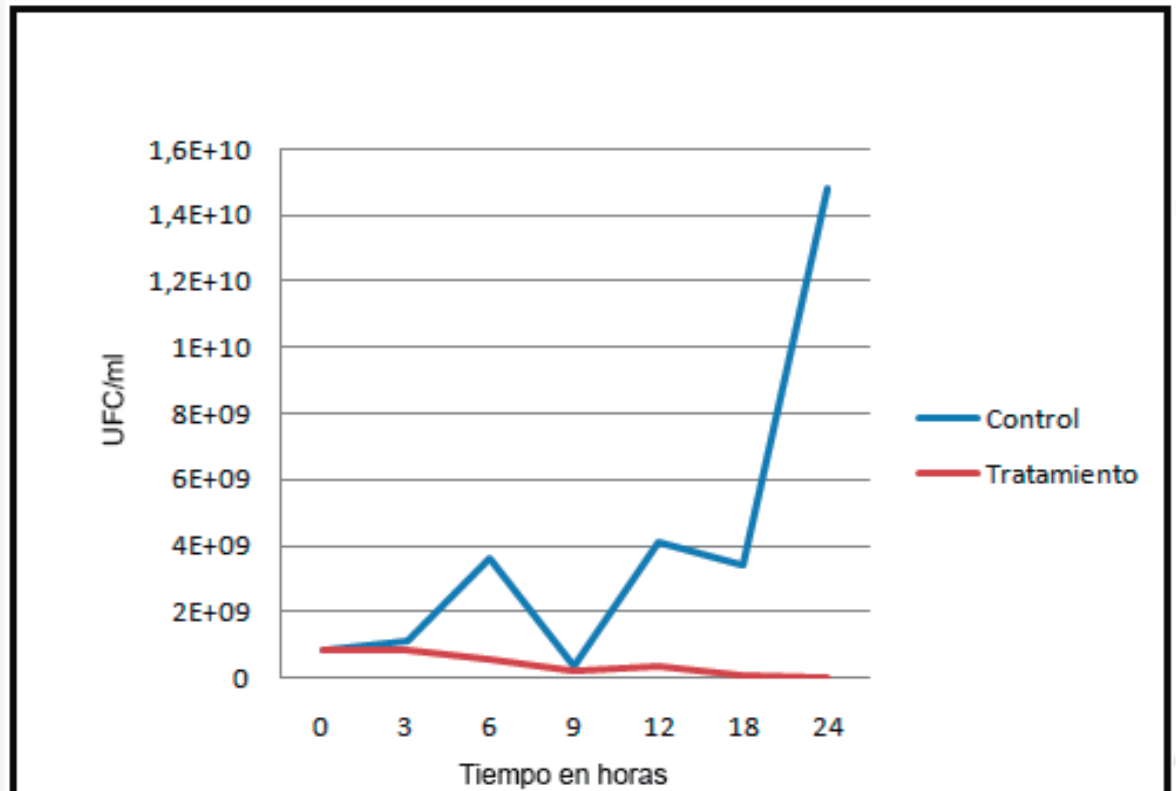


Figura 20. Evolución del Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo de pescado fresco con solución de sacarosa, sin (control) y con (tratamiento) inóculo de *Lactobacillus arizonensis*.

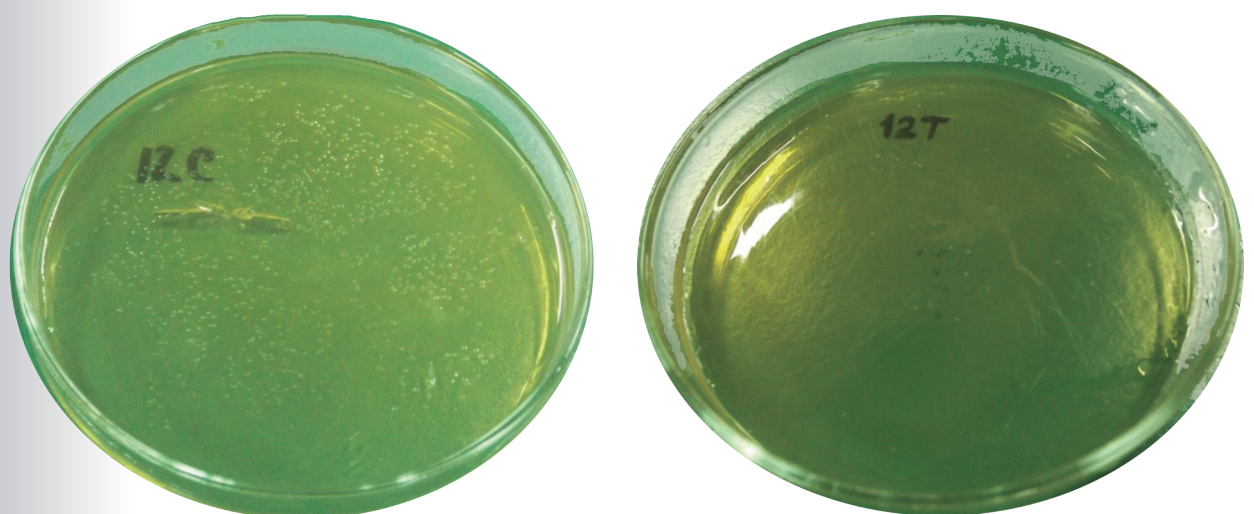


Figura 21. Placas con medio Baird Parker agar para el cultivos de *Staphylococcus aureus* en el bioensayo de inhibición (C: Control; T: Tratamiento)



Cálculo del Porcentaje de Inhibición.

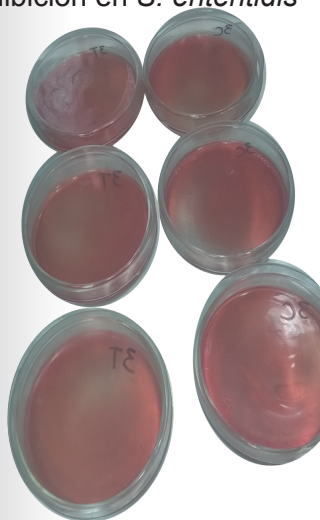
Aplicación de las fórmulas:

$$\% \text{ ufc/ml tratamiento} = \frac{\text{ufc/ml trat.} \times 100 \%}{\text{ufc/ml ctrl.}}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ ufc/ml tratamiento}$$

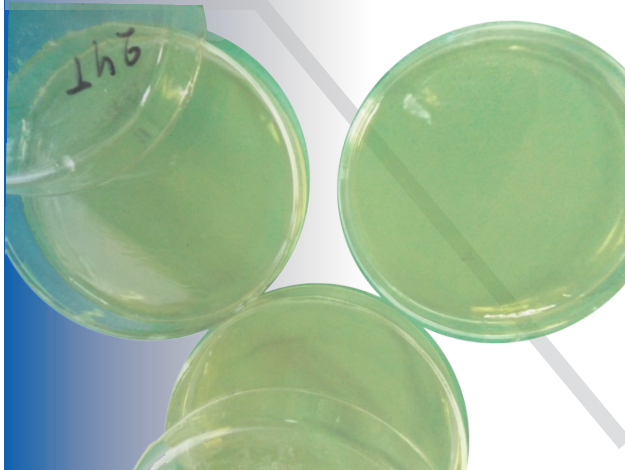
En las Tablas 15 y 16 se observan en la segunda columna la diferencia entre las UFC/ml del cultivo Control y las UFC/ml del cultivo Tratamiento para cada hora específica, en ambas especies (*S. enteritidis* y *S. aureus*). Esa diferencia permite calcular cual es la proporción del Ensayo Tratamiento respecto del Ensayo Control.

Tabla 15. Cálculos para establecer el porcentaje de inhibición en *S. enteritidis*



Tiempo en horas	UFC/mIC - UFC/mIT	Porcentaje UFC/ml Tratam. respecto a las UFC/ml Control	Porcentaje de inhibición de las UFC/ml <i>S. enteritidis</i>
0	460997333,3	62,11	37,89
3	479890666,7	75,58	24,42
6	1443450667	40,50	59,50
9	2735754667	11,06	88,94
12	12809680000	19,29	80,71
18	15832613333	6,68	93,32
24	8615360000	0,44	99,56

Tabla 16. Cálculos para establecer el porcentaje de inhibición en *S. aureus*



Tiempo en horas	UFC/mIC - UFC/mIT	Porcentaje UFC/ml Tratam. respecto a las UFC/ml Control	Porcentaje de inhibición de las UFC/ml <i>S. aureus</i>
0	22672000	97,27	2,73
3	287178666,7	73,97	26,03
6	3038048000	15,90	84,10
9	181376000	51,02	48,98
12	3748437333	8,82	91,18
18	3325226667	2,65	97,35
24	14782144000	0,20	99,80



En las Figuras 22 y 23 se observa como aumenta el porcentaje de inhibición en función del tiempo, hasta **casi** la eliminación total de las cepas patógenas cumplidas las 24 horas.

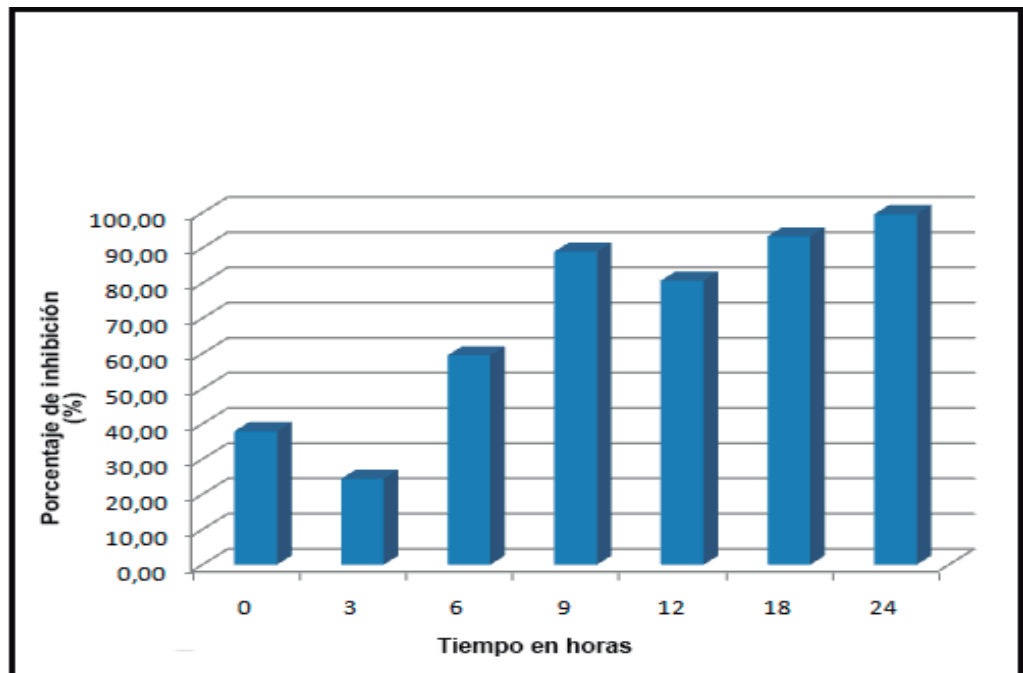


Figura 22. Evolución de la inhibición de crecimiento de *S. enteritidis* a causa del efecto antagonista de *L. arizonensis*.

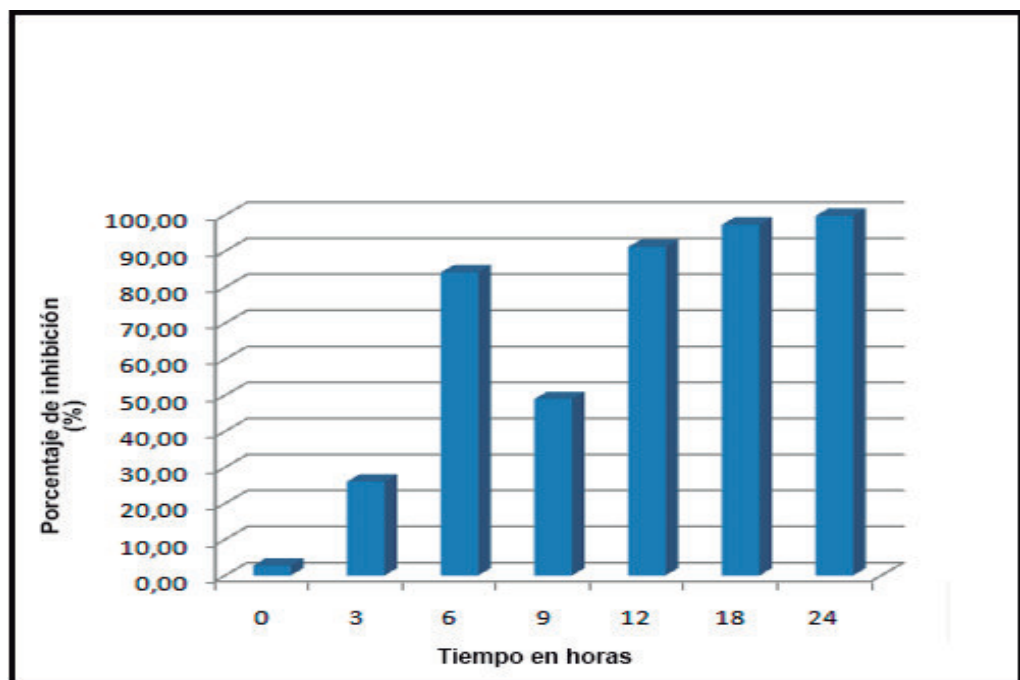


Figura 23. Evolución de la inhibición de crecimiento de *S. aureus* a causa del efecto antagonista de *L. arizonensis*.



En la Figura 24 se observan en detalle las UFC de *S. enteritidis* con la reacción SH₂ positivo, que es el color sombreado en el centro de algunas colonias. Esta reacción es característica e identifica el género *Salmonella*. En la Figura 25 se observa en detalle las colonias de *S. aureus* en medio Baird Parker. La cuadrícula de fondo en la figura, es la que se usó para realizar los recuentos.

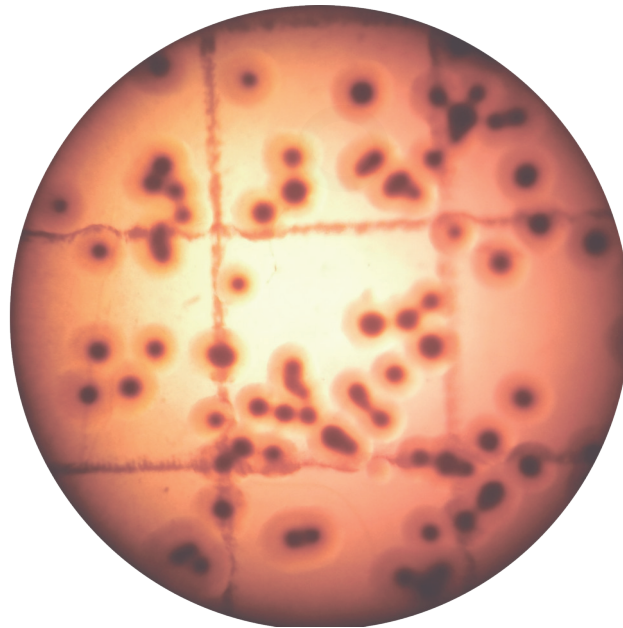


Figura 24. Imagen tomada desde el objetivo de la Lupa óptica para realizar el recuento de UFC. En la misma se observan las colonias con el centro negro.

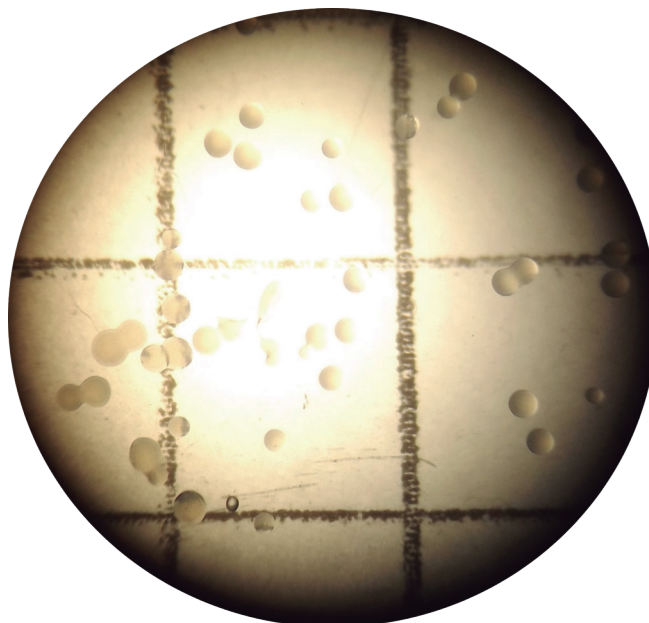


Figura 25. Imagen tomada desde el objetivo de la Lupa optica para realizar el recuento de UFC en cultivos de *S. aureus*.



Discusión

La construcción de las curvas de crecimiento de las cepas evaluadas en el sustrato específico de los desechos de pescado, nos permitió reconocer el momento de mayor velocidad de crecimiento de cada cepa en esas condiciones. Los cálculos confirman que el valor de mayor velocidad de crecimiento define el punto límite de la fase exponencial con la fase estacionaria y nos indica que el momento de mayor potencial de los cultivos de *L. arizonensis* es 9 horas, mientras que para *S. enteritidis* y *S. aureus* es 12 y 18 horas respectivamente. La definición de este valor para cada cepa, nos permitió definir el momento de máximo potencial de cada cultivo, a fin de poder evaluar la capacidad inhibitoria de *L. arizonensis*, en la fase de los cultivos donde los microorganismos se encuentran en mayor actividad.

La correlación entre las variables Recuento de UFC y Absorbancia, constituye una herramienta útil al momento de poder comparar cultivos en diferentes sustratos y simplifica su evaluación e interpretación, ya sea que se haya utilizado un método o el otro.

Los resultados obtenidos en cuanto a la velocidad de crecimiento, permitieron conocer el momento más adecuado para extraer el inóculo de cada una de las cepas desde cultivos iniciadores, para ser utilizadas en el proceso en ensilados de pescado.

Estos resultados, sumados a la alta tolerancia a pH ácido, sales biliares y temperatura (Góngora, 2013), permiten suponer que la cepa *L. arizonensis* presenta características apropiadas para ser utilizadas en el proceso de ensilado.

El conteo de colonias de cada cepa patógena, mostró que el efecto antagonista del ensilado elaborado con *Lactobacillus arizonensis* sobre los patógenos *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 y *Staphylococcus aureus* ISO 6888-1 fue progresivo y gradual hasta casi su eliminación (mas del 99 %), a las 24 horas de haberse inoculado.

La medición del halo inhibitorio en los cultivos de *S. enteritidis* y *S. aureus*, cuando fueron inoculados con los extractos de ensilado de pescado elaborado con *L. arizonensis*, fue un método que permitió confirmar el efecto antagonista del subproducto sobre los patógenos.

La transferencia de estos resultados a escala industrial del proceso de recuperación de desechos mediante esta metodología, facilitaría el tratamiento de grandes volúmenes de residuos pesqueros en poco tiempo, a menores costos y sin utilizar altas temperaturas, como sucede en la fabricación de harina de pescado.

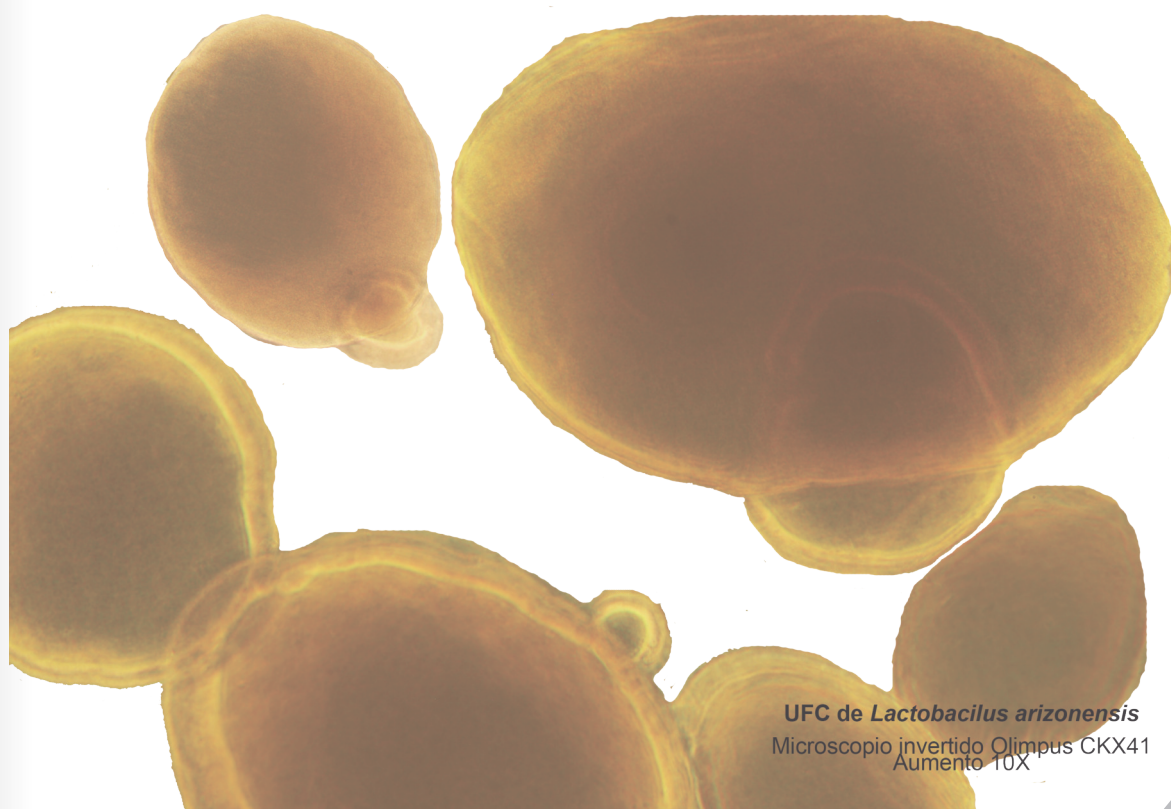


Al llevar el proceso a escala industrial, podría suponerse que la necesidad de contar con un fermentador industrial y personal técnico capacitado para el mantenimiento de las cepas se vea como una dificultad. Sin embargo las ventajas que adquiere la elaboración del subproducto (ensilado) en la eliminación de los patógenos, como así también en la alimentación de animales (Góngora, 2013), parece justificar la utilización del proceso propuesto.

Conclusiones

El proceso de ensilado biológico utilizando la cepa *L. arizonensis* para acidificar el medio de pescado, ha demostrado ser una metodología eficiente para reducir la presencia de patógenos como *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* en los desechos de pescado.

Esto tiene gran importancia, ya que cuando se incorpora ensilado de pescado elaborado con *Lactobacillus arizonensis* a la elaboración de alimentos, se garantiza que la carga bacteriana protagonizada por las cepas analizadas, puedan ser disminuidas y/o eliminadas.



UFC de *Lactobacillus arizonensis*
Microscopio invertido Olympus CKX41
Aumento 10X



Perfil de acidificación de *Lactobacillus arizonensis* en la elaboración de ensilados de pescado.

Como parte de la ejecución de los proyectos citados, “Aprovechamiento integral de las capturas - Estrategias para la reutilización de desechos pesqueros” y “Desarrollo de alimentos balanceados en Chubut”, se realizaron distintos análisis, entre los que se cuenta el referido al proceso de acidificación de *L. arizonensis* en medios de residuos de pescado. En ese estudio quedó demostrado que la disminución del pH en la elaboración de ensilado de residuo de pescado mostró una variación importante entre las nueve y doce horas de iniciado el proceso (Tabla 10). La tendencia de la curva, muestra una marcada disminución del pH en ese período de tiempo (Figura 17).

Medio elaborado con desecho de pescado	pH observados durante el proceso de ensilado								
	0 hs.	3 hs.	6 hs.	9 hs.	12 hs.	15 hs.	18 hs.	24 hs.	48 hs.
Medio + sac 2,5 %(1)	6,89	6,80	5,50	4,45	4,40	4,26	4,19	4,04	3,86
Medio + sac 2,5 %(2)	6,98	6,95	5,75	4,50	4,51	4,30	4,21	4,05	3,95
Medio + sac 2,5 %(3)	6,93	6,90	5,30	3,94	3,95	3,89	3,89	3,88	4,00
PROMEDIO pH	6,93	6,88	5,52	4,30	4,29	4,15	4,10	3,99	3,94

Tabla 10. Variación de los valores de pH en ensilados de desechos de *M. hubbsi* con *L arizonensis* con el agregado de sacarosa. Los valores son el promedio de tres réplicas

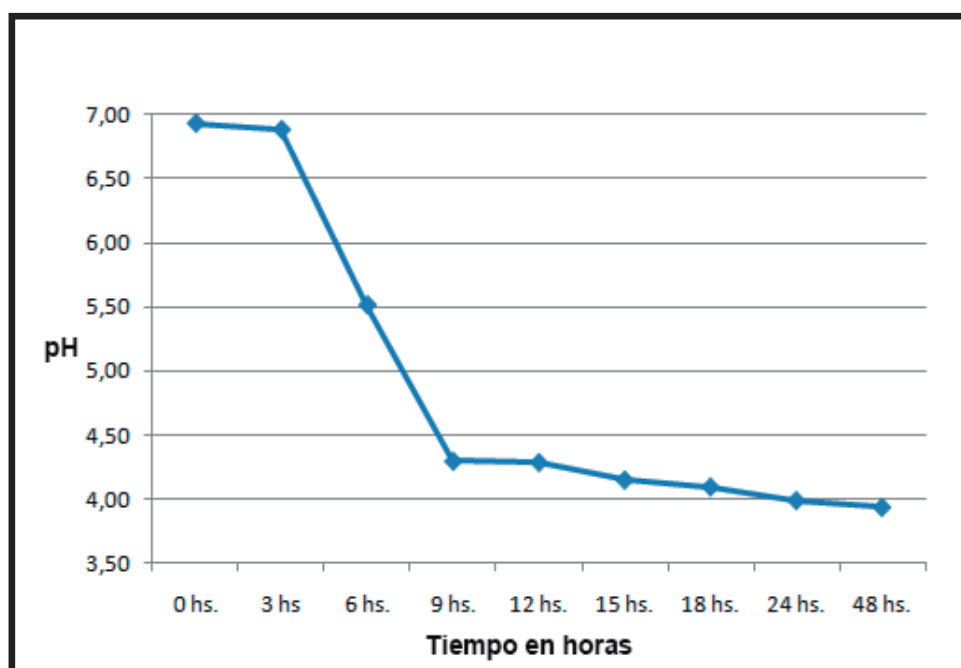


Figura 17. Curva de variación de pH en el proceso de ensilado de desechos de pescado (*M. hubbsi*)

Bibliografía

- Alakomi, H-L.; Skyttä, E.; Saarela, M.; Mattila-Sandholm, T.; Latva-Kala, K. y Helander, I. M. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2001 – 2005.
- Alonso Melero, Maria Rosa. 1994. Nuevo marcador epidemiológico en *Salmonella enterica* subespecie 1, serotipo Enteritidis. Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. 1:2-9.
- Borghesi, R. 2004. Avaliação físico-química, nutricional e biológica das silagens ácida, biológica e enzimática elaboradas com descarte e residuo do eneficiamento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tesis para obtener el título de Master en Ciencias, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de São Paulo, 96 pp.
- Calo-Mata, P.; Arlindo, S.; Boehme, K.; de Miguel, T.; Pascoal, A. y Barros-Velázquez, J. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technology*, 1: 43 - 63.
- Castillo, A.; Lucia, L. M.; Goodson, K. J.; Savell, J. W.; Acuff, G. R. 1998. Comparison of Water Wash, Trimming, and Combined Hot Water and Lactic Acid Treatments for Reducing Bacteria of Fecal Origin on Beef Carcasses. *Journal of Food Protection*®. 61 (7): 823-828.
- Dapkevicius M. L. N. E.; Nout M. J. R.; Rombouts F. M.; Houben J. H.; Wymenga W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms International. *Journal of food microbiology* 2000. 57(1-2): 107-114.
- Daniel, Wayne W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 1977. Versión española. Editorial Limusa S.A. Impreso en Mexico.
- Escobar, Luis Fernando; Carlos Andrés Rojas, Germán A. Giraldo G. y Leonardo Padilla Sanabria. 2010. Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche de vacuno. Universidad de Quindío. Revista Investigación Universidad Quindío. Armenia. Colombia (20): 42-49.
- FAO, 2001. El Estado de las Pesquerías Mundiales y la Acuicultura. Informe Técnico. Roma, FAO. 43 p.
- Franklin D. Lowy , 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society. 520-531.



- González, Dayana Acebo y Armando T. Hernández García. 2013. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 44 (1). ISSN electrónica 2221-2450. (<http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB>)
- Góngora, Hernán. 2013. Optimización de los procesos de ensilado de pescado y nuevas aplicaciones en la alimentación animal. Tesis Doctoral. Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Comahue.
- Hudault. Sylvie, Vanessa Lievin, Marie Françoise Bernet-Camard, and Alain I. Servin. 1997. Antagonistic Activity Exerted In Vitro and In Vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 Infection. Applied and Environmental Microbiology. Paris. Francia. American Society for Microbiology. 63 (2): 513–518.
- Kostinek, M.; Pukall, R.; Rooney, A.P.; Schillinger, U.; Hertel, C.; Holzapfel, W.H. y Franz, C.M.A.P. 2005. *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 2485–2489.
- Larrea C., Hernani; Martha Flórez F. y José Huapaya. Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. Revista Horizonte Médico, 7 (1).
- Lebeer, S.; Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S. C. J. 2008. Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 72(4): 728 – 764.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 2012. Sistema Estadístico de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura (www.minagri.gob.ar)
- Moghaddam, M. Zarringhalam; M. Sattari; A.M. Mobarez y F. Doctorzadeh. 2006. Inhibitory effect of yogurt *Lactobacilli* bacteriocins on growth and verotoxins production of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Pakistan Journal of Biological Sciences. ISSN 1020-8880. Asian Network for Scientific Information. 9 (11): 2112-2116.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P y Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84(5–6): 593–604.
- Palloni, Leyla. 2012. Diagnóstico de la gestión ambiental de tres mataderos - frigoríficos de la localidad de Gaiman. Informe de Práctica Profesional. Licenciatura en Protección y Saneamiento Ambiental. Facultad de Ciencias Naturales. UNPSJB. Sede Trelew.



- Perez Granados, Raquel y Villaverde Peris, Maria del Carmen. 1997. Fisiología Bacteriana: Funciones de Relación. Microbiología. Madrid. España. ISBN 84-9732-123-5. Editorial Paraninfo. Tomo I. pp 62-63.
- Pons Ballbé, R. 2004. Cómo eliminar y valorizar los residuos de mataderos. Ing. Química. Madrid. España. ISSN 0210-2064. 414: 201-206.
- Ramirez-Ramirez, J.C.; Huerta, S.; Arias, L.; Prado, A. y Shirai, K. 2008. Utilization of fisheries by-catch and processing wastes for lactic acid fermented silage and evaluation of degree of protein hydrolysis and in Vitro digestibility. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 7(3): 195 – 204.
- Ranjit, N.K. y Kung, L.Jr. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum* or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. Journal of Dairy Science, 83: 526 – 535.
- Salminen, S.; Von Wright, A. y Ouawehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3th Edition. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York,, USA. pp 628.
- Sarsa, Graciela; Góngora, Hernan y Góngora, María Eva. 2015. Aprovechamiento integral de las capturas: Elaboración de subproductos a partir de residuos pesqueros Caracterización y cuantificación de los residuos pesqueros de las plantas de la Provincia del Chubut. UNPSJB. Facultad de Ciencias Naturales. Trelew, Chubut, Argentina.
- Skrede, A. y Nes, I. F. 1988. Slaughterhouse by-products preserved by *Lactobacillus plantarum* fermentation as feed for mink and foxes. Animal Feed Science Technology 20: 287-298.
- Swezey, J.L.; Nakamura, L.K.; Abbott, T.P. y Peterson, R.E. 2000. *Lactobacillus arizonensis* sp. nov., isolated from jojoba meal. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50:1803–1809.
- Todorov, S.D. y Dicks, L.M.T. 2005. Effect of growth médium on Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. Food Technology and Biotechnology, 43(2): 165 – 173.
- Zamora Rodríguez, Lucero Marlene. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de Bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de Matadero. Tesis Doctoral (pp 1-3) Universidad de Girona. Departamento de Ingeniería Química Agraria y Tecnología Agroalimentaria. ISBN 84-689-3756-8. Instituto de Tecnología Agroalimentaria.



Anexo I

PROTOCOLO PARA EL TRABAJO CON MICROORGANISMOS EN LOS LABORATORIOS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Desarrollado para el trabajo de Tesis de Licenciatura en Protección y Saneamiento Ambiental:

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE ENSILADOS MICROBIOLÓGICOS SOBRE DESECHOS PESQUEROS

Tesista: Tec.Univ.Prot.Amb Andres Maldonado

Director: Dr. Hernan Gongora

Introducción

Para el trabajo de Tesis se realizarán tareas para lograr un óptimo crecimiento de poblaciones bacterianas de manera controlada con los medios de que se disponen. Se llevaran a cabo operaciones de calibración, registro y control de cepas de referencia en stocks propios y cedidos por otros laboratorios. Estas se efectuarán con métodos de referencia validados.

Personal

Los ensayos microbiológicos son realizados y supervisados por el Dr. Hernan G. Gongora conjuntamente con el alumno tesista Andres Maldonado

Ambiente de Trabajo

Se dispondrá de las instalaciones de los Laboratorios de Química y Biología del Edificio de Aulas de la UNPSJB Sede Trelew. Cuando se realicen tareas con microorganismos detallados en el Grupo 2 de riesgo se:

1. Avisará a las autoridades de la Facultad de Ciencias Naturales
2. Restringirá el ingreso para solo el personal autorizado
3. Informará a todo el personal de los procedimientos de ingreso y salida
4. Usarán elementos de protección Personal
5. Expondrá cartelera que detalla lo siguiente:

- **Signo de riesgo:** Nivel 2
- **Especies:** *Lactobacillus arizonensis*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*
- **Nombre profesional responsable en caso de accidentes:** Dr. Hernan Gongora. Ing. Felix Vidal (responsable de SHyMA)
- **Requerimientos de Elementos de Protección Personal (EPP):** Guardapolvo, Gafas, Barbijo y Guantes.





Equipamiento

El equipamiento de uso en los laboratorios para el trabajo de Tesis constara de una campana, mecheros, estufa, baño térmico, centrífuga y heladera con freezer.

En cuanto a los efectos de prevención de siniestros se cuenta con sistema de ducha y lavado de ojos, extintores del tipo ABC, baldes con arena/material absorbente y salida de emergencia

Reactivos y medios de cultivos

Soluciones de MRS, Agar, BHI y Buffer PBS

ELEMENTOS DE PROTECCION PERSONAL





Indice

Indice General

Página

Abreviaturas	2
Introducción	3
-Cinética de crecimiento microbiano	6
-Cinética de la fase exponencial en el crecimiento microbiano	8
-Crecimiento Exponencial. Pendiente de la Gráfica	9
Caracterización de Bacterias	10
Hipótesis de Trabajo	11
Objetivos	12
Material y Métodos	12
-Cinética Crecimiento <i>Lactobacillus arizonensis</i>	13
-Análisis estadístico	15
-Cinética Crecimiento <i>S. enteritidis</i> y <i>S. aureus</i>	15
-Efecto Inhibitorio de <i>L. arizonensis</i> in vitro	16
-Evaluación del efecto del proceso de ensilado con <i>L. arizonensis</i>	16
Resultados	19
-Ensayo de inhibición de BAL a los patógenos	26
-Perfil de acidificación de <i>L. arizonensis</i>	27
-Bioensayos de inhibición competitiva	28
-Cálculos de los porcentaje de inhibición	32
Discusión	35
Conclusiones	36
Bibliografía	37
Referencias páginas Web	40
Anexo I	41



Referencias páginas Web

Becton Dickinson GmbH. (Abril, 2013) BD Brain Heart Infusion (BHI) Agar [Ficha Técnica PDF]. Recuperado de <http://www.bd.com/europe/regulatory/>.

Becton Dickinson GmbH. (Abril, 2013) BD XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar) [Ficha Técnica PDF]. Recuperado de <http://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D8783>.

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. (Octubre, 2015). Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Recuperado de <http://www.testak.org/microbiologia/crecimiento/>

Drug Resistance (Setiembre, 2014) Medical illustration of Shigellia [web site]. Recuperado de <https://www.pinterest.com/cdcgov/drug-resistance/>.

Laboratorios Britania S.A. (Febrero, 2000) M.R.S. agar [Ficha Técnica PDF]. Recuperado de http://www.britanialab.com/productos/404_hoja_tecnica_es.pdf.

Medline (Setiembre, 2014). Temas de Salud [web site]. Recuperado de https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=staphylococcus aureus.