



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL CLORURO DE SODIO
EMPLEADO EN SALMUERA PARA EL ENFRIAMIENTO DE SALCHICHAS**

ROSA ANGÉLICA CADENA GUTIÉRREZ

C.C 1065904220

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2019



**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL CLORURO DE SODIO
EMPLEADO EN SALMUERA PARA EL ENFRIAMIENTO DE SALCHICHAS**

ROSA ANGÉLICA CADENA GUTIÉRREZ

C.C 1065904220

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE
MICROBIÓLOGA.**

TUTORA

PhD. RAQUEL AMANDA VILLAMIZAR GALLARDO

CAROL ROCIO BUITRAGO ROZO

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA, COLOMBIA**

2019



Nota de aceptación:

Firma del Primer Jurado

Firma del Segundo Jurado

**Pamplona, Norte de Santander
Colombia**



DEDICATORIA

Principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que más he soñado. Me siento muy orgullosa y privilegiada de ser su hija, son los mejores padres.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa.

A todas las personas que apoyaron y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

Finalmente quiero dedicar este proyecto a todos mis amigos, por apoyarme cuando más los necesité, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.



AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, por sus maravillosas e infinitas bendiciones y por permitirme alcanzar un logro más en mi vida.

A mis Padres, por su tenacidad y lucha insaciable que han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para mis hermanos y familia en general.

A mi familia y amigos, por confiar plenamente en mí, por su apoyo incondicional y por hacer posible este sueño.

A mis mentores, que durante el transcurso de este proyecto contribuyeron para alcanzar este objetivo, uno de los tantos que vendrán.

A los docentes del departamento de microbiología de la Universidad de Pamplona, por la enseñanza de sus valiosos conocimientos que nos hacen crecer día a día como profesionales, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación y orientación.

A mi tutora, la Doctora Raquel Villamizar, por su dirección, entrega y valiosos consejos que me permitieron alcanzar los objetivos de este proyecto.

Al Grupo de investigación NANOSOST que me abrió las puertas y fortaleció mi espíritu investigador, por los logros alcanzados y conocimientos brindados.



TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVOS	13
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. MARCO TEÓRICO.....	16
3.2 Marco histórico:	16
3.3 Operaciones de elaboración de salchichas:	16
3.3.1 Emulsificación	16
3.3.2 Embutido	17
3.3.3 Enfriamiento.	17
3.4 Clasificación de las salchichas	17
3.4.1 Salchichas frescas.....	17
3.4.2 Salchichas cocidas y ahumadas.....	17
3.4.3 Salchichas secas.....	18
3.5 Salmuera	18
3.6 Efecto del cloruro de sodio en las salchichas	19
3.7 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
3.8 Estudio epidemiológico.....	20
3.9 Bacterias ácido lácticas	20
4. MARCO LEGAL	22
4.1 Ley 23 del 12 de diciembre de 1973.....	22
4.2 Ley 9 de 1979.....	22
4.3 Decreto 3930 del 2010	22
4.4 La Resolución 0631 de 2015 reglamenta el artículo 28 del Decreto 3930 de 2010 y actualiza el Decreto 1594 de 1984 (vigente desde hace 30 años)	23



4.5 Norma Técnica Colombiana 1325 (NTC)	23
5. MARCO DE REFERENCIA	24
6. METODOLOGÍA	27
6.1 Preparación de concentraciones de la salmuera:	27
6.2 Caracterización de las bacterias ácido lácticas en la salmuera	27
6.3 Cultivos bacterianos	27
6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de macrodilución.	28
6.5 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).	28
6.6 Reducción logarítmica de las cepas analizadas	28
7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	29
8. RESULTADOS Y DISCUSION	30
8.1 Caracterización de cepa ácido láctica.	30
8.2 Determinación de la Concertación Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) sobre las cepas evaluadas.	31
8.3 Evaluación de la efectividad de las concentraciones de sal (NaCl) mediante la reducción logarítmica (log) de las bacterias analizadas	33
9. CONCLUSIONES	37
10. RECOMENDACIONES	38
11. BIBLIOGRAFIAS	39
12. ANEXOS	44



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Determinación del CMI y CMB de <i>E. faecium</i> mediante la Absorbancia a 600nm.	45
Tabla 2. Determinación del CMB de <i>Listeria monocytogenes</i> mediante la Absorbancia a 600nm.	45
Tabla 3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del NaCl sobre <i>E. faecium</i>	46
Tabla 4. Determinación de la concentración mínima bactericida del NaCl (CMB) sobre <i>L. monocytogenes</i>	46
Tabla 5. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la reducción logarítmica de <i>E. faecium</i> a 35°C.....	47
Tabla 6. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la reducción logarítmica de <i>L. monocytogenes</i> a 35°C.....	48



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento macroscópico de la cepa <i>E.faecium</i> en agar sangre y medio APT.	30
Figura 2. Comportamiento de las bacterias ácido lácticas frente a las concentraciones de sal a diferentes temperaturas	31
Figura 3. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> frente a las concentraciones de sal a diferentes temperaturas.....	32
Figura 4. Comparación del efecto de la concentración de sal a diferentes temperaturas sobre <i>L. monocytogenes</i>	34
Figura 5. Comparación del efecto de la concentración de sal a diferentes temperaturas sobre <i>E. faecium</i>	35



LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Caracterización de la cepa autóctona presente en la salmuera.	44
ANEXO 2. Absorbancias realizadas de las cepas evaluadas a diferentes concentraciones de NaCl y temperaturas.....	45
ANEXO 3. Datos correspondientes para la determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de <i>E. faecium</i> y <i>L. monocytogenes</i>	46
ANEXO 4. Datos de los ensayos realizados para establecer la reducción logarítmica de las cepas por el porcentaje NaCl empleado.	47



INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos a base de emulsión desempeñan un papel importante en las industrias cárnicas. Entre los diversos productos en emulsión se encuentran las salchichas, las cuales son particularmente importantes, debido a que son productos cárnicos cocidos listos para comer, con mayor demanda, tanto de los consumidores como los mercados mundiales, ya que son más populares y convenientes para los estilos de vida moderna (Chattopadhyay K., *et al* 2019).

Las salchichas, son productos de carnes frescas trituradas, que se modifican mediante diversos métodos de procesamiento para obtener propiedades organolépticas y de mantenimiento deseable. Se preparan comercialmente a partir de una variedad de productos cárnicos como carne de res, cerdo, cordero, etc., dependiendo de las preferencias del consumidor de distintas ubicaciones geográficas (Chattopadhyay K., *et al* 2019). En la elaboración de salchichas se incluye molienda, condimento, licuado, relleno en envolturas, se aromatiza con humo líquido, cocción a temperaturas deseadas, se enfría a una temperatura adecuada y luego se envasa. Estos productos cárnicos normalmente deben enfriarse después de ser cocinados y antes de ser envasados para evitar el deterioro al reducir la oportunidad de crecimiento de bacterias no deseadas (Inmanee P., *et al* 2019). Asimismo, este enfriamiento contribuye a fijar la envoltura al producto evitando que la carne y las envolturas se separen o se despeguen y, por otra parte, también ayuda a evitar las arrugas en las tripas de salchichas para lograr una mejor apariencia en el producto final (Wijnker, J., *et al* 2017).

Un método comúnmente usado para enfriar un producto cárnico en diferentes plantas procesadoras, consiste principalmente en colocar una salmuera fría sobre el producto cárnico en una ducha de salmuera. Esta salmuera enfriada es suministrada a la ducha por un enfriador que utiliza equipos de refrigeración estándar para reducir la temperatura de la salmuera. Para aumentar la eficiencia de este proceso de enfriamiento, la salmuera que cae en cascada y enfría el producto cárnico se recoge en un sumidero y luego se devuelve al enfriador de salmuera para volver a enfriarla y recircularla a la ducha. Esta disposición permite la recirculación continua de la salmuera para mantener una temperatura constante dentro de la ducha de salmuera (Cocoma J., *et al* 1997). Sin embargo, a medida que la salmuera cae en cascada repetidamente sobre el producto, recoge pequeñas partículas de carne y microorganismos que se acumulan en cada ciclo, una vez estos contaminantes alcanzan un nivel predeterminado, la salmuera se vuelve inadecuada para su uso, debido a que se incrementan las probabilidades de que estos microorganismos lleguen a los productos por recontaminación (Dong C., *et al* 2019)



La industria alimentaria ha estado adoptando alternativas para minimizar la contaminación y controlar el crecimiento de microorganismos que pueden llegar a los alimentos durante la cadena de producción. Recientemente, diferentes investigadores han descrito la acción inhibitoria de los ácidos orgánicos de cadena corta y / o sus sales en el crecimiento de bacterias y mohos, incluidos los patógenos. Estos productos son generalmente reconocidos como compuestos seguros (GRAS) utilizados frecuentemente como descontaminantes químicos (Castilho A., *et al* 2020) Las sales de sodio han demostrado un efecto inhibitor sobre el crecimiento de algunas bacterias de descomposición de los alimentos y la actividad antimicrobiana contra los patógenos transmitidos por los alimentos, incluidos *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Cabeza J., *et al* 2018). El cloruro de sodio es un ingrediente importante en el procesamiento de carne que posee varias propiedades tecnológicas como: mejorar el sabor y la textura, aumentar la capacidad de retención de agua, la formación de gel y emulsión (por extracción de proteínas miofibrilares), y puede inhibir crecimiento microbiano que se basan en su capacidad para reducir la actividad del agua (A_w) (Lekjing S., 2016).

El NaCl modifica el balance osmótico del ambiente que rodea a una bacteria, en estas condiciones de baja actividad acuosa, el microorganismo pierde agua para reestablecer el equilibrio osmótico. La pérdida de agua resulta en una reducción de la actividad metabólica, deteniéndose el crecimiento de la bacteria. Una alta concentración de NaCl puede ejercer un efecto deshidratante sobre los microorganismos y esta pérdida de agua de las células o plasmólisis resulta en una mayor inactivación celular, aunque, la concentración de NaCl requerida para limitar el crecimiento microbiano depende de la fase de crecimiento de los microorganismos y de la temperatura (Martin A., 2002).



1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano del cloruro de sodio empleado en la salmuera para el enfriamiento de las salchichas.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar la bacteria ácido láctica autóctona de la salmuera de duchado frío mediante el sistema VITEK 2 de biomérieux.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del NaCl en la salmuera sobre *Listeria monocytogenes* y la bacteria ácido autóctona.
- Evaluar la efectividad de concentraciones de sal (NaCl) mediante la reducción logarítmica de las bacterias analizadas



2. JUSTIFICACIÓN

La gestión de salmuera es sin duda un punto determinante para cualquier tipo de industria o sector en el que se genere un efluente salino, ya que, aún al carecer de peligrosidad, deben ser correctamente gestionados, porque su descarga no controlada puede causar un elevado impacto ambiental. Entre las implicaciones que conlleva el exceso de cloruro en el medio ambiente se encuentran afectada la biota acuática y la mala absorción de nutrientes en las plantas, ya que la descarga de elevadas cantidades de cloruros sobre organismos de agua dulce puede provocar efectos adversos sobre los mismos. La gestión de la salmuera no siempre es sencilla y la opción más idónea depende de factores, como caudal, concentración, situación geográfica, disponibilidad de fuentes residuales de energía, etc. Entre las opciones posibles de gestión de las salmueras, no cabe duda que la más sostenible ambientalmente consiste en abordar su tratamiento, siendo su reutilización, una de las mejores soluciones a esta problemática, ya que se disminuirá la contaminación del recurso hídrica, (Ambientum, 2019).

En las pequeñas y medianas industrias cárnicas, la eliminación de residuos líquidos es significativamente mayor en comparación con los demás residuos producidos, por lo que ellos vienen a ser los principales problemas a resolver por estas empresas considerando las exigencias medioambientales reguladas por la normativa vigente en nuestro país. Asimismo, la Resolución 631 del 2015, establece los parámetros y los valores límites máximos permisibles que se deben cumplir para poder llevar a cabo el vertimiento de aguas residuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público. Dentro de sus directrices insta que los niveles máximos de cloruros en agua residuales no domésticas debe ser 250mg/L, de acuerdo a estos requerimientos y según la última caracterización realizada al agua residual de la empresa en el mes de octubre, la concentración de Cl^- eliminada diariamente a sistema de alcantarillado público es de 1104.8 mg/L, superando los límites máximos permitidos por la presente resolución y por ende incumpliendo con lo reglamentado.

Debido a esta problemática, el presente estudio tiene como propósito buscar una alternativa para reducir el volumen de los vertimientos generados por la empresa, que equivalen aproximadamente a 44000 litros por día, mediante la reutilización de la salmuera de duchado frío, y a su vez mitigar el impacto ambiental causado por la elevada concentración de cloruros, disminuyendo de esta manera, la frecuencia de eliminación de 2400 litros diarios que corresponde al volumen de salmuera empleado en el proceso, y de este modo solo se eliminaría 41600 litros a la planta de tratamiento de agua residual (PTAR), este proceso se haría a través del almacenamiento de la salmuera a condiciones favorables de temperatura y concentración de sal. Esta investigación resultará beneficiosa para la empresa, porque no solo permitirá que el proceso productivo mejore su desempeño ambiental dentro de los preceptos de un



desarrollo sustentable, sino que aumentará la calidad del producto, al garantizar la eliminación de bacterias patógenas que puedan afectar la inocuidad, principalmente *L. monocytogenes* y alterantes como las bacterias ácido lácticas, además de evitar posibles sanciones que afectarían a la empresa por la generación de grandes cantidades de vertimientos y de alta carga contaminante que es característico en las industrias de derivados cárnicos (Pilatasing J., 2011).



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Definición de salchichas:

Según la NTC 1325, la salchicha es un producto cárnico procesado, escaldado, embutido, elaborado con base en carne de animales de abasto, con la adición de sustancias de uso permitido, introducido en tripas naturales o artificiales aprobadas, de diámetro máximo de 45 mm. (ICONTEC. 2008).

3.2 Marco histórico:

La palabra "salchicha" se deriva de la palabra latina "*salsus*", que significa salado o conservado con sal. El proceso de preservar las carnes rellenando carnes saladas y picadas con sabor a especias en tripas de animales se remonta a miles de años, a los antiguos griegos y romanos, desde entonces, las salchichas y los productos de salchicha se han convertido en una amplia variedad de sabores, texturas y formas resultantes de variaciones en los ingredientes y procesos de fabricación. En Estados Unidos (EE. UU), la expansión de la industria del envasado de carne durante la Guerra Civil, junto con el desarrollo de la refrigeración para su uso en vagones ferroviarios e instalaciones de sacrificio, incentivó a los procesadores de carne a crear productos de salchichas que podrían utilizar cortes de carne percederos más baratos junto con recortes de chatarra y productos de despojos. Además, personas de diversas nacionalidades y grupos étnicos emigraron a EE. UU., Trayendo consigo recetas tradicionales y habilidades de fabricación para crear una amplia gama de tipos de salchichas. Una serie de problemas, expuso prácticas indeseables en la industria de procesamiento de carne, incluida la práctica de agregar carnes y despojos variados a un producto de salchicha sin identificar los ingredientes para el consumidor. Actualmente, la industria de fabricación de salchichas debe cumplir con los estándares según la normativa vigente para el correcto etiquetado y asegurar que el consumidor esté informado de los ingredientes del producto (Safety F., & Service I., 2014)

3.3 Operaciones de elaboración de salchichas:

3.3.1 Emulsificación

Algunos fabricantes pasan la mezcla a través de un emulsionante después de la etapa de mezcla para reducir aún más, el tamaño de las partículas de carne y lograr una textura muy fina. En el proceso de emulsificación, la grasa, la proteína, la sal y el agua se mezclan y se combinan en una emulsión semifluida. La proteína muscular de la carne, llamada "miosina", se solubiliza o libera de las fibras musculares por contacto con la sal. La proteína solubilizada y el agua se combinan y rodean los glóbulos de grasa, manteniendo las partículas de grasa en una suspensión desembolsada dentro de la mezcla, junto con especias y condimentos (Safety F., & Service I., 2014).

3.3.2 Embutido

Un embutido es un alimento que se prepara con carne picada y condimentada, dándole normalmente una forma simétrica. La elaboración de embutidos comenzó con el simple proceso de salado y secado de la carne que se hacía con el fin de conservar la carne fresca que no podía consumirse inmediatamente (Ordoñez, J., & Patiño, E., 2012).

3.3.3 Enfriamiento.

El objetivo de esta operación es que el producto disminuya su temperatura de 72 – 74°C, que es la temperatura a la que sale de la etapa de cocimiento, hasta una temperatura de 0 a 4°C. Se utiliza agua fría que puede ser enfriada con un sistema sencillo como es el agregar hielo, con esto se enfría la temperatura del agua de 0 a 2°C. El enfriamiento se puede lograr a través de agua fría o del uso de salmuera, esto dependerá del tipo de operaciones que se hayan hecho previamente; por ejemplo, es común que si el cocimiento se realizó en agua, el enfriamiento se realice con agua con hielo; mientras que si se hizo en hornos es común el uso de salmuera (Safety F., & Service I., 2014).

3.4 Clasificación de las salchichas

Las salchichas se clasifican como embutidos escaldados y en su elaboración se pueden usar carnes de diverso origen, lo que determina su calidad y precio. Entre la clasificación estándar se incluyen salchichas frescas, salchichas cocidas / ahumadas y salchichas secas (Safety F., & Service I., 2014).

3.4.1 Salchichas frescas

Las salchichas están hechas de cortes seleccionados de carnes frescas y a veces congeladas. Las salchichas frescas no pueden contener agentes de curado, es decir, nitritos de sodio o potasio, nitratos o sal en cantidades suficientes para preservar el producto y no se cocinan. Las salchichas frescas generalmente se sazonan y tienen un contenido de agua limitado. Estos tipos de salchichas requieren almacenamiento refrigerado y deben cocinarse completamente antes de servir (Safety F., & Service I., 2014).

3.4.2 Salchichas cocidas y ahumadas

Representan aproximadamente el 85% de todas las salchichas producidas. Las salchichas cocidas típicas, como las salchichas o la mortadela, están hechas de carne fresca o congelada que se cura durante el procesamiento, completamente cocida y ahumada. Este tipo de salchichas son perecederas y deben refrigerarse hasta el momento del consumo, o caducarán. Estas salchichas tienen sabores adicionales que se imparten mediante la adición de nitritos y nitratos, y a través de diversos procesos de cocción y ahumado. Esta categoría de salchichas contiene muchas variaciones de proceso que dan como resultado la amplia gama de salchichas cocidas y ahumadas, aunque la mayoría se cocina y se ahúman, algunos se cocinan sin ser ahumadas con muchas otras modificaciones en el proceso (Safety F., & Service I., 2014).

3.4.3 Salchichas secas

Los productores de salchichas secas y salchichas semisecas utilizan fermentación controlada inducida por bacterias para preservar la carne e impartir sabor. Los ejemplos más comunes de salchichas secas son el salami y el pepperoni. La categoría de productos secos también incluye productos no fermentados estables como la carne seca. Nuevamente, hay muchas variaciones de los pasos e ingredientes del proceso, lo que resulta en la gran variedad de productos disponibles para el consumidor (Safety F., & Service I., 2014).

3.5 Salmuera

La salmuera es una solución compuesta por agua y sal que ha sido utilizada por mucho tiempo para la conservación de los alimentos, en algunas ocasiones es adicionada con otros ingredientes que contribuyen a mejorar el sabor de los productos como es el vinagre, pimienta, ajo y otros. Una propiedad importante de la salmuera es que su punto de congelación es bastante bajo, por tanto, se usa como refrigerante en industrias para la fabricación de alimentos (Woods, F., *et al* 2019).

El baño salino o de salmuera es empleado en productos cárnicos procesados como la salchicha para asegurar la calidad óptima del producto, en este proceso la sal fresca es agregada a la salmuera en gránulos o en forma de disolución para mantener la salmuera en una concentración deseada, después del baño salino, la salchicha continúa en el proceso para ser empacada. La concentración de la sal en el baño debe ser monitoreada y controlada cuidadosamente ya que la calidad de la envoltura afecta la consistencia y la calidad del producto final. El color y la textura de la salchicha dependen de la concentración de la solución salina, una baja concentración resulta en un producto final que es suave y opaco, mientras que una solución muy concentrada causa que la salchicha sea muy seca y de textura gomosa (Dev, G., *et al* 2016).

La concentración de sal en la salmuera es monitoreada y controlada continuamente con un refractómetro, los operadores reciben información de cuando adicionar la sal necesaria para mantener la concentración óptima en la solución. El refractómetro es instalado directamente en el tanque de salmuera para monitorear continuamente el grado de dilución a medida que el agua es transferida a la solución y de esta forma asegurar que la sal adicionada este a la concentración y dosis correcta. El tanque de salmuera envía datos de medición a un controlador conectado a la válvula de alimentación y a la válvula de descarga de tal manera que si la concentración cae por debajo del valor deseado, el controlador abre la válvula de alimentación y agrega una solución concentrada de sal en el tanque de salmuera hasta que la concentración de la salmuera sea restaurada al nivel óptimo. Para evitar sobrepasar el volumen del tanque, el controlador abre también la válvula de descarga para descargar parte de la solución diluida (Mandl, K., *et al* 2009).

3.6 Efecto del cloruro de sodio en las salchichas

La difusión de sal (NaCl) y agua en las salchichas se ha estudiado mediante la salmuera, cuando la salchicha se pone en una solución de salmuera, hay un movimiento neto de iones Na^+ y Cl^- de la salmuera a la salchicha y al mismo tiempo el agua contenida sale a la salmuera como resultado de la diferencia de presión osmótica. Las moléculas de NaCl deben recorrer una ruta indirecta para evitar las cadenas de proteínas y glóbulos de grasa que obstruyen la migración hacia fuera del agua. El resultado es un proceso de difusión impedido, lo que significa que NaCl y las moléculas H_2O se mueven en respuesta a sus respectivos gradientes de concentración, asimismo estos mecanismos de transportes contribuyen a disminuir la disponibilidad de agua en el producto, dificultando las reacciones de deterioro químico y microbiológico (Woods, F., *et al* 2019).

El crecimiento de algunas bacterias se inhibe a concentraciones tan bajas como 2%, pero otras bacterias, levaduras y hongos, pueden crecer dentro de un amplio rango de altas concentraciones salinas, incluso hasta el punto de saturación. Estos microorganismos se denominan halotolerantes, donde se encuentran muchas especies de micrococos y bacilos. Algunos microorganismos solo pueden crecer en medios que contienen concentraciones de sal muy altas (halófilos) y mueren rápidamente cuando se colocan en medios con menos del 10% de cloruro de sodio. La sal a bajas concentraciones hace que la carne se hinche y retenga agua, pero a altas concentraciones las proteínas precipitan y retienen menos agua. El contenido de sal del 3 al 4% en el producto está cerca del límite para muchos consumidores (Woods, F., *et al* 2019).

3.7 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria perteneciente a la familia Listeriaceae, su morfología microscópica, corresponde a un bacilo corto gram positivo, regular, no esporulado, que presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que le confieren movilidad. Según su metabolismo, es una bacteria anaerobia facultativa, catalasa positiva y oxidasa negativa, capaz de crecer en bilis al 40%, fermentar la glucosa y maltosa. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de los mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos (Baka, M., *et al* 2015).

Este patógeno es el más crítico en la salmuera de las industrias de productos cárnicos procesados embutidos, debido a su tolerancia a altas concentraciones de sal (12%) y temperaturas de refrigeración (4°C). Este agente puede sobrevivir a la acción de diferentes antimicrobianos, ya que forma biopelículas para protegerse de las agresiones externas, por tanto, tiene la oportunidad de contaminar en sus diferentes etapas, siendo esta vía la más frecuente para llegar al ser humano. Su presencia en los alimentos es de



alto riesgo para la salud pública, puede afectar a toda la población incluyendo a niños, embarazadas, ancianos y personas inmunocomprometidas. Por esta razón, la Listeriosis es una importante enfermedad que genera preocupación para el sector cárnico y, en especial, para las empresas productoras y comercializadoras de productos cárnicos listos para su consumo (Martino K., et al 2005).

3.8 Estudio epidemiológico

En varios países se han reportado diferentes brotes asociados al consumo de derivados cárnicos. Los estudios indican que los derivados cárnicos (salchichas, jamones cocidos y curados, carne en tajadas y tajadas de jamón de carne de pollo) son productos de alto riesgo debido a que soportan crecimiento de *L. monocytogenes* y no son sometidos a ningún tratamiento tecnológico que asegure la destrucción del patógeno antes del consumo. En Colombia los reportes de brotes de Listeriosis asociados al consumo de productos cárnicos son muy bajos, la información sobre la prevalencia de Listeriosis es escasa y con alto subregistro, debido a que no es una enfermedad de notificación obligatoria, aunque puede llegar a ser captado como una ETA e incluirse en el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila). No obstante, únicamente se dispone de un reporte en la ciudad de Santiago de Cali. Según la Red Nacional de Laboratorios del instituto nacional de salud (INS) los departamentos con mayor número de reportes de *L. monocytogenes* a partir de muestras clínicas son: Antioquia, Valle del Cauca y el Distrito Capital, con 10, 35 y 98 aislamientos, respectivamente. El instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos (INVIMA) y las Direcciones Territoriales de Salud dentro de sus programas de Inspección, Vigilancia y Control (IVC) han rechazado derivados cárnicos en comercialización por presencia de *L. monocytogenes* (29/1.703), en el 2010 se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) cuatro brotes de Listeriosis. Aunque *L. monocytogenes* no es un microorganismo de notificación obligatoria, podría serlo en un futuro si se fortalece la vigilancia de dichas enfermedades (Colombia, 2015).

3.9 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son microorganismos que se pueden encontrar en cualquier ambiente rico principalmente en carbohidratos, como plantas, alimentos fermentados y las superficies mucosas de humanos, animales terrestres y marinos. En los animales de sangre caliente, son parte de la microbiota normal, habitan el tracto gastrointestinal y genitourinario, que está compuesto por un gran número de especies bacterianas diferentes. Aunque muchos géneros de bacterias producen ácido láctico como productos de fermentación primarios o secundarios, las bacterias típicas del ácido láctico son las del orden *Lactobacillales*, incluidos los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragonoc*, *Aerococcus* y *Weissella*. De acuerdo al modo de fermentación de glucosa, estas bacterias pueden ser homofermentativos (producción de ácido láctico como el único o principal producto fina) y



heterofermentativos (producen ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono). Debido a su actividad metabólica, son considerados como especies bacterianas alterantes, provocando en productos terminados una serie de reacciones que afectan la calidad sensorial como es la acidez, decoloración, producción de gas, pérdida de sabores y olores, exudado lechoso, hinchazón del empaque, cambios del pH. La aparición de lechosis antes del tiempo establecido en la vida útil, son deterioros comunes en los productos empacados al vacío, defectos de calidad que pueden causar rechazo por parte de los consumidores y por ende, el producto perdería credibilidad y conllevaría a consecuentes problemas económicos para la empresa (Buelvas, A., *et al* 2012).



4. MARCO LEGAL

Dentro de las normativas que rigen este estudio, se pueden encontrar diferentes Leyes, Decretos y Resoluciones.

4.1 Ley 23 del 12 de diciembre de 1973.

Tiene como objeto prevenir y controlar la contaminación del medio ambiente y buscar el mejoramiento, conservación y restauración de los recursos naturales renovables, para defender la salud y el bienestar de todos los habitantes del Territorio Nacional. Dentro del el Art. 2, el cual recalca que “El medio ambiente es un patrimonio común”; por lo tanto su mejoramiento y conservación son actividades de utilidad pública, en las que deberán participar el Estado y los particulares (Congreso de la república de Colombia, 1974).

4.2 Ley 9 de 1979.

Establece en el Art. 1, los procedimientos y las medidas que se deben adoptar para la regulación, legalización y control de los descargos de residuos y materiales que afectan o pueden afectar las condiciones sanitarias del Ambiente, asimismo el Art 10 de la ley citada, reglamenta que todo vertimiento de residuos líquidos deberá someterse a los requisitos y condiciones que establezca el Ministerio de salud, teniendo en cuenta las características del sistema de alcantarillado y de la fuente receptora correspondiente. Además en el Art 16, menciona el grado de tratamiento requerido de acuerdo con las características de los residuos industriales líquidos y con la clasificación de las fuentes receptoras y su incidencia en los sistemas municipales de tratamiento (Congreso de la república de Colombia, 1979).

4.3 Decreto 3930 del 2010

El cual establece las disposiciones relacionadas con los usos del recurso hídrico, el Ordenamiento del Recurso Hídrico y los vertimientos al recurso hídrico, al suelo y a los alcantarillados. En el Art 28 citado en el decreto, se reglamenta la fijación de la norma de vertimiento. Modificado por el art. 1, Decreto Nacional 4728 de 2010, en el cual el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial fijará los parámetros y los límites máximos permisibles de los vertimientos a las aguas superficiales, marinas, a los sistemas de alcantarillado público y al suelo (Uribe B., & Santos, M., 2010).



4.4 La Resolución 0631 de 2015 reglamenta el artículo 28 del Decreto 3930 de 2010 y actualiza el Decreto 1594 de 1984 (vigente desde hace 30 años)

Respondiendo a la nueva realidad urbana, industrial y ambiental del país. Esta permite el control de las sustancias contaminantes que llegan a los cuerpos de agua vertidas. Esta Resolución es de obligatorio cumplimiento para todas aquellas personas que desarrollen actividades industriales, comerciales o de servicios y que en el desarrollo de las mismas generen aguas residuales, que serán vertidas en un cuerpo de agua superficial o al alcantarillado público. El control se realiza a partir de la medición de la concentración de las sustancias descargadas a los cuerpos de agua y que afectan la calidad del agua. A partir de lo dispuesto en esta Resolución la medición de las sustancias contaminantes se realizará en mg/L y no en kg día, como se venía haciendo con el Decreto 1594 de 1984. Lo anterior permite contar con parámetros fijos a cumplir según la actividad productiva (Resolución 631, 2015).

4.5 Norma Técnica Colombiana 1325 (NTC)

Esta norma establece los requisitos que debe cumplir los productos procesados no enlatados. Dentro del capítulo 5 en el ítems 5.3, especifica los requisitos microbiológicos que los productos cárnicos procesado, cocidos, jamones cocidos y fiambres deben cumplir, en el cual establece ausencia de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos listos para el consumo (Icontec. 2008).

5. MARCO DE REFERENCIA

La salmuera es un paso importante en la fabricación de queso, y el uso de baños de salmuera para este propósito es una práctica común en las lecherías alemanas. Dentro del campo de investigación, a nivel internacional, en el Instituto Federal de Investigación de Nutrición y Alimentos en Alemania del presente año, Hamman P, y colaboradores, analizaron los estafilococos coagulasa negativos (SNC) en las salmueras usadas en baños de salmuera. Los autores aislaron 52 cepas de CNS presunto de salmueras de queso de 13 fábricas en Alemania. La identificación de especies por secuenciación del gen *sodA* reveló que 50 aislamientos eran del SNC y 31 de estos aislamientos correspondían a *Staphylococcus saprophyticus*, los cuales, a nivel de subespecie revelaron la presencia de 6 estafilococos *Saprophyticus* ssp. *Saprophyticus*. Según lo obtenido durante la investigación, el grupo de SNC estudiados, mostraron que los genes que codifican enterotoxinas comunes no estaban presentes. Pocos genes que codifican la resistencia a los antibióticos se detectaron en un pequeño número de aislados, mientras que un número considerable expresó resistencia a los antibióticos en un nivel bajo. Algunas de las especies aisladas podrían ser motivo de preocupación en términos de bioseguridad, especialmente los números relativamente altos de estafilococos. *Saprophyticus* ssp. *saprophyticus* detectado. Sobre la base de estos resultados, no se encontró ninguna indicación de riesgo inaceptable procedente del SNC aislado. se analizaron todos los aislamientos para determinar los determinantes genéticos (*entA* , *entB* , *entC* , *entD* y *entE*) de las enterotoxinas estafilocócicas más comunes; Ninguno de estos genes fue detectado. No encontramos ninguna indicación de riesgos inaceptables originados por el SNC aislado (Hammer, P., 2019).

La salmuera ha presentado interés en el área industrial desde hace tiempo debido a las propiedades sensoriales y microbiológicas que le proporcionan a los productos. En Latinoamérica, se han llevado a cabo estudios sobre el efecto que presentan sus componentes especialmente la sal sobre diversos microorganismos, un estudio realizado en Campinas Brasil por Binici A y Kaya G, en el 2017, analizaron los cambios en la calidad fisicoquímica y microbiológica que se producen debido a las diferentes técnicas de sal (en seco y salmuera) en *Squalius cephalus* cuando se almacena a 4 ± 0.5 ° C. De acuerdo con los resultados obtenidos, la calidad fue menor en los peces tratados con el método de salazón con salmuera, y el valor de pH y los valores microbianos (TMBC, TPBC, levaduras y mohos) fueron mayores en comparación con la salazón en seco. Este estudio deja en evidencia el efecto que ejerce la sal sobre los microorganismos al causar una total deshidratación celular sin dejar agua disponible para la supervivencia microbiana, de este manera, el efecto inhibitorio de la salmuera no fue tan elevada en comparación a la salazón en seco debido a que la sal se encuentra diluida y por tanto la acción disminuye. Una forma de solucionar esta problemática según este estudio puede ser usar una solución salina con mayor concentración para aumentar el período duradero



de los productos de salmuera (Binici, A., & Kaya, K., 2017).

Por otro lado, en la universidad de Federal de Santa Catarina (UFSC) de Brasil, Porto A y colaboradores, evaluaron la influencia de la composición de salmuera en los parámetros físico-sensoriales y microbiológicos de los filetes de pechuga de pollo marinados por inmersión. El experimento consistió en cinco formulaciones de salmuera, el proceso de marinado ocurrió a una temperatura de 5 ° C / 12 horas, seguido de drenaje durante 30 minutos. Las muestras para el monitoreo de la vida útil a los 6 y 11 días se almacenaron a 5 ° C. Se evaluó el aumento de peso durante la marinación y la pérdida de peso en la cocción, y la determinación del pH, el recuento de microorganismos aeróbicos psicrotróficos, además del recuento de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp.* Según los resultados, el menor aumento de peso se observó para los tratamientos con adición de vinagre de salmuera, un hecho atribuido a la reducción del pH cerca del punto isoeléctrico de la carne. Estos tratamientos mostraron la mayor pérdida de peso durante la cocción. La materia prima presentó ausencia de *Salmonella sp.*, y recuentos de *Staphylococcus aureus* y microorganismos psicrotróficos dentro de los límites establecidos por el ICMSF. Después de 11 días de almacenamiento, solo los tratamientos de vinagre en la composición de salmuera mostraron recuentos de microorganismos aeróbicos psicrotróficos dentro del límite establecido por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas PARA Alimentos (ICMSF) (10^7 UFC / g). Las mejores texturas se verificaron en los tratamientos con la adición de romero en la composición de salmuera (Porto, S., et al 2000).

A nivel nacional, en la ciudad de Medellín, se llevó a cabo un estudio sobre salmueras adicionadas con distintos ingredientes para mejorar las propiedades organolépticas del producto, llevado a cabo por Muños A y Restrepo D. Fueron evaluadas salmueras para marinado de pollo con 4% de sólidos, compuestos por sal (constante al 2% en la salmuera), proteína de soya (PV), fosfatos e inulina (I); estos últimos, en concentraciones que variaron de 0 a 2%, dando lugar a siete tratamientos, incluyendo un testigo sin inulina. Las salmueras con los mayores porcentajes de proteína vegetal tuvieron mayores valores de viscosidad. La salmuera correspondiente al tratamiento 2, con I al 1%, se seleccionó como la mejor, por su viscosidad (condiciones de aplicación) y concentración de proteína y fosfatos (legislación vigente); esta salmuera fue incorporada a dieciocho pechugas de pollo en niveles de inyección de 5, 10 y 15%, para evaluar su efecto en la capacidad de retención de la misma, mediante la determinación de pérdidas por descongelación y cocción; también fue realizado un análisis sensorial para observar sus efectos en las propiedades de textura, color, aroma, sabor y calidad general. Fue posible determinar que a mayores niveles de inyección la capacidad de retención de la salmuera se incrementa, tendencia que se mantiene luego del proceso de cocción. La capacidad de retención de salmuera del tratamiento correspondiente a inyección al 5%, con y sin I, presentó diferencias significativas respecto con la del 15% con I. Las



apreciaciones sensoriales de color, sabor y aroma para las pechugas de pollo en todos los tratamientos tuvieron mejores valores que los de jugosidad y dureza, lo cual indica que sería necesario influir en la activación de las proteínas cárnicas para mejorar estas propiedades mediante la variación en la formulación. Las pechugas analizadas estuvieron dentro de los parámetros microbiológicos establecidos por la legislación colombiana para este tipo de derivados cárnicos, y el marinado no determinó un comportamiento diferente al control durante el tiempo estudiado (Muñoz, Á., *et al* 2014).

6. METODOLOGÍA

6.1 Preparación de concentraciones de la salmuera:

La salmuera se tomó como medio de cultivo con el fin de generar condiciones similares a las de la planta. Se recolectaron en bolsas Nasco (WHIRL-PAK) del equipo Alkar y se transportaron al laboratorio de Microbiología en una nevera portátil. Luego, se realizó análisis del porcentaje de NaCl mediante el refractómetro (ATAGO- POCKET) para poder preparar las diferentes concentraciones. De acuerdo a la concentración de NaCl determinada en la salmuera se reguló hasta conseguir las concentraciones de estudio que correspondieron al 10%, 12%, 14%, 16% y 18%. Se escogieron estas concentraciones porque por debajo del 10% no se presenta efecto letal sobre las bacterias estudiadas, y al 18% porque es dos concentraciones mayor a la empleada en la empresa, con el fin de determinar el rango de tolerancia y poder establecer un concentración adecuada.

6.2 Caracterización de las bacterias ácido lácticas en la salmuera

Para la caracterización de la cepa autóctona se siguió el método de Haastrup K. y colaboradores, con algunas modificaciones (Haastrup K, *et al* 2018). Con la muestra de salmuera tomada en planta, se tomó 10 ml y se inocularon en 90ml de Agua peptonada estéril (APE) incubándose a 35°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de 1ml y se inoculó en agar APT (All-purpose agar cont. Tween), para bacterias ácido lácticas. Una vez logrado el aislamiento, se procedió a realizar una identificación mediante el sistema VITEK 2 de biomérieux, el cual utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos que miden varias actividades metabólicas a través de esos sustratos como acidificación, alcalinización, hidrólisis enzimáticas y desarrollo en presencia de sustancias inhibitoras, comparando los resultados obtenidos con una base de datos el cual arroja la especie identificada (Biomérieux España, 2019).

6.3 Cultivos bacterianos

Se trabajó con la cepa caracterizada en la salmuera y también con una cepa bacteriana ATCC de *Listeria monocytogenes* adquirida del cepario de Microbiología de la planta de alimentos, se activaron mediante una siembra por agotamiento en agar sangre, incubándose por 24 horas a 37°C. Todos los cultivos se conservaron en refrigeración, a 4°C.

6.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de macrodilución.

La CMI se determinó por el método de macrodilución en fiolas, propuesto por Sullivan D. y colaboradores con algunas modificaciones (Sullivan D. *et al* 2020). A partir de las bacterias cultivadas en agar sangre, se preparó una suspensión bacteriana para cada cepa con un patrón MacFarland del 0,5 (1.5×10^8 bact/ ml) en 5ml de una solución salina al 0,85%. Luego, se tomó una alícuota de 1ml por cada suspensión y se adicionó por separado en una fiola con 100 ml de salmuera que contenía NaCl a una concentración estipulada (desde el 10% hasta el 16%). En paralelo se llevó a cabo un control positivo, el cual estaba constituido por agua peptonada estéril (APE) y un control negativo conformado solo con salmuera. Posteriormente, se leyó la absorbancia de cada concentración en el espectrofómetro (Génesis) a 600nm, así como los controles. Seguidamente, los caldos se incubaron a 0°C y 35°C por 18 horas, cumplido el tiempo, se hizo la lectura correspondiente en el espectrofómetro, para determinar si la absorbancia había aumentado (presento crecimiento bacteriano) o se había mantenido (presento inhibición) y, de esta forma, poder establecer la CMI, la cual correspondió a la primera concentración de NaCl que no se observará crecimiento bacteriano.

6.5 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).

La CMB se determinó empleando la metodología utilizada por Sullivan D. y colaboradores (Sullivan D. *et al* 2020). Con algunas modificaciones. Se extrajeron 100 μ L de los caldos en los cuales no se observó crecimiento visible de la bacteria o incremento de absorbancia (inhibición de crecimiento). Esta suspensión se inoculó en agar plate count (PC) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. La concentración mínima bactericida se tomó como aquella capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano o eliminar al 99,9% (Sullivan D. *et al* 2020).⁽³⁵⁾

6.6 Reducción logarítmica de las cepas analizadas

La reducción logarítmica se realizó adaptando el método de recuento en placa empleado por Burguet L. y colaboradores (Burguet L, *et al* 2013). A partir de las concentraciones usadas para determinar el CMI a temperaturas de 35°C se realizó diluciones seriadas desde 1×10^0 hasta 1×10^{-3} , inoculando por profundidad 1ml de cada dilución en cajas de Petri estériles y recubriendo con medio plate count a 50°C. De igual forma se hizo con las concentraciones incubadas a 0°C, pero se realizó diluciones de 1×10^{-2} , 1×10^{-4} y 1×10^{-6} . Posteriormente, se procedió a incubar a 35°C por 24 horas, transcurrido el tiempo se hicieron las respectivas lecturas.

7. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
I	✓	✓	✓	✓								
II					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
III					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IV					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
V					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VI					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VII					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VIII					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IX					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Descripción de Actividades

- I. Inducción a la planta
- II. Procesamiento de muestras
- III. Control interno de laboratorio (Superficies y ambientes)
- IV. Ambientes en plantas
- V. Muestreo de manipuladores
- VI. Análisis de agua potable
- VII. Superficies para análisis de *Listeria monocytogenes*
- VIII. Control de temperaturas y humedad de laboratorio
- IX. Desarrollo de trabajo de grado**

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Identificación de cepa ácido láctica.

De acuerdo al análisis mediante la técnica de colorimetría de VITEK 2, la cepa identificada presente en la salmuera con un probabilidad del 91% y confiabilidad buena, pertenece a *Enterococcus faecium*, esta es una bacteria ácido láctica, que al crecer en medio APT es capaz de metabolizar los azúcares presentes, y por tanto, reducir el pH del medio virándolo de púrpura a un color amarillo, debido a la producción de ácido láctico (Figura 1). Estas bacterias crecen usualmente en un caldo de cultivo a 10 °C y 45 °C, aunque el crecimiento óptimo es a 37 °C, además pueden crecer a pH de 9.6 con 6.5 % de NaCl y adaptarse a vivir en los ambientes más hostiles, incluso en presencia de niveles letales de sales biliares y detergentes, tales como el dodecil sulfato de sodio. Esta habilidad de *Enterococcus* para adaptarse y persistir en presencia de detergentes podría permitirles sobrevivir regímenes de limpieza inadecuados, contribuyendo a su persistencia (Ortega, L., 2010).



a. Agar sangre



b. APT

Figura 1. Crecimiento macroscópico de *E. faecium* en: a) Agar sangre, y b) Medio APT.

8.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) sobre las cepas evaluadas.

El crecimiento bacteriano en las folias incubadas a diferentes temperaturas, se evidenció por el incremento de la absorbancia a 600 nm después de 24 horas de incubación, asimismo, el efecto de la salinidad sobre el desarrollo de *E. faecium* y *L. monocytogenes*, aumento significativamente a medida que se incrementaron los niveles de salinidad (Figura 2 y 3). El crecimiento de las cepas no sólo está influenciado por la concentración de sal suministrada al medio, sino además por la temperatura empleada. De acuerdo a las absorbancias obtenidas y comparándolas con el blanco, a temperatura de 0°C no hubo una acción inhibitoria sobre el crecimiento de la bacterias estudiadas; sin embargo, a medida que se incrementaba la concentración de sal la lectura disminuía, lo que quiere decir, que la sal ejerció un efecto leve sobre las bacterias, lográndose observar la menor lectura a 18% de NaCl que corresponde a una lectura de 0,108 en el caso de *E. faecium* y 0,111 para *L. monocytogenes*, con respecto al 10% que fue de 0,114 y 0,121 respectivamente.

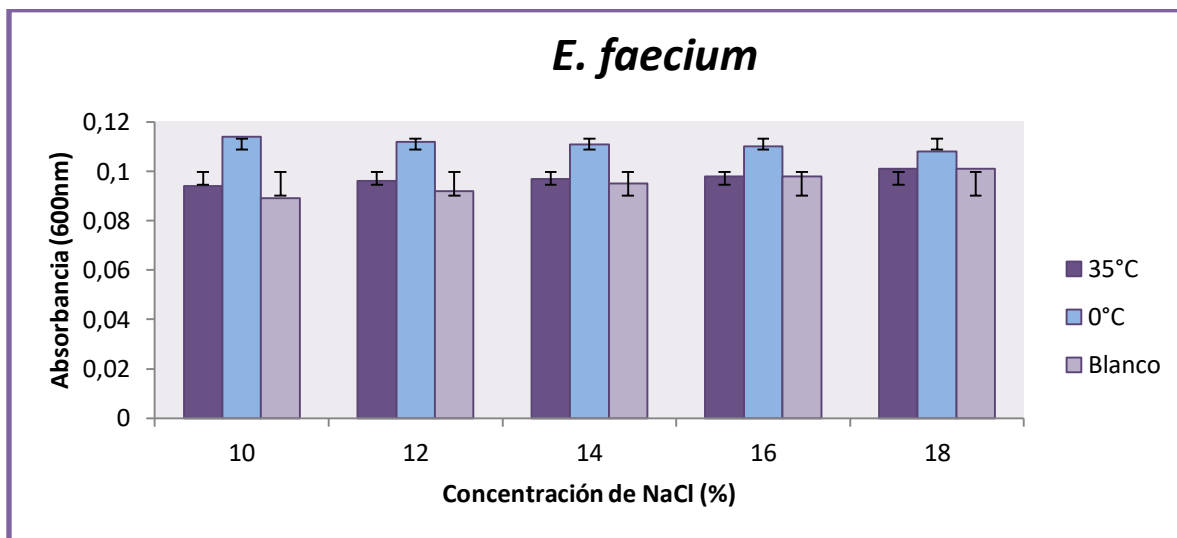


Figura 2. Comportamiento de *E. faecium* frente a las concentraciones de sal a diferentes temperaturas de incubación.

La mayor resistencia a las concentraciones empleadas se presentó con *E. faecium* a 35°C, según los resultados obtenidos, las absorbancias se mantuvieron a concentraciones mayores del 14% estableciéndose este como el CMI de NaCl y obteniéndose una reducción bacteriana del 99% (CMB) al 16% de sal, correspondiendo estas concentraciones, a una absorbancia promedio del 0,097 y 0,098 en comparación al blanco que fue del 0,095 y 0,098 respectivamente (figura 2). Estas lecturas fueron corroboradas con los recuentos microbianos para la determinación del CMB, en el cual no se presenció crecimiento al 18% y en cambio al 16% solo hubo recuento promedio de

1 UFC (Anexo 3). Por otro lado, la sensibilidad de *L. monocytogenes* frente a la sal (NaCl) a 35°C, se evidenció a concentraciones un poco más bajas comparado con la ácido láctica, según lo demostrado en los ensayos (figura 3), a partir del 12% se manifestó inhibición del desarrollo bacteriano con un incremento mínimo en la absorbancia pasando de 0,093 a 0,095 y manteniéndose la lectura desde 14% de sal después de 24 horas de incubación, estos resultados permitieron establecer esta concentración como el CMB debido a que el recuento solo corresponde a 1 UFC, y ausencia de crecimiento a partir del 16% de sal, y por el contrario, establecer el 12% como el CMI debido a la viabilidad presentada (Anexo 3).

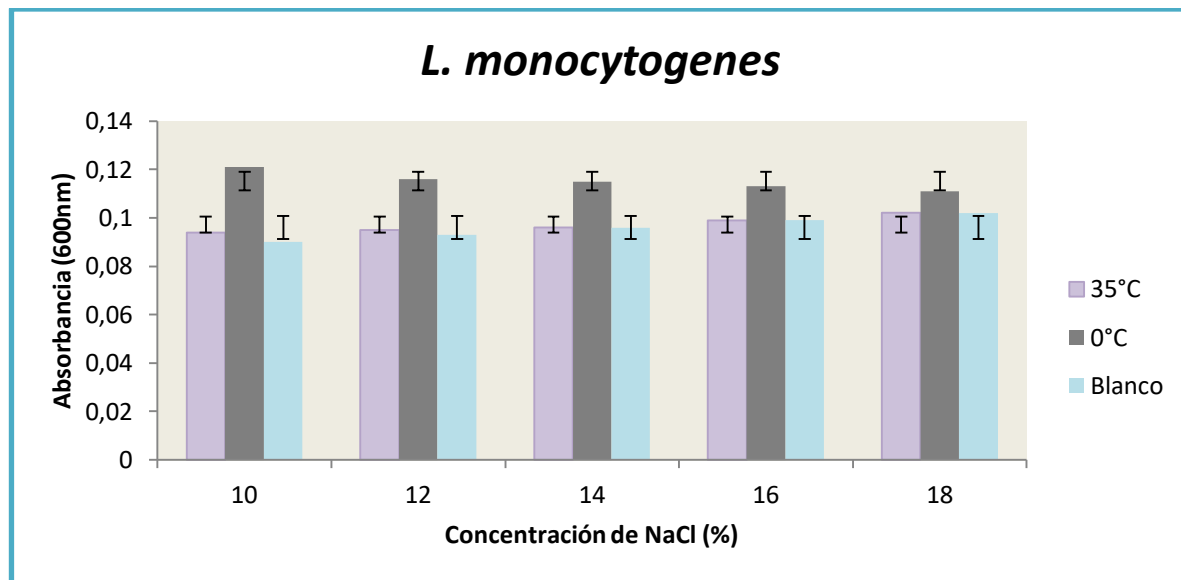


Figura 3. Comportamiento de *L. monocytogenes* frente a las concentraciones de sal a temperaturas de 0°C y 35°C.

El comportamiento de las bacterias demostrado a temperaturas de 0°C frente a concentraciones altas de NaCl, se debe principalmente al efecto que ejerce la salinidad sobre las cepas, produciéndose una disminución en la velocidad de crecimiento y un aumento en la fase de latencia, el cual se traduce, en un retardo en el crecimiento. Este retardo puede ser explicado por diferentes formas; las bajas temperaturas ocasionan una disminución en la actividad metabólica en el microorganismo, haciendo que los procesos de transporte de soluto al interior celular disminuyan, debido a que la semifluides de la membrana se ve afectada, provocando que la absorción de agua y nutrientes se detenga. Otro mecanismo, se debe a la influencia de la concentración de sal en fase acuosa sobre la presión osmótica del medio, y por consiguiente, sobre la actividad de agua del mismo, imposibilitando el desarrollo microbiano (Ángel J., *et al*, 2009). Cuando las bacterias se encuentran a una temperatura óptima de crecimiento, ocurre todo lo contrario, los procesos metabólicos se llevan a cabo eficazmente, favoreciendo la

biosíntesis y el crecimiento bacteriano, por tanto, el efecto de la salinidad se refleja de mejor manera a esas temperaturas, como se observó en las bacterias analizadas a 35°C, ya que a estas condiciones óptimas, las bacterias se encuentran metabólicamente activas llevando a cabo reacciones enzimáticas para su mantenimiento y crecimiento celular, por esta razón, cuando se exponen a un entorno con alta carga de soluto ocurre una desregulación osmótica, haciendo que las bacterias colapsen, debido a la presión osmótica ejercida por la diferencia de concertación con el medio externo (Ángel J., *et al*, 2009).

8.3 Evaluación de la efectividad de las concentraciones de sal (NaCl) mediante la reducción logarítmica (log) de las bacterias analizadas

El efecto antimicrobiano del NaCl sobre las bacterias es afectado por las bajas temperaturas, las cuales impiden que las bacterias busquen un equilibrio osmótico con el medio circundante, y por tanto, el efecto sea mínimo favoreciéndose de esta manera el desarrollo de las bacterias a pesar que la tasa de crecimiento sea lenta, ya que las reacciones químicas y la difusión disminuyen considerablemente. Este efecto se puede evidenciar sobre las cepas analizadas que presentaron un alto recuento a 0°C con respecto a 35°C, en las figuras 4 y 5, se demuestra que el recuento bacteriano se mantuvo a pesar de las concentraciones NaCl empleado, sin embargo, según los datos obtenidos de *L. monocytogenes* se observa un incremento de un logaritmo a concentraciones menores (10%, 12% y 14%) con respecto al recuento inicial que fue de 6 log, también se puede apreciar que a medida que la concentración de NaCl aumenta, el logaritmo disminuye (figura 4), esto significa que la sal no presenta una acción bactericida pero disminuye o retarda el crecimiento con el incremento en la concentración de NaCl. La tolerancia a la sal se expresan a bajas temperaturas de incubación como se ha venido demostrando, sin embargo, *E. faecium* presentó un crecimiento menor que *L. monocytogenes* resultando un logaritmo menos, encontrándose entre 6,7 log a (10%) y 6,2 (18%). Este efecto se debe a que la tasa de crecimiento de bacterias en medios que contienen sal u otros solutos es en función de la actividad del agua, y generalmente no de la concentración de un soluto o solutos en particular (figura 4). A medida que se aumenta la concentración de soluto, disminuye la actividad del agua (A_w), con una disminución de a_w , la fase de retraso del organismo aumenta y la tasa de crecimiento disminuye. Una disminución en la temperatura de incubación con respecto a la óptima, a una concentración de sal dada afecta el crecimiento, por tanto, dependiendo de la capacidad de tolerancia del microorganismo este puede o no sobrevivir. Según los autores Sindhu y Cornfield, afirman que los organismos no pueden crecer en presencia de niveles más altos de cloruro de sodio, pero a bajas temperaturas toleran ciertas concentraciones, informaron que tanto *Pseudomonas fluorescens* como *Aerobacter aerogenes* exhibieron la mayor tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl a bajas temperaturas de incubación (Sindhu, A., & Cornfield, H, 2005).

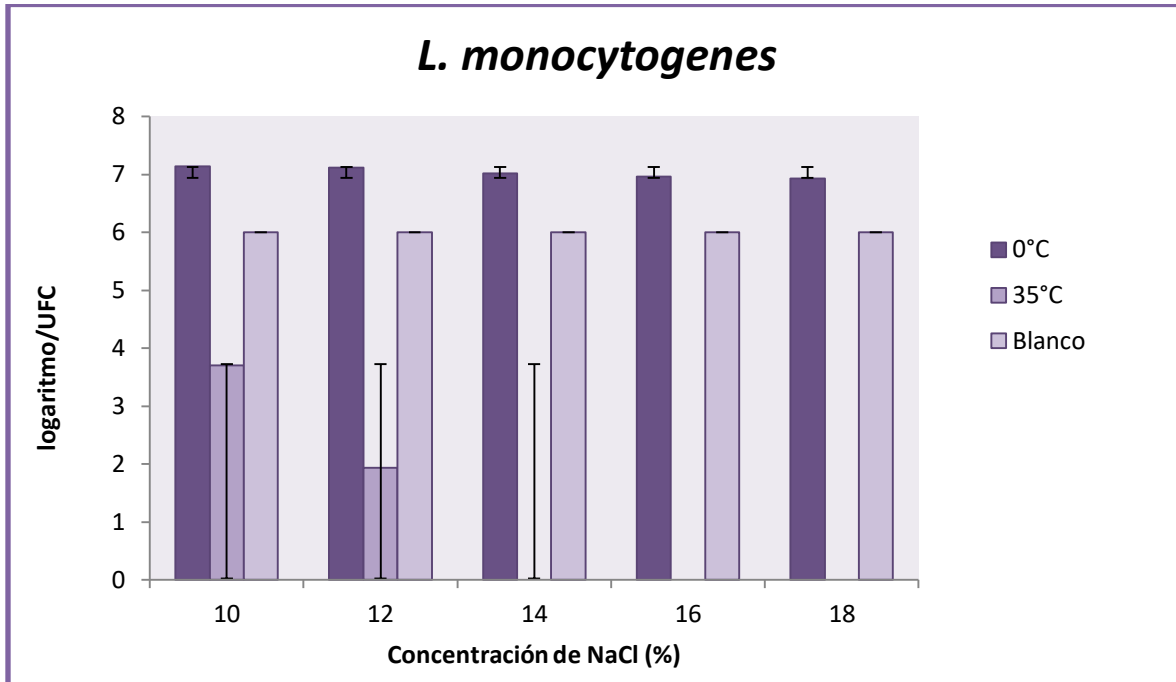


Figura 4. Comparación del efecto de la concentración de sal a diferentes temperaturas sobre las *L. monocytogenes*.

La acción bactericida del NaCl a las concentraciones estudiadas incremento a temperaturas óptimas de crecimiento bacteriano (35°C), este efecto se observó en ambas bacterias a bajos porcentajes de NaCl, resultando *L. monocytogenes* más susceptible a la acción combinada de la alta temperatura y concentración de sal, presentando una reducción de 4 logaritmos al 12% de NaCl, siendo las altas concentraciones (14%, 16% y 18%) letal para este microorganismo, que no pudo aumentar en número durante la incubación (figura 4), y por el contrario el recuento disminuyo en su totalidad. Por otra parte, según las mediciones basadas en el crecimiento de *E. faecium*, revelaron su tolerancia a la exposición de sal, presentándose una reducción de 3 logaritmos al 14% y un efecto letal a partir del 16% (figura 4). La respuesta de las bacterias a la salinidad puede describirse bien, como una relación dosis-respuesta, debido al comportamiento de las mismas al incrementar la concentración de sal en el medio. El efecto inhibitor de las altas concentraciones de sales en los procesos microbianos es una combinación de los efectos del potencial osmótico altamente negativo y de la toxicidad iónica específica, su acción se lleva a cabo en el citoplasma de las células microbianas, interrumpiendo muchos procesos celulares importantes para el mantenimiento celular, entre estos, pueden conducir a la inhibición enzimática debido a la salinidad causada por la elevada fuerza iónica, además, se han identificado toxicidades iónicas específicas, por ejemplo, algunas enzimas son particularmente sensibles al Na⁺ y Cl⁻ debido a las interacciones de los iones con los sitios de unión inhibitorios, por consiguiente, las enzimas podrían

calificar como objetivos de toxicidad salina primaria que determinan la sensibilidad de los organismos al estrés salino. Entre otros efectos, se ha demostrado que los iones de cloruro dentro de las células inhiben la síntesis de proteínas al evitar la unión de los ribosomas al ARNm, ocasionando también, cambios estructurales en las proteínas de la membrana, haciendo que se afecten sus funciones, y por tanto, no invierten recursos en la producción de biomasa y asignan el sustrato hacia funciones de mantenimiento en respuesta a la exposición a la sal, lo que resulta en una disminución del crecimiento microbiano como se demostró en los recuentos obtenidos (Rath, M., *et al* 2016).

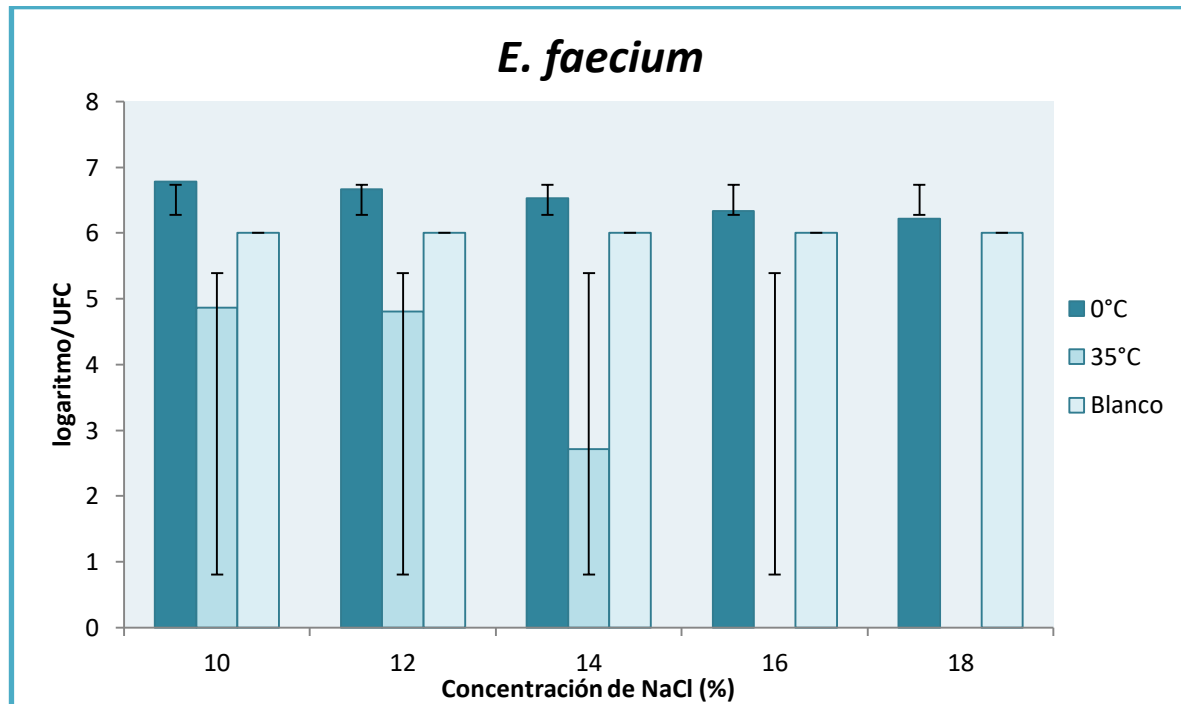


Figura 5. Comparación del efecto de la concentración de sal a diferentes temperaturas sobre las *E. faecium*.

Comprender la respuesta fisiológica de las bacterias al estrés combinado de temperatura y salinidad es muy importante, se ha informado que al someter a las bacterias aun estrés osmótico causa una alteración en la fisiología y la estructura de las comunidades microbianas. A su vez, algunos microorganismos tienen la capacidad de aumentar el número de osmolitos (alcoholes, azúcares) en respuesta a los tratamientos de déficit osmótico en medios enriquecidos con sal. El mecanismo de acción de estos osmolitos se basa en la estabilización de proteínas manteniéndolas en su estado nativo plegado que tiene una superficie menos expuesta que la forma desplegada. Por tanto, los mecanismos utilizados por los microbios para adaptarse al déficit de agua osmótica inducida por la sal parecen depender más de la acumulación de osmolitos, este fenómeno puede explicar la capacidad de *E. faecium* a tolerar las concentraciones de sal en temperaturas óptimas de crecimiento, ya que es un microorganismo ácido láctico capaz de utilizar su metabolito como mecanismo de defensa (figura 4). La disminución



significativa de *Listeria monocytogenes* a concentraciones relativamente bajas revela que este microorganismo es fisiológicamente sensible al déficit hídrico inducido por la sal, lo que resulta en una considerable contracción y muerte celular en respuesta al estrés osmótico, pero a temperaturas óptimas de crecimiento. No obstante, se debe tener en cuenta que los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a condiciones de estrés ambiental, basadas principalmente en membranas para la disminución del potencial hídrico. Uno de los cambios que generan, es la reasignación de lípidos específicos de la membrana celular que podría ayudar a reducir la relación del área de superficie al volumen y, por lo tanto, el área de superficie celular general expuesta a tensiones ambientales extracelulares, por esta razón, es de suma importancia realizar un seguimiento de estos microorganismos a tiempos más prolongados de incubación para estudiar su comportamiento (Kakumanu, L., & Williams, M., 2014).

9. CONCLUSIONES

- ✓ La técnica colorimétrica utilizada por el equipo VITEK 2, permitió identificar la bacteria ácido láctica autóctona de la salmuera de duchado frío, la cual correspondió al perfil metabólico de *Enterococcus faecium*.

- ✓ Se logró establecer a 35°C una concentración mínima inhibitoria (CMI) de NaCl, del 12% y 14%, sobre *Listeria monocytogenes* y *E. faecium*, con una concentración mínima bactericida (CMB) del 14% y 16%, respectivamente.

- ✓ El efecto antibacteriano del NaCl a través de la reducción logarítmica se evidenció a temperaturas óptimas de crecimiento (35°C), siendo más efectivas en *L. monocytogenes* con una reducción de 6 logaritmos al 14%, a diferencia de *E. faecium* que presentó una reducción de 3 log en la misma concentración.



10. RECOMENDACIONES

- ✓ Evaluar la efectividad del NaCl a la temperatura óptima de crecimiento pero a diferentes tiempos de incubación, con la finalidad de establecer un tiempo mínimo de almacenamiento de la salmuera.
- ✓ Estudiar el efecto combinado del NaCl con otro agente antimicrobiano para potenciar la efectividad junto con la temperatura de almacenamiento y de esta manera garantizar la calidad de la salmuera.



11. BIBLIOGRAFÍAS

- Ambientum. (2019). *Determinación de cloruro*.
- Ángel, J., Cuervo R., Cárdenas, H., Durán, J., Mejía, L., & Rodríguez de la Pava, G. (2009). Efecto de las concentraciones salinas en la inhibición de *Leuconostoc mesenteroides* en un ingenio azucarero del Valle del Cauca. *Revista Científica Guillermo de Ockham*. 7(1), 13–18.
- Baka, M., Noriega, E., Tsakali, E., & Van Impe, J. F. M. (2015). Influence of composition and processing of Frankfurter sausages on the growth dynamics of *Listeria monocytogenes* under vacuum. *Food Research International*. 70, 94–100.
- Binici, A., & Kaya, K., (2017). Effect of brine and dry salting methods on the physicochemical and microbial quality of chub (*Squalius cephalus Linnaeus, 1758*). *Food Science and Technology*.
- Biomériux España. (2019). Equipo automatizado para determinación de ID/AST.
- Buelvas, A., Patiño, H., & Restrepo E. (2012). Efecto de la cadena de frío sobre el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, la calidad fisicoquímica y la alteración de jamones cocidos lonchados empacados al vacío. *Revista Lasallista de Investigación*. 9(2), 55-64.
- Burguet Lago, Nancy, Brito Godoy, Lázaro C, & Cánovas Borges, Iván. (2013). Evaluación de la efectividad de un desinfectante mediante el método de placas de contacto. *Revista Cubana de Farmacia*. 47(2), 185-192.
- Cabezas, J., Redondo, M., Umaña, C., & Arias, L., (2018). Antimicrobial activity of different sodium and potassium salts of carboxylic acid against some common foodborne pathogens and spoilage-associated bacteria. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(1), 56–61.
- Castilho, N. P. A. de, Todorov, S. D., Oliveira, L. L., Bersot, L. dos S., & Nero, L. A. (2020). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fresh sausage by bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and its semi-purified bacteriocin. *LWT*. 118, 2-6.
- Cocoma, J., Sollecito, M., & Bacon, P., (2006). Systemand process for cleansing brine ina food-chilling circuit.



- Chattopadhyay, K., Xavier, K. A. M., Balange, A., Layana, P., & Nayak, B. B. (2019). Chitosan gel addition in pre-emulsified fish mince - Effect on quality parameters of sausages under refrigerated storage. 110, 283-291.
- Condorchem Envitech. (2016). *Gestión de las salmueras*.
- Congreso de la república de Colombia. (1974). Ley 23 de 1973. Diario Oficial, 1973(34), 11–13.
- Congreso de la república de Colombia. (1979). Ley 9 de 1979. Diario Oficial,(36), 1–6.
- Colombia, M. de S. y P. S. de. (2015). Instituto Nacional de Salud- Colombia.
- Dev, G., Williams, C., Sumner, S., & Eifert, J. D. (2016). *Effect of ozone and ultraviolet light on Listeria monocytogenes populations in fresh and spent chill brines. Food Control. 59, 172–177. .*
- Dong, C., Wang, B., Li, F., Zhong, Q., Xia, X., & Kong, B. (2019). Effects of edible chitosan coating on Harbin red sausage storage stability at room temperature. *Meat Science*, 107919.
- Florou., P., Christaki, E., & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*.
- Haastrup, K., Johansen, P., Malskær, A. H., Castro-Mejía, J. L., Kot, W., Krych, L., ... Jespersen, L. (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. *International Journal of Food Microbiology. 285, 173-187*.
- Hammer, P., Jordan, J., Jacobs, C., & Klempt, M. (2019). Characterization of coagulase-negative staphylococci from brining baths in Germany. *Journal of Dairy Science. 102 (10), 1-11*.
- Icontec. (2008). Industrias Alimentarias. Productos Cárnicos Procesados No Enlatados, NTC 1325. Icontec. (571), 1 38.



- Inmanee, P., Kamonpatana, P., & Pirak, T. (2019). Ohmic heating effects on *Listeria monocytogenes* inactivation, and chemical, physical, and sensory characteristic alterations for vacuum packaged sausage during post pasteurization. 108, 183-189.
- Kakumanu, L., & Williams, M. (2014). Osmolyte dynamics and microbial communities vary in response to osmotic more than matric water deficit gradients in two soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 79, 14–24.
- Lekjing, S. (2016). A chitosan-based coating with or without clove oil extends the shelf life of cooked pork sausages in refrigerated storage. *Meat Science*, 111, 192–197.
- Matches, J., & Liston, J. (2005). Effects of incubation temperature on the salt tolerance of *Salmonella spp.* *Anf Tile*. 35(1), 39–44.
- Mandl, K., Hartel, R. W., & Wendorff, W. (2009). Effects of moisture and salt migration on cheese firmness in cheese-in-sausage products. *Journal of Food Engineering*, 91(1), 164–172.
- Martin, A. (2002). Capacidad Antagonista Frente a *Listeria monocytogenes* de dos Sustancias Tipo Bacteriocina Utilizadas en Combinación con NaCl y CO₂.
- Martinez, S., Boluda, N., & Lopez, J. (2017). Estudio de la minimización de la presencia de cloruros y sulfatos en el agua tratada de la EDAR del Valle del Vinalopó (Alicante).
- Martino, K., Leyva T., Pérez V., Reyes, A., Maritza, Suárez, F., & Ortiz, L., (2005). Determinación de *Listeria spp*: en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Revista Cubana de Salud Pública*. 31(3).
- Muñoz, Á., Restrepo, A., & Lópe, H., (2014). Efecto de la Inclusión de Inulina en Salmueras de Marinado sobre Merms y Calidad Sensorial de Pechugas de Pollo. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 67(1), 7219–7228.
- Ordoñez, J., & Patiño, E. (2012). Estudio tecnico para la elaboracion de salchichas a partir de carne de toyo blanco (*Carcharhinus Falciformis*) y almidon MODIFICADO (Maltodextrina). 20.



- Ortega, L. (2010). Enterococos: actualización. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(4), 507-515.
- Pilatasing, J. (2011). Identificación de los contaminantes del recurso agua durante la actividad productiva de la empresa CARNIDEM CIA. LTDA y selección de alternativas de PML para reducir el impacto ambiental de las descargas líquidas generadas.
- Porto, S., Tôrres, O., Ilha, C., Luiz, B., & Sant'Anna, E. S. (2000). Influência da composição da salmoura sobre os parâmetros físico-sensoriais e microbiológicos de filés de peito de frango marinados por imersão. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 18(2).141-145.
- Puškárová, A., Bučková, M., Kraková, L., Pangallo, D., & Kozics, K. (2017). The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11.
- Rath, M., Maheshwari, A., Bengtson, P., & Rousk, J. (2016). Comparative Toxicities of Salts on Microbial Processes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(7), 2012–2020.
- Resolución 631 De 2015. *Diario Oficial No. 49.486 de 18 de Abril de 2015*, 2015(49).
- Safety, F., & Service, I. (2014). Safe Practices for Sausage Production, (April).
- Sindhu, A., & Cornfield, H. (2005). Comparative effects of varying levels of chlorides and sulphates of sodium, potassium, calcium, and magnesium on ammonification and nitrification during incubation of soil. *Plant and Soil*, 27(3), 468–472.
- Sullivan, D. J., Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M., Cummins, E., Kerry, J. P., & Morris, M. A. (2020). Antimicrobial effect of benzoic and sorbic acid salts and nano-solubilisates against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* and chicken microbiota biofilms. *Food Control*. 107 (106786).
- Uribe Botero, B., & Santos, J. M. (2010). Decreto 3930 de 2010 (Octubre 25). 32.
- Wijnker, J., Tjeerdsma M., & Veldhuizen, A. (2017). Phosphate analysis of natural sausage casings preserved in brines with phosphate additives as inactivating agent – Method validation. *Meat Science*. 81(1), 245–248.



- Woods, F., Kozak, M., Flynn, S., & O’Gara, F. (2019). The Microbiome of an Active Meat Curing Brine. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2-11.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Caracterización de la cepa autóctona presente en la salmuera.

Cliente de bioMérieux: Informe de examen Editado 21-nov-2019 16:42 COT
 Equipo N°: Editado por: Veronica Bedoya

Aislamiento: 4.12775 Cepa Bogota-1 (Aprobado)

Tipo de tarjeta: GP Código de barras: 2421140203527001 Prueba de instrumento: 0000142EEDC1 (LABORATORIO ZENU)
 Técnico de preparación: Veronica Bedoya (Veronica Bedoya)

Bionúmero: 112003081773771
 Cantidad de organismo: Organismo seleccionado: Enterococcus faecium

Comentarios:

Patrón McFarland: (0,50 - 0,63)

Información de identificación	Tarjeta: GP	N° de lote: 2421140203	Fecha caduc.: 09-ene-2021 12:00 COT
	Finalizado: 20-nov-2019 22:54 COT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,82 horas
Origen del organismo	VITEK 2		
Organismo seleccionado	91% Probabilidad	Enterococcus faecium	
	Bionúmero: 112003081773771	Nivel de confianza:	Identificación buena
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Enterococcus faecium dRAF(15), AMY(1), BGAL(83).			

Detalles bioquímicos

2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	+	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	+	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	-	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVD	+	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-

ANEXO 2. Absorbancias realizadas de las cepas evaluadas a diferentes concentraciones de NaCl y temperaturas.

Tabla 1. Determinación del CMI y CMB de *E. faecium* mediante la Absorbancia a 600nm.

Abs (600nm)															
(% NaCl	tiempo (0)				Tiempo (24h)								Promedio		
	R1	R2	R3	R4	R1		R2		R3		R4				
	35/ 0°C	35/ 0°C	35/ 0°C	35/ 0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	t(0)
10	0,089	0,092	0,087	0,088	0,095	0,114	0,097	0,12	0,091	0,107	0,092	0,115	0,094	0,114	0,089
12	0,092	0,095	0,09	0,091	0,097	0,112	0,099	0,118	0,093	0,106	0,094	0,113	0,096	0,112	0,092
14	0,095	0,098	0,093	0,094	0,097	0,112	0,099	0,115	0,095	0,104	0,095	0,111	0,097	0,111	0,095
16	0,098	0,101	0,096	0,097	0,098	0,11	0,101	0,113	0,096	0,104	0,097	0,111	0,098	0,11	0,098
18	0,101	0,104	0,098	0,1	0,101	0,109	0,104	0,11	0,098	0,103	0,1	0,109	0,101	0,108	0,101

Tabla 2. Determinación del CMB de *Listeria monocytogenes* mediante la Absorbancia a 600nm.

Abs (600nm)															
(% NaCl	tiempo (0)				Tiempo (24h)								Promedio		
	R1	R2	R3	R4	R1		R2		R3		R4				
	35/ 0°C	35/ 0°C	35/ 0°C	35/ 0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	35°C	0°C	t(0)
10	0,09	0,093	0,089	0,089	0,095	0,118	0,098	0,123	0,091	0,113	0,091	0,128	0,094	0,121	0,09
12	0,093	0,096	0,091	0,092	0,097	0,116	0,098	0,119	0,093	0,111	0,093	0,118	0,095	0,116	0,093
14	0,096	0,099	0,094	0,095	0,096	0,114	0,1	0,117	0,094	0,11	0,095	0,117	0,096	0,115	0,096
16	0,099	0,102	0,098	0,099	0,099	0,113	0,102	0,115	0,098	0,11	0,099	0,115	0,099	0,113	0,099
18	0,102	0,105	0,1	0,101	0,102	0,111	0,105	0,113	0,1	0,108	0,101	0,113	0,102	0,111	0,102

ANEXO 3. Datos correspondientes para la determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de *E. faecium* y *L. monocytogenes*.

Tabla 3. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del NaCl sobre *E. faecium*.

Concentraciones	<i>E. faecium</i>							
	CMB/UFC							
	35°C				0°C			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
14	800	789	960	700	<1600	<1600	<1600	<1600
16	1	1	0	0	<1600	<1600	<1600	<1600
18	0	0	0	0	<1600	<1600	<1600	<1600

Tabla 4. Determinación de la concentración mínima bactericida del NaCl (CMB) sobre *L. monocytogenes*

Concentraciones	<i>Listeria monocytogenes</i>							
	CMB/UFC							
	35°C				0°C			
	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
12	110	85	127	50	<1600	<1600	<1600	<1600
14	2	1	1	0	<1600	<1600	<1600	<1600
16	0	0	0	0	<1600	<1600	<1600	<1600
18	0	0	0	0	<1600	<1600	<1600	<1600

ANEXO 4. Datos de los ensayos realizados para establecer la reducción logarítmica de las cepas por el porcentaje NaCl empleado.

Tabla 5. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la reducción logarítmica de *E. faecium* a 35°C.

Concentraciones	UFC <i>E. faecium</i> /35°C							
	R1				R2			
	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³
10	>1600	16×10 ³	78×10 ³	85×10 ³	>1600	16×10 ³	74×10 ³	67×10 ³
12	>1600	16×10 ³	62×10 ³	92×10 ³	>1600	16×10 ³	53×10 ³	57×10 ³
14	91X10	80×10 ³	4×10 ²	0	89X10	77×10	2×10 ²	0
16	2	0	0	0	2	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0

Concentraciones	UFC <i>E. faecium</i> /35°C							
	R3				R4			
	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³
10	>1600	16×10 ³	80X×10 ³	90×10 ³	>1600	16×10 ³	63×10 ³	57×10 ³
12	>1600	16×10 ³	75X×10 ³	95×10 ³	>1600	16×10 ³	57×10 ³	36×10 ³
14	98X10	84×10	7×10 ²	0	82X10	55×10	1×10 ²	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 6. Efecto de las concentraciones de NaCl sobre la reducción logarítmica de *L. monocytogenes* a 35°C.

Concentraciones	UFC <i>L. monocytogenes</i> /35°C							
	R1				R2			
	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³
10	>1600	52×10 ²	28×10 ²	5×10 ³	>1600	60×10 ²	30×10 ²	8×10 ³
12	153	35×10	2×10 ²	0	182	50×10	7×10 ²	0
14	3	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0

Concentraciones	UFC <i>L. monocytogenes</i> /35°C							
	R3				R4			
	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³	1X10 ⁰	1X10 ⁻¹	1X10 ⁻²	1X10 ⁻³
10	>1600	48×10 ²	27×10 ²	4×10 ³	>1600	95×10 ²	38×10 ²	11×10 ³
12	120	20×10	0	0	30	4×10	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0