



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO CONSERVANTE DE NISINA Y EDTA SOBRE  
ESCHERICHIA COLI EN QUESO FRESCO

Autora

Evelin Gisela Ormaza Villegas

Año  
2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO CONSERVANTE DE NISINA Y EDTA SOBRE  
ESCHERICHIA COLI EN QUESO FRESCO

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y Alimentos

Profesor guía

M Sc. José Ignacio Ortín Hernández

Autora

Evelin Gisela Ormaza Villegas

Año

2018

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, EVALUACIÓN DEL EFECTO CONSERVANTE DE NISINA Y EDTA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* EN QUESO FRESCO, a través de reuniones periódicas con el estudiante Evelin Gisela Ormaza Villegas, en el semestre 2018-2, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

José Ignacio Ortín Hernández  
Master en Gestión de la Seguridad Alimentaria  
CI: 1754826517

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, EVALUACIÓN DEL EFECTO CONSERVANTE DE NISINA Y EDTA SOBRE *ESCHERICHIA COLI* EN QUESO FRESCO, del estudiante Evelin Gisela Ormaza Villegas, en el semestre 2018-2 dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

María Raquel Meléndez Jácome  
Máster en Protección Vegetal y Fitofarmacia  
CI. 1709384067

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Evelin Gisela Ormaza Villegas  
CI. 172444484-7

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, mis padres, mi esposo, mi hija, mis compañeros y profesores por ser apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme sabiduría y fortaleza para poder culminar esta etapa de mi vida tan importante.

A mis padres, por su amor y apoyo incondicional en todo momento

A mi esposo y a mi hija, por toda la paciencia y amor que me brindaron.

## RESUMEN

La industria láctea formal procesa 2'662.560 litros diarios, de los cuales el 31% se destina a la elaboración de quesos. El queso fresco es un producto con alta demanda en el Ecuador; debido a sus características nutricionales, organolépticas y precio accesible. Sin embargo, existe la problemática de contaminación microbiológica de productos lácteos principalmente por *Escherichia coli* que causa diversas enfermedades gastrointestinales. Para evitar su proliferación se ha usado aditivos conservantes que reducen el crecimiento de bacterias y mantienen las características organolépticas del producto. Entre los aditivos utilizados en queso fresco se encuentra la nisina. La nisina no actúa contra bacterias Gram negativas, sin embargo en algunos estudios se ha propuesto que al combinarlas con EDTA pueden penetrar y afectar a las células de bacterias Gram negativas. El objetivo principal de este proyecto es evaluar el efecto conservante de nisina y EDTA sobre el crecimiento *Escherichia coli*. Para esto se realizó un tratamiento testigo y tres tratamientos con distinta concentración de aditivos que se utilizaron en la elaboración de queso fresco, el cual fue inoculado con  $(4.0 \times 10^4)$  de *Escherichia coli* y almacenado. Para determinar la sinergia existente entre los aditivos contra el crecimiento de este patógeno, se realizó un recuento microbiano en placas Neoflim<sup>™</sup>, en los días 5, 8 y 12. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento 1 (100 mg/kg de EDTA y 25 mg/kg) fue el más efectivo porque redujo al 50% la población microbiana. Es decir, el EDTA ejerció un efecto inhibitorio en los tratamientos de mayor concentración de este aditivo. En efecto a mayor concentración de este conservante, el crecimiento de *Escherichia coli* fue menor. En futuros ensayos se recomienda analizar la funcionalidad que tiene la nisina y el EDTA por separado, con el fin de determinar de mejor manera el efecto antimicrobiano que tiene cada conservante sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

In Ecuador the dairy industry processes 2'662,560 liters per day, 31% is used for cheese making. Fresh cheese is a product with high demand nationwide; due to its nutritional, organoleptic characteristics and low price. However, there is a microbiological contamination problem of dairy products, mainly due to *Escherichia coli*, which causes various gastrointestinal diseases. Preservative additives have been used to prevent microbiological proliferation but also maintain the organoleptic characteristics of the product. One of the additives used in fresh cheese is nisin. Nisin does not act against Gram negative bacteria, however, in some studies it has been proposed that when nisin is combined with EDTA, both of them penetrate and affect the Gram negative bacteria. The main objective of this project is to evaluate the preservative effect of nisin and EDTA on *Escherichia coli* growth. For this, a control treatment was carried out and three treatments with different concentrations of additives were used in the elaboration of fresh cheese, which was inoculated with ( $4.0 \times 10^4$ ) of *E. coli* and stored. To determine the synergy between the anti-growth additives of this pathogen, a microbial count was performed on Neoflim<sup>™</sup> plates, on days 5, 8 and 12. The results obtained showed that treatment 1 (100 mg / kg EDTA and 25 mg / kg) was the most effective because it reduced the microbial population by 50%. In conclusion, a higher concentration of EDTA and nisin exerted an inhibitory effect in the treatments, showing a lower concentration of *Escherichia coli*. In future trials it is recommended to analyze the functionality of nisin and EDTA separately, to determine the antimicrobial effect of each preservative on the growth of *Escherichia coli*.

# ÍNDICE

1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	2
2.1 Objetivo General.....	2
2.2 Objetivo específico.....	2
3. Marco teórico .....	2
3.1 Generalidades de la leche para la elaboración del queso fresco .....	2
3.2 Fuentes de contaminación de la leche.....	3
3.3 El queso.....	4
3.4 Producción de queso en Ecuador .....	5
3.5 El queso fresco .....	5
3.5.1 Proceso de elaboración del queso fresco.....	6
3.5.2 Factores que afectan la calidad del queso .....	9
3.5.3 Principales microorganismos encontrados en el queso fresco .....	9
3.6 Escherichia coli .....	10
3.6.1 Pruebas bioquímicas para la identificación de E coli.....	10
3.7 Conservación del queso fresco.....	11
4. Metodología.....	13
4.1 Manejo experimental .....	13
4.1.1 Elaboración del queso fresco.....	13
4.1.2 Procedimiento para identificación de <i>E coli</i> .....	16
4.1.3 Inoculación artificial con <i>E. coli</i> del queso fresco.....	17
4.1.4 Evaluación y recuento microbiano .....	17
4.2 Método estadístico .....	18
5. Resultados y discusión .....	19

5.1 Evaluación de pruebas bioquímicas para verificación de <i>E coli</i> .....	19
5.2 Evaluación del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	21
6. Conclusiones y recomendaciones .....	25
6.1 Conclusiones.....	25
6.2 Recomendaciones.....	25
REFERENCIAS .....	26
ANEXOS.....	34

## INDICE FIGURAS

Figura 1 Porcentaje de destino de leche para la elaboración de productos .....	5
Figura 2 Diagrama de elaboración de queso fresco .....	15
Figura 3 Crecimiento de Escherichia coli en medio MacConkey .....	19
Figura 4 Comparación de la efectividad de los tratamientos .....	23

## INDICE TABLAS

Tabla 1 Clasificación del queso.....	4
Tabla 2 Requisitos microbiológicos leche cruda.....	6
Tabla 3 Límites máximos para contaminantes .....	6
Tabla 4 Requisitos microbiológicos de la leche pasteurizada .....	7
Tabla 5 Requisitos de contenido de humedad y grasa para queso fresco .....	9
Tabla 6 Condiciones de crecimiento de E coli.....	10
Tabla 7 Dosis máxima de nisina en producto lácteos .....	12
Tabla 8 Dosis máxima de EDTA en alimentos .....	13
Tabla 9 Diseño experimental.....	18
Tabla 10 Resultado de pruebas bioquímicas .....	20
Tabla 11 Análisis de varianza para tratamientos en el día 5 .....	21
Tabla 12 Análisis de varianza para tratamientos en el día 8 .....	22
Tabla 13 Análisis de varianza para tratamientos en el día 12 .....	22

## 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana en productos lácteos puede darse a lo largo de la cadena productiva *Escherichia coli* el microorganismo encontrado más frecuentemente en el queso fresco (Faleiro,2009). *Escherichia coli* es una bacteria es gram-negativa en forma de bacilos, no genera esporas, puede ser móvil por flagelos que rodean su cuerpo, capaz de crecer en medios anaerobios y aerobios a 37° (FAO,2015).

Para evitar la proliferación de esta bacteria en la industria láctea se usan aditivos conservantes (Abril y Pilco, 2013). Para esto los aditivos conservantes deben estar incluidos en la legislación vigente (Inen Codex 192-2016) según esta normativa se detalla la aplicación de nisina. La nisina es una sustancia polipeptídica producida por *Lactococcus lactis* a partir de una fermentación en medio lácteo modificado. Esta sustancia presenta actividad antimicrobiana contra un rango limitado de bacterias Gram-positivas (Proquiga,2011).

Es decir, la nisina es efectiva contra gram-positivas pero no gram-negativas ya que tiene una membrana externa y una fina capa de peptidoglicano, a diferencia de la gram-positiva que tiene una pared celular gruesa compuesta de peptidoglicano pero no posee membrana celular externa (Mejia,2016). Estudios realizados por Burbano (2017), mencionan que al aplicar la nisina en conjunto con el EDTA pueden penetrar hasta la membrana y afectar a las células de bacterias gram negativas.

Existe la problemática de contaminación microbiológica de productos lácteos principalmente por *Escherichia coli* que causa diversas enfermedades gastrointestinales. Cabe mencionar que los aditivos conservantes reducen el crecimiento de bacterias y además mantienen las características organolépticas del producto. De tal manera, el alcance de este trabajo de titulación es presentar una propuesta para evaluar el efecto conservante de Nisina y EDTA en queso fresco, lo que representa una alternativa para

elaboración de quesos con mejor calidad microbiológica y que no cause daño al consumidor (López, 2010). Para esto se aplicara métodos de recuento microbiano específicos para determinar a qué dosis de conservantes se podrá inhibir el crecimiento de *E. coli*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto conservante de Nisina y EDTA sobre el crecimiento de *Escherichia coli* en queso fresco

### **2.2 Objetivo específico**

- Analizar la evolución del recuento microbiano en queso fresco contaminado con *E. coli* a lo largo de su vida útil
- Determinar la concentración efectiva de EDTA y Nisina para el control de *E. coli* en queso fresco según la norma INEN 1528- 2012.

## **3. MARCO TEÓRICO**

### **3.1 Generalidades de la leche para la elaboración del queso fresco**

- Calidad nutricional

La leche cruda, es un producto que se obtiene por medio de las glándulas mamarias de las vacas (Pérez, 2011). Delgado, Parisaca, Quispe, Delgado y Aduviri, (2016), mencionan que la leche contiene una alta gama de nutrientes: proteína, grasa, minerales, vitaminas. Sin embargo, estos componentes, no siempre se encuentran en la misma proporción puesto que depende de ciertos factores como: genética, fisiología, alimentación, etc.

- Calidad organoléptica

La leche debe ser blanca opaca o ligeramente amarillenta. El color depende del porcentaje de presencia de moléculas de grasa, proteína y las partículas de

suspensión coloidal. Al adicionar agua o descremado, el color se vuelve blanco azulado (Celis y Juárez 2009). La normativa nacional (NTE INEN 9:2012), menciona que el olor, debe ser suave, lácteo. El sabor debe ser dulce, debido a la lactosa. El aspecto tiene que ser homogéneo, libre de materias extrañas.

➤ Calidad higiénica

La calidad higiénica se define por el contenido microbiano presente en la leche que perjudica de manera significativa en la vida útil de la materia prima como del producto terminado (Abril y Pilco, 2013). La contaminación bacteriana, además de alterar las propiedades fisicoquímicas de la leche, constituye un gran riesgo para la salud humana por la posible presencia de patógenos y sus correspondientes toxinas.

### 3.2 Fuentes de contaminación de la leche

La presencia de microorganismos en la leche puede incrementarse con la existencia accidental de diversos tipos de contaminantes.

➤ Contaminación Intrínseca.

Esta contaminación se relaciona con el estado del animal y la limpieza de ubre, a través de las siguientes vías

- Vía descendente: Las glándulas mamarias son infectadas por la sangre proveniente del animal y el principal microorganismo encontrado es *Mycobacterium*, causante de tuberculosis (Buñay y Peralta, 2015).
- Vía Ascendente: La bacterias se adhieren a la ubre por malas condiciones de ordeño, edad de la vaca y el medio ambiente (Buñay y Peralta, 2015). Principalmente se encuentran los siguientes microorganismos *Streptococcus* y *Corynebacterium*, causantes de la mastitis en las vacas (Villegas y Freire,2011).

➤ Contaminación extrínseca.

Esta contaminación depende del medio externo en donde se ordeña la vaca. La leche al salir de la ubre se expone a varias fuentes de contaminación microbiana que condicionan su manejo posterior (Buñay y Peralta, 2015), tales como: medioambiente, limpieza del animal, limpieza y salud del personal que trabaja, limpieza de máquinas, equipos, utensilios y la calidad del agua (Villegas y Freire,2011)

### 3.3 El queso

Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche” (NTE INEN 2829:2013). El queso es el resultante de la coagulación enzimática y/o de la coagulación acida de la leche, crema, suero de leche, o la mezcla de los mismos, en donde por acción del cuajo se drena el suero formado, respetando los principios de la elaboración del queso (NTE INEN 2829:2013).

En la tabla 1, se explica la clasificación del queso, según su contenido de grasa que está dado sobre el extracto seco; es decir el % de materia grasa se determina una vez que el queso esté desuerado (Burbano, 2016). El contenido de humedad está definido por el porcentaje de humedad del queso sin tomar en cuenta la grasa (Burbano, 2016). Finalmente, según su maduración, se basa en el grado de maduración del queso después de su fabricación (Burbano, 2016).

Tabla 1.

#### *Clasificación del queso*

Contenido en Materia grasa		Contenido de humedad		Por maduración	
>60 %	Extra Graso	< 51	Extra duro	Consumo al finalizar la producción	Fresco
45-60 %	Graso	49 y 56%	Duro	Consumo 7 días después	Tierno

25-45 %	Semi graso	54 y 63%	Semiduro	Consumo de 20 a 35 días	Semicurado
10-25 %	Bajo contenido de grasa	61 y 69%	Semiblando	Consumo de 45 a 105 días	Curado
<10 %	Desnatado	>67 %	Blando	Consumo 100 a 180 días	Viejo

Tomado de (Burbano, 2016)

### 3.4 Producción de queso en Ecuador

La industria láctea formal procesa 2'662.560 litros diarios, de los cuales el 31% se destina a la elaboración de quesos; un 27% representa la leche en funda; 20% leche en cartón; 11% para leche en polvo; 10% para yogurt y el 1% para otros productos lácteos figura 1. (Cil,2014).

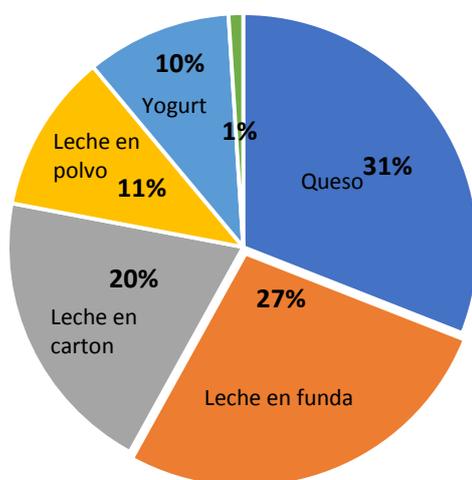


Figura 1. Porcentaje de destino de leche para la elaboración de productos

Tomado de (Cil,2014)

### 3.5 El queso fresco

“El queso fresco es un producto preparado con leche entera, semidescremada, coagulada con ácidos orgánicos y/o enzimas” (NTE INEN 1528:2012). El producto final es un queso no madurado, sin corteza moldeado con una textura firme (Alcívar, 2015).

### 3.5.1 Proceso de elaboración del queso fresco

La leche cruda debe cumplir con porcentajes adecuados de microorganismos, contenido de células somáticas y residuos de sustancias no deseables en la leche para asegurar que la materia prima es de calidad (Sánchez, 2015). En la tabla 3, se muestran los requisitos microbiológicos, y células somáticas que debe cumplir la leche cruda para ser procesada.

Tabla 2.

*Requisitos microbiológicos leche cruda*

Requisito	Límite máximo
<b>Recuento de microorganismos aerobios mesófilos</b>	(Ufc/cm) <sup>3</sup> 1,5 x 10 <sup>6</sup>
<b>Recuento de células somáticas</b>	(unidades/cm <sup>3</sup> ) 7,0 x 10 <sup>5</sup>

Tomado de (NTE INEN 9 : 2015)

Tabla 3.

*Límites máximos para contaminantes*

Requisito	Unidad	Límite máximo
<b>Plomo</b>	mg/kg	0.02
<b>Aflatoxinas</b>	µg/kg	0.5

Tomado de (NTE INEN 9:2015)

Además de esto se realizan pruebas de control de calidad fisicoquímico y microbiológico a la leche, entre esas se destacan las siguientes pruebas:

- Prueba de acidez: También conocida como prueba ATECAL, consiste en determinar la acidez causada por la transformación de la lactosa a ácido láctico, de tal manera la acidez es un indicador de la presencia microbiana. El ácido láctico de la leche cruda debe ser de 15°D a 19°D (Livia,2005).
- Prueba de pH: Se determina la concentración de iones de hidrógeno, el pH es inversamente proporcional a la acidez en grados dornic, donde el pH óptimo de la leche es de 6,6 ya 6,8 (Livia, 2005).
- Prueba de alcohol: Se genera una deshidratación a ciertos coloides hidrófilos, produciendo una desnaturalización cuando la leche no se encuentra estable, indicando que la leche no está en buenas condiciones para ser utilizada (Molina, González, Brito, Carrillo y Pinto, 2001).
- Prueba de densidad: Esta prueba está relacionada directamente con la cantidad de grasa, sólidos no grasos y agua presente en la leche, es decir que se determina la relación existente entre el volumen y la masa dependiendo de la temperatura y de la presión (Livia, 2005).

Al recibir la leche que cumple con todos los parámetros de calidad, esta es filtrada y almacenada a temperaturas inferiores a los 10°C. La leche al estar a bajas temperaturas reduce el crecimiento bacteriano y los ácidos grasos libres. (Sánchez, 2015).

Después se procede a pasteurizar la leche a 73°C durante 15 segundos. De esta manera, se asegura la destrucción de todo tipo de microorganismo patógeno (Sánchez, 2015). No es aconsejable un tratamiento térmico muy elevado, ya que causa una disminución de la aptitud de la leche para coagular, lo que representa mayor tiempo de coagulación, un desuerado más lento (Valbuena, Castro, Lima, Acosta , Bríñez y Tobar, 2004). En la tabla 4, se observa los requisitos microbiológicos de la leche pasteurizada.

Tabla 4

*Requisitos microbiológicos de la leche pasteurizada*

<b>Requisito</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>Método de ensayo</b>
Recuento de microorganismos mesófilos , UFC/cm <sup>3</sup>	5	30.000	50.000	1	NTE INEN 1529-13
Recuento de coliformes, UFC/cm <sup>3</sup>	5	<1	10	1	AOAC 991.14
<i>Detección de Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	0	-	0	NTE INEN 1529-14
<i>Detección de Salmonella</i> en 25g	5	0	-	-	ISO 11290-1
Recuento de <i>Escherichia Coli</i> UFC/g	5	<10	-	0	NTE INEN 1529-15

Tomado de (NTE INEN 10:2012)

Después de la pasteurización, la leche pierde gran parte del cloruro de calcio que se encuentra en forma natural en la leche. Para esto se agrega cloruro de calcio con la finalidad de mejorar el rendimiento, y tener un mejor rendimiento en la cuajada. (Becerra y et al, 2015).

Seguidamente, se añade cuajo líquido a la leche a una temperatura entre 38 y 40°C (INTI, 2011). El cuajo actúa desestabilizando a la caseína, lo que da lugar a la formación de un "gel" o coágulo que engloba al suero y a los glóbulos grasos en su interior. Igualmente, su actividad proteolítica conduce a la formación de compuestos que serán utilizados por las bacterias del fermento para su multiplicación (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema, Boekel, 2001).

Transcurridos 30 minutos de la acción del cuajo se procede al corte y al desuerado. El grano resultante del desuerado se distribuye en los moldes para prensar y moldear la cuajada durante de 30 minutos, para finalmente almacenar una temperatura de refrigeración y evitar contaminación cruzada (INTI, 2011).

### 3.5.2 Factores que afectan la calidad del queso

La calidad del queso fresco depende principalmente del pH. El pH provoca cambios en la cuajada del queso generando una relación directa en la sinéresis, es decir a mayor acidez, mayor sinéresis (Becerra y et al, 2015). Así mismo, una humedad excesiva afecta directamente al sabor y a la textura durante la conservación (Alcívar, 2016). Otro factor que afecta la calidad de la leche, es la sal en altas concentraciones que reduce la actividad enzimática proteolítica; provocando un aumento en la salida de agua presente en la sinéresis. Por ende, se reduce la humedad y se obtiene mayor dureza en el queso (Alcívar, 2016). En tabla N° 6, se detalla el contenido máximo de humedad y contenido mínimo de grasa que debe cumplir el queso.

Tabla 5.

*Requisitos de contenido de humedad y grasa para queso fresco*

<b>Tipo o clase</b>	<b>Humedad % máx NTE INEN 63</b>	<b>Contenido de grasa en extracto seco, % m/m min NTE INEN 64</b>
Semiduro	55	-
Duro	40	-
Semiblando	65	-
Blando	80	-
Rico en grasa	-	60
Entero o graso	-	45
Semidescremado	-	20
Descremado	-	0.1

Tomado de (INEN 2012)

Jácome y Molina (2008), afirman que la calidad del queso depende de la calidad de la leche cruda, proceso de elaboración del producto y finalmente de la contaminación microbiológica.

### 3.5.3 Principales microorganismos encontrados en el queso fresco

El queso por su naturaleza es uno de los alimentos con mayor facilidad de alteración de origen microbiológico, puesto a que tiene pH de 5.3,  $a_w$  de 0.98 y

nutrientes, que benefician al crecimiento de varios microorganismos (Moreano,2009). Entre los principales microorganismos encontrados en el queso están *Enterobacteriaceas*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Escherichia coli* (Alcívar, 2016). Cabe mencionar que la *Escherichia coli* es el microorganismo más frecuente en la elaboración de quesos (Moreano,2009).

### 3.6 Escherichia coli

La *Escherichia coli* es una bacteria, gram-negativa en forma de bacilo, que no genera esporas, puede ser móvil por flagelos que rodean su cuerpo, capaz de crecer en medios anaerobios y aerobios a 37° (FAO, 2015). En la tabla 7, se describen los principales factores que determinan el crecimiento de *E coli*.

Tabla 6

*Condiciones de crecimiento de E coli.*

<b>Factores</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Optimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>Temperatura</b>	7-8	35-40	46
<b>Ph</b>	4,4	6-7	10
<b>Actividad del agua</b>	0,95	0,995	-----

Tomado de (Elika,2013)

#### 3.6.1 Pruebas bioquímicas para la identificación de E coli

Las pruebas bioquímicas son una serie de análisis que sirven para determinar la actividad metabólica de una cepa pura de microorganismos, al poner en evidencia las características metabólicas propias, es decir, si fermentan azúcares, degradan compuestos, producen compuestos coloreados, etc. (Bailón, Cruz, y Cervantes, 2003)

Para determinar la presencia de E coli se realizan las siguientes pruebas:

➤ **Pruebas SIM**

La prueba de (Sulfuro-Indol-Motilidad), se basa en determinar la producción de H<sub>2</sub>S a partir de aminoácidos azufrados. La prueba de indol se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, que degrada el aminoácido triptófano a indol, al añadir el reactivo de Kovacks (Bailón, Cruz, y Cervantes, 2003)

➤ **Prueba Ureasa**

Esta prueba se utiliza para determinar la capacidad de los microorganismos para hidrolizar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa. (Wiener,2000).

➤ **Prueba de TSI**

Esta prueba se utiliza para la identificación de patógenos entéricos gram negativos. Se emplea para detectar la fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa, con formación de ácido y gas, y también para detectar producción de ácido sulfhídrico. (Valtek,2000)

➤ **Prueba Citrato**

Esta prueba es utilizada para la diferenciación de enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía (Wiener,2000).

### **3.7 Conservación del queso fresco**

Para mantener la calidad del queso, se conserva con frío, calor, conservantes químicos o una combinación de estos métodos (Llumiquinga,2017). Otras formas de conservar los alimentos incluyen la fermentación (Abril y Pilco, 2013).

Los aditivos conservantes son sustancias que se incorporan al alimento para aumentar el tiempo de vida útil, seguridad y estabilidad microbiológica (Ibáñez,

Torre e Irigoyen, 2006). Villada (2010), menciona que son sustancias que pueden llegar a inhibir el crecimiento microbiano, además de retardar o detener procesos que provoquen el deterioro del queso. Entre los aditivos utilizados para la conservación del queso, se encuentra la nisina.

La nisina es una bacteriocina sintetizada por *Lactococcus lactis* permitida por la (OMS) para ser utilizada como conservante en las industrias alimenticias principalmente en los productos lácteos (Proquiga, 2011). Este conservante tiene efecto antimicrobiano contra bacterias gram-positivas, puesto que estas se encuentran desprovistas de membrana celular para que ataque a la célula (Sierra, Montoya y Ciro 2013). En la tabla N° 7 se detalla la dosis máxima utilizada en diferentes productos lácteos.

Tabla 7.

*Dosis máxima de nisina en producto lácteos*

<b>Alimento</b>	<b>Dosis máxima (mg/kg)</b>
Nata (crema) cuajada (natural / simple)	10
Queso no madurado	12.5
Queso madurado	12.5
Productos análogos de queso	12.5
Queso de proteínas del suero	12.5
Postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta)	12.5

Tomado de (INEN CODEX 192- 2016).

Estudios realizados por Burbano (2017), mencionan que al aplicar la nisina en conjunto con el EDTA pueden penetrar hasta la membrana y dañar la célula de bacterias gram negativas.

Etilen Diamino Tetra Acetatos, más conocido como EDTA, actúa de forma indirecta como conservante, ya que es antioxidante y secuestrante de iones que estabilizan la capa de lipopolisacáridos de ciertos microorganismos (Ramírez, 2005). En la tabla N 8, se detalla las dosis máximas de EDTA. Sin

embargo, no se contempla el uso en queso fresco debido a que no se ha evaluado su funcionalidad en este producto.

Tabla 8.

*Dosis máxima de EDTA en alimentos*

<b>Alimento</b>	<b>Dosis máxima (mg/kg)</b>
Grasas para untar, grasas lácteas para untar y mezclas de grasas para untar	100
Salsas no emulsionadas (p. ej. salsa de tomate "ketchup", salsas a base de queso, salsas a base de nata (crema) y salsas hechas con jugo de carne asada "gravy")	75
Cerveza y bebidas a base de malta	25
Pescado y productos pesqueros cocidos	50
Complementos alimenticios	150

Tomado de (INEN CODEX 192- 2016).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Manejo experimental

#### 4.1.1 Elaboración del queso fresco

El proceso de elaboración de queso fresco, de acuerdo al protocolo descrito por (Walstra, Geurts, Noomen, Jellema, Boekel, 2001). Se detalla en la figura 2.

Al recibir la leche cruda se realizaron pruebas de calidad como; ATECAL, para realizar esta prueba se recolecto 10 mL de leche, y se agregó 4 gotas de fenolftaleína, después se agregó hidróxido de sodio hasta que la leche cambie de color a rosa pálido. En la prueba de alcohol se tomó 5mL de leche y se agregó 5 mL de alcohol y se verificó si hubo cambios en la leche. Posteriormente se recolectó 2ml de leche y 2ml del reactivo california mastitis test y se determinó los cambios presentes. Y finalmente se realizó la prueba de

la densidad, en donde se colocó 30 mL de leche y se determinó la densidad con la ayuda de un densímetro.

Una vez realizadas las pruebas y determinar que la materia prima es de calidad, se calentó la leche en la marmita y se agregó sal y sorbato de potasio. Al llegar a temperatura de pasteurización de 73°C. Se dejó esta temperatura durante 1 minuto e inmediatamente se disminuyó a 40°C. Continuamente se añadió cloruro de calcio y se agitó la leche durante 10 minutos.

Posteriormente se dividió los 28 litros de leche en cuatro partes por igual, para agregar las diferentes dosis de los conservantes. El tratamiento (1) de 8 litros de leche, se agregó 700 mg/kg de EDTA y 75 mg/kg. El tratamiento (2) de 8 litros de leche se agregó 525 mg/kg de EDTA y 350 mg/kg. El tratamiento (3) de 8 litros de leche, se agregó 350 mg/kg de EDTA y 525 mg/kg de nisina. En el tratamiento (4) no se agregó ningún aditivo. A los 4 tratamientos se agregó cuajo en la misma cantidad a una temperatura de 38° C y se dejó reposar por 30 min. Después se procedió al corte de la cuajada para el desuerado. Una vez obtenido el grano se colocó en recipientes adecuados para el moldeo y el prensado Después de 30 minutos del prensado, se empacó y se almacenó a temperatura de refrigeración (6 °C).

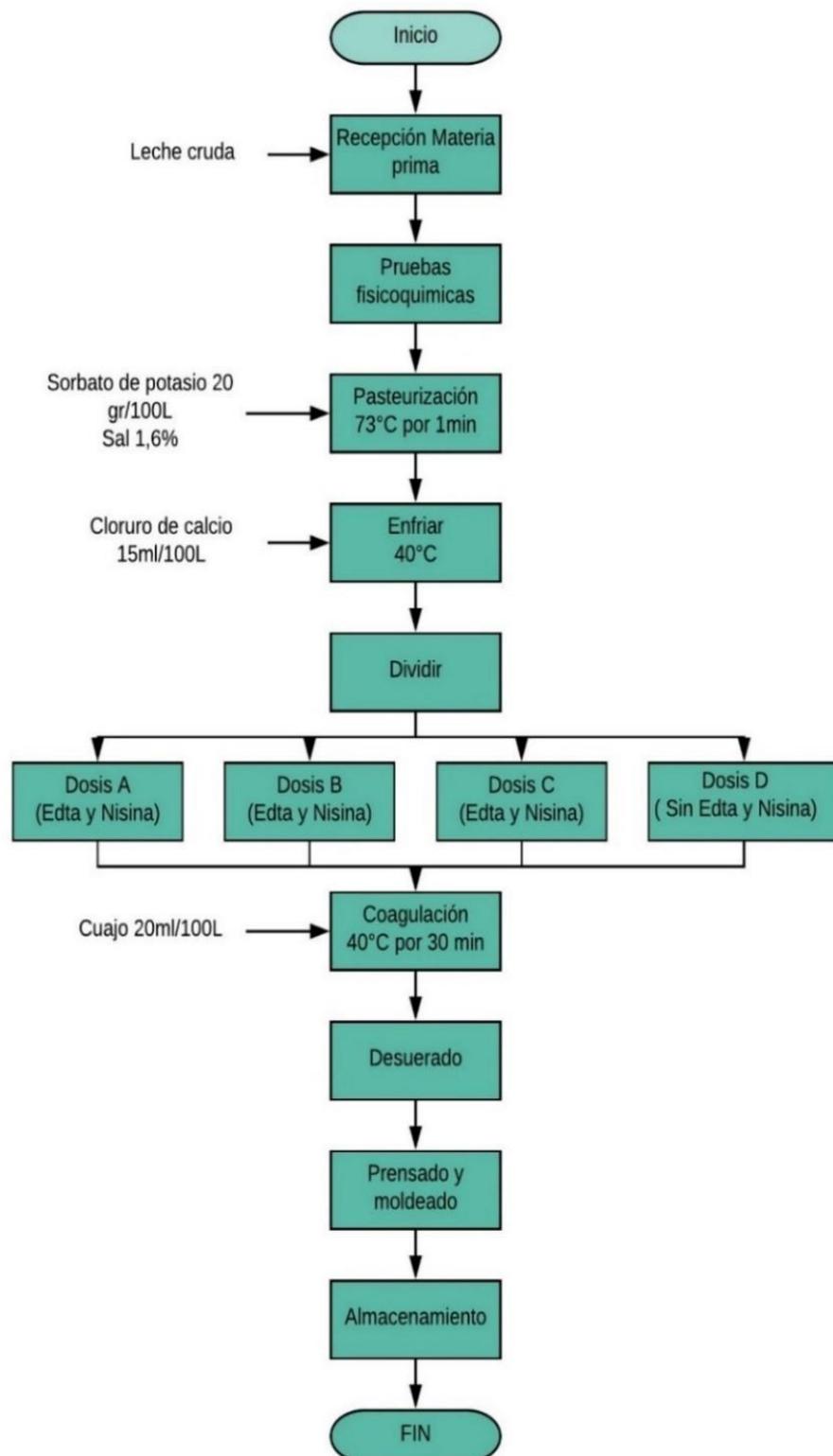


Figura 2. Diagrama de elaboración de queso fresco

#### 4.1.2 Procedimiento para identificación de *E coli*

A continuación, se describen las pruebas realizadas para la identificación de *Escherichia coli*

##### ➤ **Tinción Gram**

La colonia recogida del medio MacConkey se colocó en el porta objeto. Continuamente se fijó la muestra agregando metanol durante un minuto. Posteriormente, se adicionó cristal violeta por un minuto, después se enjuagó con agua estéril. Seguidamente, se agregó lugol y se esperó un minuto. Continuamente se adicionó alcohol, acetona y se dejó reposar durante 30 segundos y luego se enjuagó con agua estéril. Rápidamente se agregó safranina durante un minuto. Y finalmente se agregó una gota de aceite mineral para poder visualizar en el microscopio (Gamazo, López, Díaz, 2005).

##### ➤ **Prueba SIM**

Se recogió una colonia de E coli del medio MacConkey y se sembró el inculo en el centro del medio del tubo hasta la mitad de su profundidad. Finalmente se incubó por 24 h a 37°C, transcurridas las 24 horas se agregó cinco gotas del reactivo kovac para determinar la presencia de indol (Hardy Diagnostics, 2009).

##### ➤ **Prueba Urea**

Con el asa estocada se procedió a inocular una colonia de E coli en el medio urea y se dejó en incubación por 24 horas a 37 °C (MacFaddin, 2003).

##### ➤ **Prueba TSI**

Se procedió a tomar una colonia del medio MacConkey con un asa recta para sembrar inclinadamente en la base del tubo, extendiendo la muestra de lado a lado por la superficie del agar y se incubó por 24 horas a 37°C (Koneman, et al. 2008).

### ➤ Prueba de Citrato

Se tomó una colonia del medio MacConkey y se sembró inclinadamente realizando una sola estría en la superficie del medio (Gamazo, López, Díaz, 2005). Y se incubó a 37°C por 24 horas para determinar el resultado.

#### 4.1.3 Inoculación artificial con *E. coli* del queso fresco

##### ➤ Preparación del inóculo e inoculación en queso fresco

Una vez que se verifica y se confirma el vial E coli, se tomó 1000 ul de E coli 25922 ATCC para sembrar en 90 ml de TSB y se incubó por 24 horas a 37°C (anexo 9).

A partir de este inóculo, se realizaron diluciones seriadas del medio TSB a solución salina sembrando 1 ml por duplicado en cada una de las placas de agar nutritivo. Posteriormente se dejó a incubación por 24 horas a 37°C. Finalmente, se seleccionó la placa que obtuvo entre 30 y 300 colonias (Burbano,2017). Posteriormente, utilizando la cámara de flujo laminar, se inoculó superficialmente 40.000 µl de en cada tratamiento. Finalmente se empacó y se almacenó a una temperatura de refrigeración de 6 °C durante 12 días

#### 4.1.4 Evaluación y recuento microbiano

El análisis microbiológico del queso, se realizó mediante placas Neoflim™, las cuales son aprobadas por la AOAC 070901. El recuento microbiano se realizó a lo largo de la vida útil del queso en el día 5, 8 y 12. Para esto se tomó 10 gramos del queso y se agregó en 90 ml de agua peptonada. Esta mezcla se homogenizó en fundas stomacher durante 2 minutos. Una vez ya homogenizada la muestra problema, se realizó diluciones seriadas por duplicado hasta 10<sup>-6</sup>, tomando 1000 ul de cada dilución para la siembra en placas Neoflim™ y se incubó a 37 °C durante 24 horas, transcurridas las 24 horas se procedió a realizar el conteo de las diluciones con colonias que

estaban en un rango de 30-300 Ufc (Camacho, Giles, Ortegón, Palao, Serrano y Velázquez, 2009).

#### 4.2 Método estadístico

Para determinar la dosis más efectiva de EDTA+Nisina contra el crecimiento de *Escherichia coli*, se realizó un análisis de varianza.

**Ha:** La aplicación de diferentes dosis de conservantes (EDTA +nisina) reduce la presencia de *Escherichia coli* en quesos frescos

Para responder a esta hipótesis, se planteó un diseño completamente al azar (tabla 9)

Tabla 9.

*Diseño experimental*

Tratamiento	1		2		3		4	
Dosis	EDTA	Nisina	EDTA	Nisina	EDTA	Nisina	EDTA	Nisina
	mg/kg		mg/kg		mg/kg		mg/kg	
	100	25	75	50	50	75	0	0
Repeticiones	3		3		3		3	

El diseño experimental está compuesto de;

- Unidad experimental: Queso fresco
- Variable: recuento microbiano en los días 5, 8 y 12

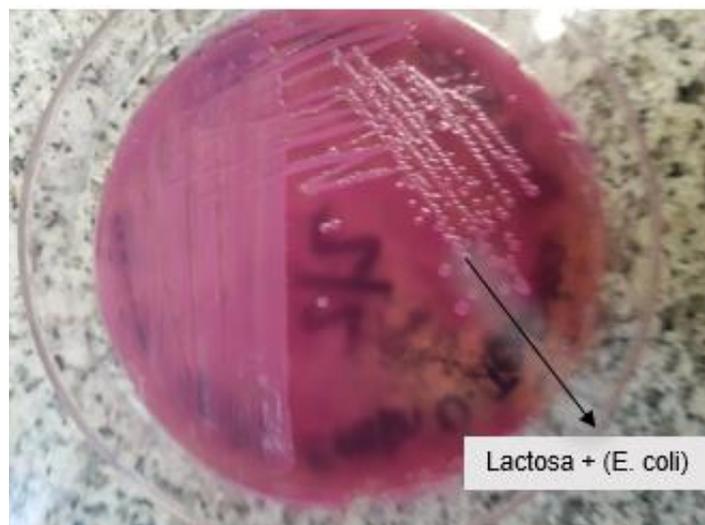
Para analizar el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de *E. coli*, se realizó un diseño completamente al azar. De tal manera se evaluó como variable el recuento de Ufc en placas Neoflim<sup>Tm</sup>, en los días 5, 8 y 12 posterior a la inoculación. Al encontrar diferencias significativas, se realizó la prueba Tukey con el 95% de confianza.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Evaluación de pruebas bioquímicas para verificación de *E coli*

Para determinar la presencia de *Escherichia coli*, se realizó una siembra para la obtención de una cepa pura de este microorganismo en agar Mac Conkey. El medio Mac Conkey es únicamente para el crecimiento de bacilos gram-negativos, porque la presencia de sales biliares y cristal violeta en el medio inhibe el crecimiento de las bacterias gram-positivas (Álvarez, 2014).

En la figura 3, el cambio del color del medio MacConkey, se debe a que esta bacteria es degradadora porque al utilizar la lactosa del medio genera acidez, provocando que el pH descienda de  $7,1 \pm 0,2$  (Álvarez, 2014). En cuanto a la morfología de las colonias tienen forma circular con un borde redondeado; su tamaño es pequeño en su mayoría y mediano con presencia de sales biliares alrededor de las colonias (Jure, Condorí, Leotta, Chinen, Miliwebsky, y Allori, 2010).



*Figura 3.* Crecimiento de *Escherichia coli* en medio MacConkey

En la tabla N 10, se muestra los resultados obtenidos en la identificación de esta bacteria mediante pruebas bioquímicas

Tabla 10

*Resultado de pruebas bioquímicas*

	<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
<b>SIM</b>	Producción de ácido sulfúrico	-
	Indol	+
	Movilidad	+
<b>Urea</b>	Producción de la enzima ureasa	-
<b>TSI</b>	Consumo de Sacarosa, fructosa y glucosa	+
	Producción de gas	+
	Producción de ácido sulfúrico	-
<b>Citrato</b>	Consumo de citrato	-

El resultado de la prueba SIM es negativo a la producción de ácido sulfúrico, ya que esta bacteria no reacciona con el tiosulfato de sodio y ni al citrato de amonio férrico por lo que no se produce sulfuro de hidrógeno ni formación de gas H<sub>2</sub>S (Dabroy,2014). En cuanto a la movilidad fue positivo, puesto que se identifica el crecimiento en torno a la línea de inoculación. Finalmente es positivo a la producción de indol por la presencia de la enzima triptofanasa que hidroliza el triptófano, provocando un anillo rojo después de añadir el reactivo de Kovac (Hardy Diagnostics, 2009).

La prueba de citrato permeasa es negativa, lo que indica que la *Escherichia coli* no utiliza el citrato como fuente única de carbono, por lo que no ocurre cambio de coloración del medio, permanece verde (Wiener,2000).

El resultado de la prueba de TSI es A/A (ácido/ácido), esto se debe a la fermentación de lactosa, fructosa y glucosa que provoca ruptura del medio por la producción de gas y por ende el medio se torna amarillo. La producción de ácido sulfhídrico es negativa, puesto que el medio no presento coloración negra (Valtek,2000).

Finalmente, la prueba de urea es negativa, ya que este microorganismo no hidroliza la urea por medio de la enzima ureasa, y de tal manera no ocurre la liberación de amoníaco el cual provoca un cambio de color rojo en el medio. (MacFaddin, 2003).

El resultado de la prueba de tinción Gram es negativa , ya que este tipo de bacteria no retiene el complejo cristal violeta puesto que al agregar alcohol acetona degrada la membrana externa del microorganismo provocando una decoloración (Reyes, 2011). Estudio realizado por Santambrosio, Ortega y Garibaldi (2009) mencionan, que estas bacterias poseen una pared que contiene menor cantidad de capas de peptidoglicano que no resiste a la tinción gram (Santambrosio, Ortega y Garibaldi, 2009).

## 5.2 Evaluación del crecimiento de *Escherichia coli*

A continuación, se muestra los resultados obtenidos en el análisis de varianza de los distintos tratamientos en los días 5, 8 y 12.

El ANDEVA en el día 5 demostró un valor de P de 0.0001 para el factor "tratamiento". Como se puede observar en la tabla 11, el valor de P es menor a 0.05 por lo tanto existe diferencia significativa en los tratamientos. Al tener diferencias significativas se realiza una comparación de las medias. El resultado de las medias (figura N 4), se observa que el tratamiento A (396,67 ufc/g) presento menor crecimiento microbiano, seguido del tratamiento B (7033,33 ufc/g), el tratamiento C (9233,33 ufc/g) y el tratamiento testigo (92666,67 ufc/g).

Tabla 11  
*Análisis de varianza para tratamientos en el día 5*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>GI</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	1.7201E+10	3	5733728453	1081.8	<0.0001
<b>Error experimental</b>	42401266.7	8	5300158.33		
<b>Total</b>	1.7244E+10	11			
<b>CV%</b>	4,42%				

En la tabla 12, se observa que existen diferencias significativas en el crecimiento microbiano de *Escherichia coli* con respecto a la combinación de EDTA + nisina. Los resultados de las medias en la figura 4 muestran que el tratamiento A (100 mg/kg EDTA + 25 mg/kg nisina) mantuvo un promedio de microorganismos (900 ufc/g) por debajo del tratamiento C (44000 ufc/g) y del tratamiento testigo con (101666,67 ufc/g).

Tabla 12  
*Análisis de varianza para tratamientos en el día 8*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>GI</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	1.5834E+10	3	5277840833	269.47	<0.0001
<b>Error</b>	156686667	8	19585833.3		
<b>Total</b>	1.599E+10	11			
<b>Cv%</b>	6.06%				

En la tabla 13, se observan diferencias significativas entre los tratamientos con un coeficiente de variación del 9,6% en el día 12. Al tener diferencias significativas se realiza un análisis de medias. Los resultados de las medias se observan en la figura 4, donde el tratamiento A con una media de (6133,33 Ufc/g) mantuvo la mayor diferencia en el crecimiento retardado de *Escherichia coli* en comparación con el testigo (146666,67 Ufc/g) y el tratamiento C (81666,67 Ufc/g). Lo que indica que el tratamiento A con (100 mg/kg de EDTA+ 25 mg/kg de nisina) es efectivo para inhibir el crecimiento de *E coli*.

Tabla 13  
*Análisis de varianza para tratamientos en el día 12*

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>GI</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Tratamiento</b>	3.0089E+10	3	1.003E+10	146.72	<0.0001
<b>Error</b>	546886667	8	68360833,3		
<b>Total</b>	3.0636E+10	11			
<b>Cv%</b>	9.61%				

La inhibición del crecimiento microbiano de los distintos tratamientos se presenta a través de la figura 3, con el fin de confirmar el potencial inhibitorio de las distintas dosis de conservantes

En la figura 3, se resume el crecimiento microbiano de los distintos tratamientos en los días 5, 8 y 12.

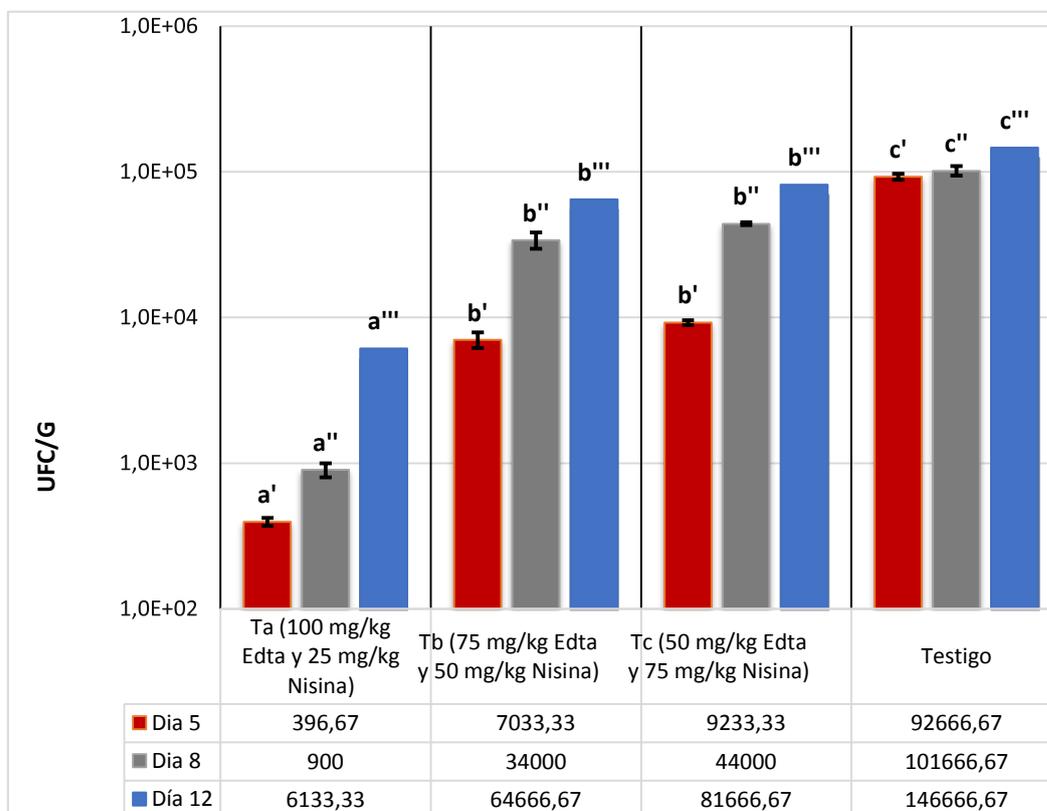


Figura 4. Comparación de la efectividad de los tratamientos

En los datos obtenidos en la figura 4, se muestra una tendencia de crecimiento microbiano cuando el tratamiento tiene menor cantidad de EDTA. Esto se comprueba con el alto recuento microbiano del tratamiento C con EDTA 50 mg/kg + nisina 75 mg/kg. A diferencia del tratamiento A con EDTA 100 mg/kg + nisina 25 mg/kg, que obtuvo menor recuento microbiano, es decir el crecimiento microbiano es inversamente proporcional al aumento en la concentración del quelante en el ensayo, que bajo el tratamiento de mayor concentración (A) llegó a comprometer más del 50% de la población en relación al control. Así mismo, un estudio desarrollado por Burbano (2017), menciona que existe una sinergia entre nisina y EDTA, ya que al utilizar estos dos tipos de conservantes inhibe el crecimiento de bacterias *Pseudomonas*, en su estudio al aplicar (50mg/kg de EDTA y 100 mg/kg de nisina) llega a comprometer más del 30% de la población en relación al testigo

La *Escherichia coli* presentó una fase de retardo de 12 días en su crecimiento en presencia de (100 mg/kg EDTA + 25 mg/kg nisina), con respecto al testigo. La presencia del agente quelante en combinación con bacteriocinas retarda su crecimiento. La acción inhibitoria propia del EDTA en el tratamiento de mayor concentración puede ser explicada por la limitación en la disponibilidad de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) que ejercen funciones de ligantes entre las macromoléculas, lo que provoca la entrada de nisina a la membrana celular y destrucción de la célula (Rojas y Vargas, 2007). Por otro lado, un estudio realizado por López, Escudero y Mendoza (2005), mencionan que se inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* al tratarlas con EDTA y bacteriocinas (nisina), porque el EDTA atrapa sales necesarias de la capa de fosfolípidos y lipoproteínas que cubren a la membrana permitiendo el paso de nisina a la célula.

El mecanismo de acción de nisina contra *Escherichia coli* es la permeabilización de la membrana (pérdida del potencial de membrana, consumo de reservas energéticas celulares, disminución en la síntesis de DNA, RNA y proteínas), y finalmente se provoca una lisis celular (López, Escudero y Mendoza, 2005)

Además, se determina que la bacteria se encuentra en una fase exponencial en división binaria, donde la duplicación está a ritmo constante (Riverón, Ramírez, Herrera, Barreras, Zayas Regueiro, 2012). Sin embargo, el queso al estar en una funda cerrada la población microbiana no puede crecer indefinidamente en forma exponencial, ya que se puede dar las limitaciones del crecimiento por agotamiento de algún nutriente esencial (Brooks, Mors, Carroll, Butel, Mietzner, 2011)

Cabe mencionar que el EDTA en queso fresco no se contempla su uso. Para esto se basó la concentración de los tratamientos partiendo de la dosis máxima utilizada en grasas lácteas para untar. En cuanto la nisina se estableció la dosis máxima permitida en queso fresco, la cual es 12,5 mg/kg, sin embargo, la nisina utilizada en el proyecto se encontraba al 50%, por lo que se colocó 25 mg/kg de nisina.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

Se determinó que es necesaria la presencia de EDTA para la acción antagónica de la nisina sobre *E coli*. El tratamiento A con 100 mg/kg de EDTA + 25mg/kg de nisina fue el más efectivo para evitar la proliferación de este microorganismo.

El EDTA ejerció un efecto inhibitorio en los tratamientos de mayor concentración de este aditivo, es decir a mayor concentración de este conservante, el crecimiento de *Escherichia coli* fue menor.

La acción de EDTA y nisina no inhibe por completo los microorganismos, pero si reduce el crecimiento de estos alargando la vida útil del queso.

En el análisis de varianza para el crecimiento microbiano en los días 5, 8 y 10, se obtiene un valor de p de 0.0001, lo que significa que existen diferencias significativas en los tratamientos. De tal manera, al aplicar la concentración del tratamiento A, se inhibe el crecimiento microbiano alrededor del 50% a comparación del testigo.

### 6.2 Recomendaciones

Realizar estudios posteriores para analizar la funcionalidad que tiene la nisina y el EDTA por separado, con el fin de determinar de mejor manera el efecto antimicrobiano que tiene cada conservante sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

Se recomienda realizar nuevas investigaciones para analizar el efecto sinérgico entre nisina y EDTA sobre otro tipo de bacterias en diferentes productos, para poder validar su funcionalidad de estos dos conservantes.

## REFERENCIAS

- Abril, A. y Pilco, V. (2013). Calidad fisicoquímica de la leche cruda que ingresa a la ciudad de Cuenca, para su comercialización (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca
- Alcívar, G. (2015). Aplicación de herramienta de análisis de procesos para mejorar la eficiencia en la tecnología de quesos frescos "La Ganadería" por la producción agropecuaria Chone Limitada (tesis de pregrado) Universidad técnica de Manabí, Manabí
- Álvarez, M. (2014). Caracterización de tipos patógenos de *Escherichia coli* y otros peligros biológicos asociados a la leche de cabra y productos derivados (tesis de pregrado) Universidad de León, León
- Andinamedica. (2000). Agar T.S.I. (Triple Sugar Iron Agar) Recuperado el 17 de febrero de 2018 de <http://andinamedica.com.pe/wp-content/uploads/2016/08/Medio-TSI.pdf>
- ATTCC. (1992). *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) Recuperado el 3 de enero de 2018 de <https://www.atcc.org/~ps/25922.ashx>
- Becerra, J., González, A., Gómez, R., Lucena, H., Izaguirre, C., Moret, Y., Borregales, C., y Pérez, D. (2015). Efecto de la adición de CaCl<sub>2</sub> en leches de razas bovinas en la producción de quesos madurados pasta blanda y su incidencia en las propiedades organolépticas. *Ciencia e Ingeniería*, 36 (2), 105-110.
- Brooks, G., Mors, S., Carroll, K., Butel, J., y Mietzner, T. (2011). *Microbiología médica* (25.ª ed.). México, D.F, México: Mc Graw Hill
- Buñay, N y Peralta, F. (2015). Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que ingresa a industrias Lacto Ochoa - Fernández Cia. Ltda. (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca.
- Burbano, M. (2016). Estudio microbiológico del suero de queso fresco pasteurizado de los productores lácteos del cantón Mejía – parroquia Alóag (tesis de pregrado). Universidad Tecnológica Equinoccial, Pichincha.

- Burbano, P. (2017). Desarrollo de una metodología que evite la proliferación de bacterias del género *Pseudomonas* en queso fresco (tesis de pregrado) Universidad de las Américas, Quito
- Camacho, A., Giles, A., Ortegón, M., Palao, B., Serrano O., y Velázquez, P.(2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. (2ª ed). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- CIL. (2014). La industria lechera busca generar mayor valor agregado para sumarse al Cambio de la Matriz Productiva Ministerio de industrias y productividad Recuperado el 21 de mayo de 2018 de <http://www.industrias.gob.ec/?s=producci%C3%B3n+lechera>
- Dabroy, C. (2014). Determinación de *Escherichia coli* O157:H7 en carne molida de res estándar expendida en carnicerías del mercado central del municipio de Mixco, Guatemala (tesis de pregrado) Universidad de San Carlos Guatemala, Guatemala
- Elika. (2013). *Escherichia coli*. Fundación Vasca para la Seguridad alimentaria Recuperado el 15 de mayo de 2018 de [http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf)
- Faleiro, P. (2009). Formación de biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas (tesis doctoral) Universidad Complutense de Madrid. Madrid
- FAO. (2015). Composición de la leche. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. Recuperado el 24 de febrero de 2018 de <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- FAO. (2016). Prevención de *Escherichia coli* en alimentos Recuperado el 24 de febrero de 2018 de [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)

- Gamazo, C., López, I., y Díaz, R., (2005). *Manual práctico de microbiología* (3.<sup>a</sup> ed.). Barcelona, España: Masson, S.A
- Herrera, M. (2004). El papel del *biofilm* en el proceso infeccioso y la resistencia. *Nova*, 2(2), 71-80.  
doi:<http://dx.doi.org/10.22490/24629448.10>
- Infomed. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibioticos en bacterias gram negativas. Recuperado el 2 de mayo de 2018 de [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos\\_de\\_resistencia\\_a\\_los\\_antibioticos\\_en\\_bacterias\\_gram\\_negativas.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf)
- Inti. (2011). Queso artesanal y ricota Recuperado el 24 de febrero de 2018 de <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/Cuadernillo-QuesoArtesanalyRicotta-2.pdf>
- Jácome, E., y Molina, S. (2008). Efecto de la leche concentrada por microfiltración tangencial en la calidad de queso semimaduro para sanduche, utilizando dos líquidos de lavado y diferentes tipos de grasa. (Tesis de Pregrado), Universidad Técnica del Norte, Ibarra
- Koneman, E., Winn, W., Allen, D., Janda., W., Procop, G., Schreckenberger, P., y Woods, G. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico* (6<sup>ta</sup> ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana
- Livia, M. (2005). EL pH y la acidez de la leche. Manual de Referencias técnicas para el logro de leche de calidad. (2<sup>o</sup> ed).INTA.
- MacFaddin, J. (2003). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica (3<sup>a</sup> ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana
- Mejía. (2016). Correlación diagnóstica entre Tinción de Gram y Urocultivo en el diagnóstico de infección de vías urinarias en el Hospital Roberto Gilbert durante Enero a Junio del 2016 en niños de 0 a 2 años (tesis de pregrado).Universidad Católica de Guayaquil, Guayaquil.
- Microbitos. (2003). Atlas de pruebas Bioquímicas para identificar bacterias. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado el 11 de enero de 2018 de <https://microbitos.files.wordpress.com/2010/06/atlasmicrobiologia1.pdf>

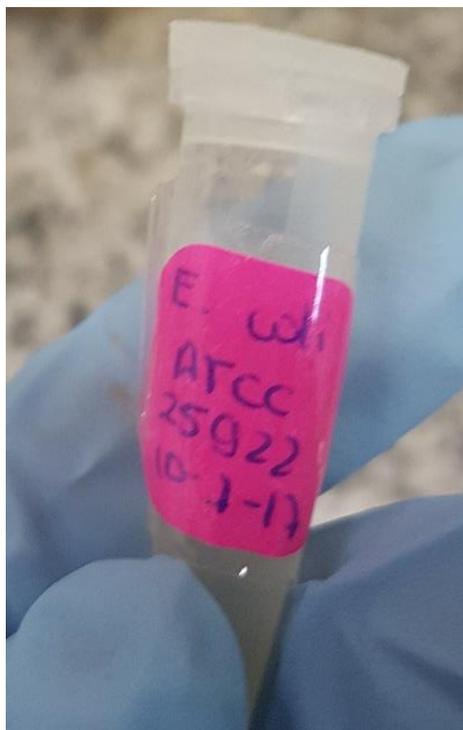
- Molina, L., González, R., Brito, C., Carrillo, B., y Pinto, M. (2001). Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. *Archivos de medicina veterinaria*, 33(2), 233-240. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2001000200012>
- Moreano, A. (2009). Diseño para la implementación de la metodología Seis Sigma en una línea de producción de queso fresco (tesis de pregrado) Universidad del Litoral, Guayaquil.
- NTE INEN 10 (2012). Leche pasteurizada. Requisitos.
- NTE INEN 1528 (2012). Norma general para quesos frescos no madurados. Requisitos
- NTE INEN 2829 (2013). Norma general para el queso
- NTE INEN 9. (2012). Leche cruda. Requisitos.
- Nutrición. (2003). *Aditivos Alimentarios Área de Nutrición y Bromatología Universidad Pública de Navarra* Recuperado el 14 de febrero de 2018 de [http://www.nutricion.org/publicaciones/revista\\_agosto\\_03/Funcionales/aditivos.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/aditivos.pdf)
- OMS. (2015). *Escherichia coli* Recuperado el 1 de junio de 2018 de [http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)
- PROQUIGA S.A. (2011). "Ficha técnica –Nisina" Recuperado el 12 de mayo de 2018 de: <http://www.proquiga.es/descarga/nisina.pdf>
- Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos (tesis de pregrado) Universidad autónoma del estado de Hidalgo, Pachuca de Soto
- Redalyc. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 2 (1), 38-42. Recuperado el 17 de diciembre de 2017 de <http://www.redalyc.org/html/695/69520107/>
- Riverón, E., Ramírez, N., Herrera, D., Barreras, G., Zayas Á., & Regueiro, Á. (2012). Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento

- de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 43 (2), 1-5.
- Rojas, C., & Vargas-Aguilar, P. (2008). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Revista Tecnología en Marcha*, 21(2), pág. 17. Recuperado el 24 de mayo de 2018 de [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/106](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/106)
- Sánchez, A. (2015) Elaboración de un manual de operaciones para el proceso de fabricación de queso fresco de calidad en la empresa Aychapicho Agro's S.A (tesis de pregrado) Universidad Politécnica Nacional, Quito.
- Santambrosio, E., Ortega, M., y Garibaldi, P. (2009). Tinción y observación de microorganismos. Recuperado el 13 de mayo de 2018 de [https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5\\_anio/bioteconologia/practico4.pdf](https://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/quimica/5_anio/bioteconologia/practico4.pdf)
- Scielo. (2001). Aislamiento de cepas de *Escherichia* spp. diferentes de *Escherichia coli* en el Hospital Nacional de Niños de 1995 a 2000. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 45-49. Recuperado de [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85462001000100006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100006&lng=en&tlng=es).
- Scielo. (2016). Evaluación de la calidad de la leche cruda bovina (*Bos taurus*) en la Comunidad Mazo Cruz del Departamento de La Paz-Bolivia. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 3 (1), 43-48. Recuperado el 30 de mayo de 2018 de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2311-25812016000100004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2311-25812016000100004&lng=es&tlng=es).
- Sierra, L., Montoya, O. y Ciro, H. (2013). Evaluación de la nisina como sustancia inactivadora de *Bacillus licheniformis* en el extracto líquido de café. *Revista MVZ Córdoba*, 18 , 3715-3721.
- Smbb. (2013). Efecto de la combinación de bacteriocinas, ac. Láctico y EDTA. Recuperado el 24 de febrero de 2018 de [https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA\\_V/CV-19.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_V/CV-19.pdf)

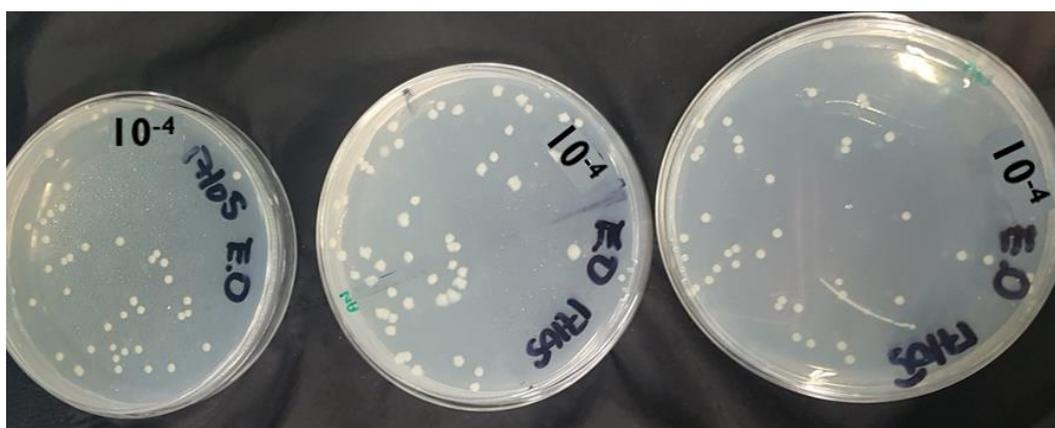
- Valbuena, E., Castro, G., Lima, K., Acosta, W., Bríñez, W., y Tovar, A. (2004). Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica*, XIV (1)
- Villada, J. (2010). *Conservadores químicos utilizados en las industrias alimentarias* (tesis de pregrado) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, DF México.
- Villegas, Z. y Freire, J. (2011). *Evaluación de la calidad físico química y microbiológica de la leche cruda que se expende en el cantón Bolívar provincia del Carchi* (tesis de pregrado) Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- Walstra, P., Geurts, T., Noomen, A. Jellema, A., y Boekel, M. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*, España: Acribia S.A
- Wiener, L. (2000). Urea color, para la determinación de urea en líquidos biológicos Recuperado el 5 de mayo de 2018 de [http //www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/urea\\_color\\_2r\\_sp.pdf](http://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/urea_color_2r_sp.pdf)
- Zeliha A., Yasin, T. (2015). Combined Antimicrobial Effect of Nisin, Carvacrol and EDTA against Salmonella Typhimurium in TSBYE at 4°C and 37°C. *Romanian Biotechnological Letters* Vol (21), 4 Recuperado el 25 de mayo de 2018 de <https://www.rombio.eu/rbl4vol21/6..pdf>

## **ANEXOS**

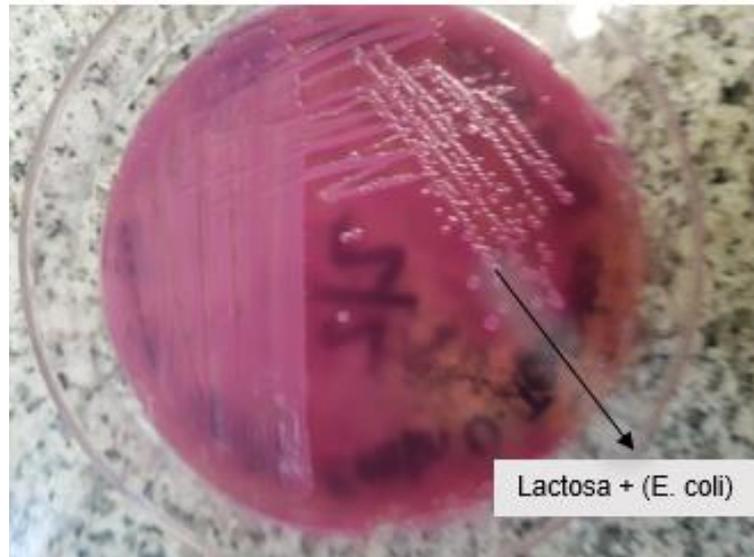
Anexo 1. Cepa de vial de Escherichia coli



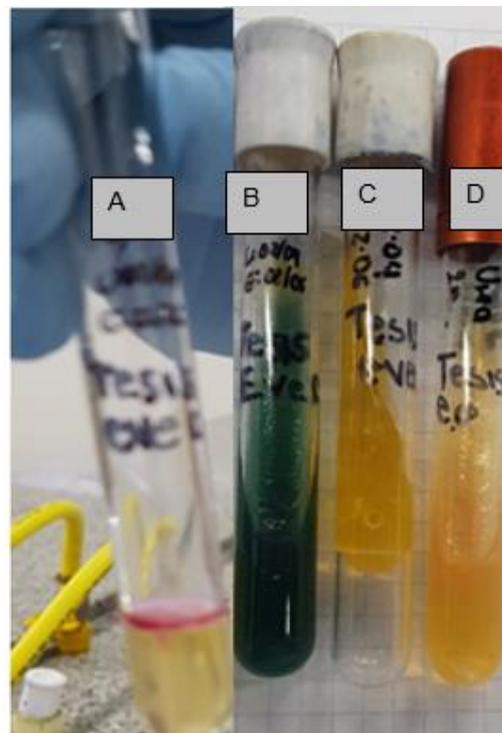
Anexo 2 Cepa pura de E coli para la inoculación del queso



### Anexo 3 Degradación de lactosa de Escherichia coli en Agar Mac Conkey

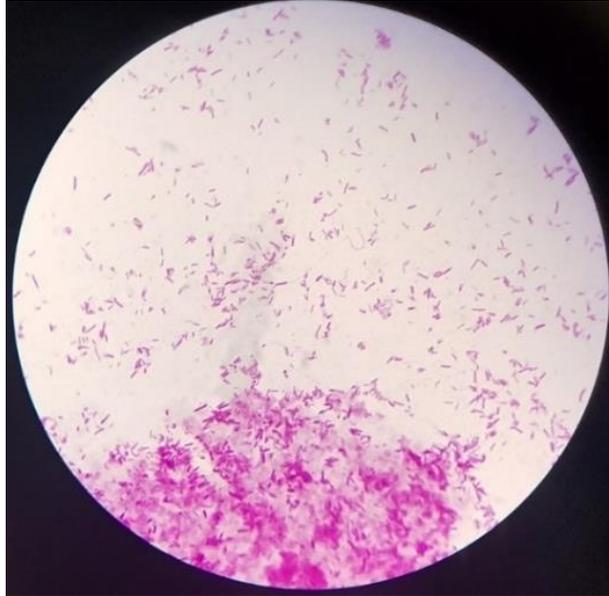


### Anexo 4 Resultado de pruebas bioquímicas de Escherichia coli

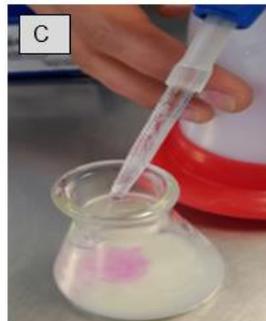
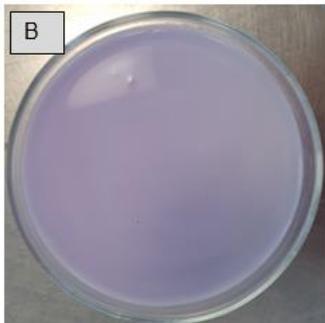
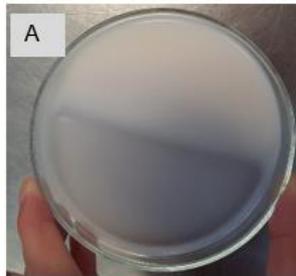


- a) Resultado prueba SIM
- b) Resultado prueba Citrato
- c) Resultado prueba TSI
- d) Resultado prueba Urea

## Anexo 5 Tinción Gram vista de 100x

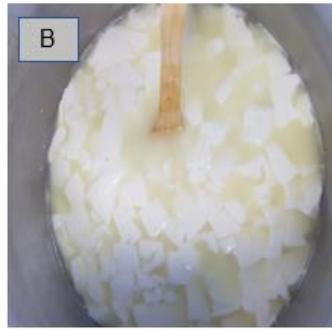


## Anexo 6 Resultado de pruebas de leche



- a) Resultado prueba de alcohol
- b) Resultado de prueba de mastitis
- c) Resultado prueba de ACETAL

## Anexo 7 Elaboración de queso fresco



- a) Pasteurización de la leche
- b) Corte de la cuajada
- c) Moldeado y prensado

## Anexo 8 Inoculación de *Escherichia coli* en queso



## Anexo 9 Aditivos



## Anexo 10 Ficha técnica nisina



Technical Sheet Niseen®-S

### TECHNICAL SHEET Think natural.® Niseen®-S

Think natural.® Niseen®-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

#### Description

Nisin, the active ingredient in Niseen®-S, is a natural protective ingredient consists of several closely related polypeptides used to prevent spoilage and extend shelf life of various foods by inhibiting Gram-positive spoilage and pathogens.

#### Functional uses

Natural antimicrobial preservative, against Gram-positive bacteria. It is effective in a variety of applications, including processed cheese and cheese spreads; blended cheese, club cheese, direct acidified fresh cheese, natural ripened cheese; cream products; dairy and fat based desserts, yoghurt, flavoured milk and milk drinks; fruit and vegetable preparations; dips and snacks; pasteurised liquid egg products; slices and toppings; canned food; processed meats and fermentation products such as beer.

#### Key benefits

- Natural and non-animal source
- Effectively inhibit Gram-positive bacteria, and controls pathogens, such as Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, and Bacillus cereus
- Extends shelf life
- Reduces processing time and lower processing temperature
- Effective over a wide range of pH values (3-8)
- Secures desired food flavors
- Improves cost efficiency due to the low dosage rate used
- Meets consumer demands for food protected with natural antibacterial by fully or partially replacing synthetic additives

#### Usage levels

The recommended dosage of Niseen®-S is in the range 25-500 mg per kg or litre of food. The actual dosage depends on the nature of the product for which it is intended.

#### Directions for use

Niseen®-S should be added to heat processed foods by through dispersion in the food substrate prior to the heating process. Niseen®-S can be added directly to the food as a dry powder or as a pre-suspension in water or milk. In certain processing situations there may be potential for adding Niseen®-S by other methods, such as dipping or after a fermentation process, e.g. stirred yoghurt. Advice should be sought for these more specialised food application areas.

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

Minervum 7113 | 4817 ZN Breda | The Netherlands  
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88  
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20169798  
VAT 822228142801  
Rekening 1222 58150  
IBAN NL23RABO0122258150  
BIC RABONL2U



Think natural.<sup>®</sup> Niseen<sup>®</sup>-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

Composition	Specifications*
Nisin (E 234)	Min. 1.000 IU/mg
Sodium chloride	Min. 50%
Physical/chemical properties	Specifications*
Appearance at 20°C	Powder
Colour	Off-white to light tan
pH of 10% solution	3,3 - 3,8
Loss on drying	Max. 3%
Arsenic	Max. 1 mg/kg
Lead	Max. 1 mg/kg
Mercury	Max. 1 mg/kg
Microbiological properties	Specifications*
Total plate count	Max. 10 cfu/g
Salmonella in 25 g	Absent
Coliform bacteria	Max. 30 MPN/100g
E.coli in 25 g	Absent
Nutritional data	
Energy	200 kJ/100 g
Protein	5 g/100 g
Carbohydrate	6,5 g/100 g
Fat	0,3 g/100 g
Ash	87 g/100 g
Moisture	1,2 g/100 g
Total sodium	32,5 g/100 g

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

Mixerveen 7113 | 4817 2H Breda | The Netherlands  
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 00  
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20140798  
VAT 822228142801  
Rekening 1222 58150  
IBAN NL23RABO0122258150  
BIC RABO2U



Think natural.<sup>®</sup> Niseen<sup>®</sup>-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

### Allergens

According to EU Directive 2000/13/EC amended by Directive 2007/68/EC

	PRESENCE Yes/No	COMMENTS
Cereals containing gluten (wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut or their hybridised strains) and products thereof	NO	Barley source used as raw material fermentation nutrient.
Crustaceans and products thereof	NO	
Eggs and products thereof	NO	
Fish and products thereof	NO	
Peanuts and products thereof	NO	
Soybeans and products thereof	NO	
Milk and products thereof (including lactose)	NO	
Nuts i. e. almond ( <i>Amygdalus communis</i> L.), hazelnut ( <i>Corylus avellana</i> ), walnut ( <i>Juglans regia</i> ), cashew ( <i>Anacardium occidentale</i> ), pecan nut ( <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch), Brazil nut ( <i>Bertholletia excelsa</i> ), pistachio nut ( <i>Pistacia vera</i> ), macadamia nut and Queensland nut ( <i>Macadamia ternifolia</i> ) and products thereof	NO	
Celery and products thereof	NO	
Mustard and products thereof	NO	
Sesame seeds and products thereof	NO	
Sulphur dioxide and sulphites at concentrations of more than 10 mg/Kg or 10 mg/litre expressed as SO <sub>2</sub>	NO	
Lupin and products thereof	NO	
Molluscs and products thereof	NO	

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

Minervus 7113 | 4817 2N Breda | The Netherlands  
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88  
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20168298  
VAT 822228142901  
Rekening 1222.58150  
IBAN NL23RABO0122258150  
BIC RABONL3U



## Think natural.<sup>®</sup> Niseen<sup>®</sup>-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

### GMO status

According to regulations EC no. 1829/2003 and 1831/2003: The raw materials and processing aids used in the production of this product do not contain or consist of GMOs, and are not produced from GMOs.

### Storage

Product should be stored in cool (<25°C) and dry conditions (<65% RH). When opened, store between 4-25°C in original package in dry conditions, away from direct sunlight.

### Shelf life

24 months from date of production when stored according to recommendations.

### Packaging

10 kg per carton / 20 x 500 gram jars

### Legal status

The active ingredients Nisin in Niseen<sup>®</sup>-S is food grade and complies with Commission Regulation (EU) No 231/2012 (9 March 2012). Nisin complies with purity characteristics set forth by EU regulations, US FDA Code, FAO/WHO and Food Chemical Codex. The regulations governing the use of Nisin vary considerably in the countries in which it is currently approved. Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country.

### Safety and handling

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

### Country of origin

The Netherlands

*The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.*

Minervum 7113 | 4817 2H Breda | The Netherlands  
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88  
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20169798  
VAT 822228142B01  
Rabobank 1222 58150  
IBAN NL33RABO0122258150  
BIC RABONL2U

## Anexo 11 Ficha técnica de EDTA



### FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

#### EDTA SAL DISODICA

<b>Sinónimos:</b>	Edetato disódico. Etilendiaminotetraacetato disódico. Edatamil disódico. Tetracemato disódico. Versenato disódico.
<b>Formula Molecular:</b>	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$
<b>Peso Molecular:</b>	372,24
<b>Datos Físico-Químicos:</b>	Polvo cristalino, blanco o casi blanco. Soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol al 96%. Punto de fusión: 252°C (descompone).
<b>Propiedades y usos:</b>	<p>El EDTA y sus sales se utilizan principalmente como agentes quelantes de iones divalentes o trivalentes en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.</p> <p>Se absorbe muy poco a nivel gastrointestinal. Forma un complejo estable y soluble con el calcio, fácilmente excretado por el riñón.</p> <p>También se utilizan como antioxidantes, solos o como sinérgicos de otros antioxidantes, por secuestrar trazas de iones metálicos (como cobre, hierro, manganeso...), que pueden catalizar reacciones de oxidación.</p> <p>La sal disódica se utiliza por vía intravenosa en el tratamiento de emergencia de la hipercalcemia y en el control de arritmias cardíacas inducidas por digitálicos.</p> <p>También se ha usado en la terapia de opacidades calcificadas de la córnea y de quemaduras por cal del ojo, bien tópicamente después de eliminar el área epitelial o por iontoforesis.</p> <p>El edetato disódico se emplea también en irrigaciones para el tratamiento de lesiones oculares por cloruro de cinc, aunque puede ser ineficaz si no se trata durante los 2 primeros minutos.</p> <p>Así mismo se emplea en preparados para la limpieza de lentes de contacto.</p>
<b>Dosificación:</b>	<p>-Agente quelante y sinérgico de antioxidantes: 0,005 – 0,1%.</p> <p>-Hipercalcemia y control de arritmias por digitálicos: en adultos a la dosis de 50 mg/kg/día por vía intravenosa lenta, hasta un máximo de 3 g/día; en niños a la dosis de 40 - 70 mg/kg/día.</p> <p>El inyectable debe ser diluido en 500 ml de suero fisiológico o una solución glucosada al 3%, perfundido preferentemente entre 4 - 6 horas.</p> <p>-Opacidades de córnea y quemaduras oculares por cal: soluciones al 0,35 – 1,85%.</p> <p>-Limpieza lentes contacto: concentraciones de 0,005 – 0,1%.</p>
<b>Efectos secundarios:</b>	<p>El uso de la sal disódica como hipocalcémico está limitado, a pesar de ser muy eficaz, debido a las complicaciones nefrotóxicas que puede ocasionar (necrosis tubular renal).</p> <p>Pueden aparecer también náuseas y calambres.</p>

## FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

Cuando se administra por infusión intravenosa puede provocar tromboflebitis y dolor en el punto de inyección.

Por inhalación produce broncoconstricción.

Otras reacciones adversas incluyen fiebre, malestar, dolor de cabeza, mialgia, respuestas parecidas a la histamina como estornudos, congestión nasal y lagrimeo, erupciones cutáneas, hipotensión transitoria y alteraciones en el electrocardiograma.

Pueden provocar hipocalcemia cuando se administran por infusión intravenosa muy rápida, o en soluciones demasiado concentradas, causando tetania, convulsiones, parada respiratoria y arritmias cardíacas.

<b>Contraindicaciones:</b>	Insuficiencia renal.
<b>Precauciones:</b>	Debe usarse con precaución en pacientes con tuberculosis, insuficiencia cardíaca, o historial de convulsiones. Es necesario el control de las concentraciones de electrolitos en plasma, en particular del ión calcio.
<b>Interacciones:</b>	Puede disminuir el efecto antimicrobiano de algunos conservantes como cloroxileno y timerosal.
<b>Incompatibilidades:</b>	Agentes oxidantes fuertes, bases fuertes, cationes metálicos polivalentes como cobre y níquel.
<b>Conservación:</b>	En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.
<b>Bibliografía:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Martindale, <i>Guía completa de consulta farmacoterapéutica</i>, 1ª ed. (2003).</li><li>- <i>The Merck Index</i>, 13ª ed. (2001).</li><li>- <i>Monografías Farmacéuticas</i>, C.O.F. de Alicante (1998).</li><li>- <i>Handbook of Pharmaceutical Excipients</i>, 6ª ed., 2009.</li></ul>

# Anexo 12 Ficha técnica de Escherichia coli

**ATCC**

Product Sheet

## **Escherichia coli (ATCC® 25922™)**

Please read this **FIRST**

Storage Temp.  
**Frozen: -80°C or colder**  
**Freeze-Dried: 2°C to 8°C**  
**Live Culture: See Propagation Section**



**Biosafety Level 1**



### Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

### Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)

American Type Culture Collection  
PO Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800.638.6597 or 703.365.2700  
Fax: 703.365.2750  
Email: [Tech@atcc.org](mailto:Tech@atcc.org)

Or contact your local distributor

Page 1 of 2

**Designation:** FDA strain Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]

**Deposited Name:** *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

**Antigenic Properties:** Serotype O6, Biotype 1

**Product Description:** Does not produce verotoxin. This organism is a CLSI control strain for antimicrobial susceptibility testing. It is used for media testing, as a negative control for LT toxin production, and as a quality control strain for Abbott, API, Autobac, BBL, bioMérieux Vitek, Biosynth, Difco, IDS, Micro-Media, MicroScan™, Roche Diagnostics, and Sensititre products. Used in susceptibility disc testing of neomycin, colistin [colimycin], kanamycin, cephalixin, gentamicins, cefamandole, cephalothin, tetracycline, cephaloglycin, cephaloridine [cephalomylin], nalidixic acid, and chloramphenicol.



### Propagation

#### Medium

ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

#### Growth Conditions

**Temperature:** 37°C

**Atmosphere:** Aerobic

#### Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #18 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.



### Notes

ATCC® 25922™ is a recommended reference strain for antibiotic susceptibility testing. It has been found that passage in broth often results in a change in MIC levels. Therefore, it is best to keep it on agar and to make stocks for storage immediately. Repeated passage is discouraged.

Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC® 25922D-5™.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).



### References

References and other information relating to this product are available online at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)



### Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

### ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

### Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and



Product Sheet

***Escherichia coli* (ATCC®  
25922™)**

Please read this **FIRST**



Storage Temp.  
**Frozen: -80°C or  
colder**  
**Freeze-Dried: 2°C  
to 8°C**  
**Live Culture: See  
Propagation  
Section**

---



Biosafety Level  
**1**

**Intended Use**

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

**Citation of Strain**

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)

patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).  
© ATCC 2018. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [04/04]

