

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Efecto del ácido cítrico sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa

**TESIS
PARA OPTAR EL TÍTULO DE
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO**

AUTOR

Br. JAIME CARHUAJULCA GARCÍA

TRUJILLO – PERÚ

2012

DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme y darme la fuerza para
superar todo los obstáculos y permitirme
llegar a este momento tan importante en mi
vida.*

*A mi Padre, quien con sus sabios consejos
supo orientarme por el
camino correcto de la superación y que desde
el cielo me acompaña a cada instante.*

*A mi madre, Antonia quien cada día me
demuestra su amor, cariño y apoyo para
seguir adelante y por ser el ejemplo más
grande en mi vida.*

*A todos mis hermanos, en especial a mi
hermano Walter por su inmenso apoyo moral
y ayuda económica, sin él no habría sido
posible llegar a este momento.*

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento:

A la Ms.C. Nelly Vásquez Valles por su dirección, apoyo y oportunidad que me brindó para realizar este trabajo de Tesis, por su paciencia y disponibilidad de compartir sus conocimientos, por ser tan amable y responsable como asesora, gracias Profesora.

A los Docentes de la Escuela de Microbiología y Parasitología por brindarme sus conocimientos y experiencias para mi formación como futuro profesional.

DIRECCION DE SISTEMAS DE INFORMÁTICA Y COMUNICACIÓN

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Dr. ORLANDO VELÁSQUEZ BENITES

Rector

Dra. VILMA JULIA MÉNDEZ GIL

Vice-Rectora Académica

Dr. RENÉ CORTÉZ LARA

Secretario general

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. HERMES ESCALANTE AÑORGA

Decano

Dr. CÉSAR JARA CAMPOS

Secretario de la Facultad

Ms.C. PEDRO ARNALDO ALVARADO SALINAS

Director de la Escuela Académico Profesional de

Microbiología y Parasitología.

CERTIFICACIÓN DEL ASESOR

El que suscribe, en calidad de profesor asesor de la tesis: Efecto del ácido cítrico sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, certifica que ésta ha sido desarrollada de conformidad con los objetivos propuestos en su perfil académico, y que el informe ha sido revisado y acoge las observaciones y sugerencias alcanzadas.

Por lo tanto, autorizo al Br. JAIME CARHUAJULCA GARCÍA a continuar con el trámite de reglamento correspondiente.

Ms.C. Nelly Vásquez Valles

ASESORA

PRESENTACIÓN

Señores Miembros del Jurado Examinador:

En cumplimiento con las disposiciones reglamentarias vigentes de la Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, pongo a vuestra consideración y criterio el presente informe de tesis: Efecto del ácido cítrico sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, con el que pretendo cumplir con uno de los requisitos para optar el Título Profesional de Biólogo-Microbiólogo.

Trujillo, septiembre del 2012.

Br. JAIME CARHUAJULCA GARCÍA

MIEMBROS DEL JURADO

Ms.C. Pedro Alvarado Salinas

PRESIDENTE

Ms.C. Anibal Quintana Díaz

SECRETARIO

Ms.C. Nelly Vásquez Valles

VOCAL

APROBACIÓN

Los profesores que suscriben, miembros del jurado examinador, declaran que el presente informe de tesis ha cumplido con los requisitos formales y fundamentales, siendo aprobado por **UNANIMIDAD**.

Ms.C. Pedro Alvarado Salinas

PRESIDENTE

Ms.C. Anibal Quintana Díaz

SECRETARIO

Ms.C. Nelly Vásquez Valles

VOCAL

viii

INDICE

	Pág.
Dedicatoria	i
Agradecimiento	ii
Autoridades de la Universidad Nacional de Trujillo	iii
Autoridades da la Facultad de Ciencias Biológicas	iv
Certificación del Asesor	v
Presentación.....	vi
Miembros del Jurado.....	vii
Aprobación	viii
Índice.....	ix
Resumen.....	x
Abstract	xi
Introducción.....	1
Material y Métodos.....	13
Resultados	17
Discusión.....	23
Conclusiones.....	28
Recomendaciones	29
Referencias Bibliográficas	30

ANEXOS:

ANEXO 01: Agar Baird Parker (ABP)

ANEXO 02: Agar Nutritivo (AN)

ANEXO 03: Agar Plate Count (PCA)

ANEXO 04: Número de diluciones en los diferentes periodos de tiempo y diferentes concentraciones.

ANEXO 05: Promedios finales de crecimiento (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré de papa en los cinco experimentos, durante 120 horas de evaluación.

ANEXO 06: Diferencia significativa entre las medias, mediante Análisis de Varianza (ANOVA) del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, prueba de los efectos inter-grupos ($p < 0.05$).

ANEXO 07: Comparación mediante la Prueba de Duncan del análisis de las diferentes concentraciones de ácido cítrico comercial con respecto al control (+).

ANEXO 08: Comparaciones mediante la prueba de Tukey del análisis de las diferentes concentraciones de ácido cítrico comercial con respecto al control (+).

ANEXO 09: Unidades experimentales de cada uno de los experimentos realizados.

ANEXO 10: Colonias de *Staphylococcus aureus*, sembrado en Agar Baird Parker después de 48 horas a 37 °C.

RESUMEN

Se evaluó el efecto del ácido cítrico comercial en puré casero de papa a diferentes concentraciones sobre una población conocida de *Staphylococcus aureus*. Los experimentos de trabajo se distribuyeron de la siguiente manera: un primer experimento problema, constituido por seis frascos con 10g de puré casero de papa cada uno inoculado con *S. aureus* más ácido cítrico comercial al 2%; un segundo experimento problema, constituido por seis frascos con 10g de puré casero de papa cada uno inoculado con *S. aureus* más ácido cítrico comercial al 1%; un tercer experimento problema, constituido por seis frascos con 10g de puré casero de papa cada uno inoculado con *S. aureus* más ácido cítrico comercial al 0.5%; un cuarto experimento control (+), constituido por seis frascos con 10g de puré casero de papa cada uno inoculado con *S. aureus*, sin ácido cítrico comercial; y un quinto experimento control (-), constituido por seis frascos, solamente con 10g de puré casero de papa cada uno, a los se les administró 0,5 mL de una suspensión bacteriana a una concentración de 3×10^8 cel/mL de *S. aureus*. Cada uno de los experimentos se mantuvieron a temperatura ambiente y se realizaron las evaluaciones desde las 0 hasta las 120 horas mediante la técnica de recuento en placa. Se hicieron 3 repeticiones. Los resultados obtenidos muestran una reducción de la población inicial de *S. aureus* en los experimentos con 2% y 1% de ácido cítrico, siendo más marcada en el experimento con 2%, en la que una población inicial de 26×10^6 UFC/mL se redujo hasta < 1 UFC/mL a partir de las 72 horas de evaluación. Existiendo una diferencia significativa en los experimentos con 2% y 1% de ácido cítrico con respecto al control (+).

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, ácido cítrico comercial, puré casero de papa.

ABSTRACT

The effect of the citric acid at various concentrations on a known population of *Staphylococcus aureus* in homemade mashed potato. Work systems were distributed as follows: a first experiment problem, consisting of six bottles with 10g of pure homemade potato each inoculated with *S. aureus* more commercial citric acid to the 2%; A second experiment problem, consisting of six bottles with 10g of pure homemade potato each inoculated with *S. aureus* more commercial citric acid to the 1 %; a third experiment problem, consisting of six bottles with 10g of pure homemade potato each inoculated with *S. aureus* more commercial citric acid 0.5 %; A fourth experiment control (+), consist of six bottles with 10g of pure homemade potato each inoculated with *S. aureus*, without commercial citric acid; and a fifth experiment control (-), consisting of six bottles, only with 10g of pure homemade potato each one. Was administered 0.5 mL of inoculums to a concentration of 3×10^8 UFC/mL of *S. aureus* according experiments described citric acid to the commercial concentrations also already mentioned. It was maintained at room temperature and was assessed by bacterial count at 0 to 120 hours. The results show a reduction of the initial population of *Staphylococcus aureus* in experiments with 2 and 1% citric acid, but still more marked in the experiment with 2 %, in which 26×10^6 UFC/ml was reduced to < 1 UFC/mL after 72 hours of assessment. There is a significant difference of growth of *S. aureus* in experiments with 2% and 1% citric acid respect to the control (+).

Keywords: *Staphylococcus aureus*, commercial citric acid, homemade mashed potato.

INTRODUCCIÓN

Con el paso de los años se ha visto la importancia de implementar diferentes estrategias que permitan inhibir o eliminar la presencia de microorganismos contaminantes de los diferentes productos alimenticios, mejorando así la calidad y seguridad de los mismos. Es por eso que desde tiempos remotos, el hombre se vio en la necesidad de utilizar algunas sustancias con propiedades antimicrobianas, basándose en un instinto, creencias y conocimientos adquiridos por la experiencia, al no disponer de estudios y medidas efectivas que ayudaran a contrarrestar dicha situación. De ahí que la aparición de los antimicrobianos constituyó uno de los hitos más trascendentes no sólo de la historia de la medicina, sino también de la historia de la humanidad, al reducir las cifras de mortalidad con su introducción en la clínica a principios de la década de 1940, donde los antimicrobianos comienzan a tomar fuerza mediante descubrimientos de la penicilina por Fleming en 1929 y la estreptomicina por Waksman en 1944 entre otros¹.

Los antimicrobianos alimentarios son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos, aumentando así la resistencia a la alteración de la calidad o seguridad. Los blancos principales de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones alimentarias (agentes infecciosos y productores de toxinas), infecciones y los que alteran los alimentos, produciendo metabolitos finales (catabolitos) o enzimas que causan olores y sabores desagradables, problemas de textura, cambios de coloración o riesgo sanitario².

Los antimicrobianos alimentarios generalmente tienen múltiples blancos con umbrales de concentración para la inactivación o inhibición, pudiendo actuar sobre la pared celular, la membrana celular, las enzimas metabólicas, así como la síntesis de proteínas y sistemas genéticos. Los mecanismos de acción exactos de los antimicrobianos alimentarios frecuentemente no se conocen o no están bien definidos. Esto se debe principalmente a que los investigadores usualmente se centran en un blanco único como una enzima o la membrana celular, sin determinar el efecto sobre otras funciones celulares³.

El uso de antimicrobianos como conservantes ha sido también de gran importancia, ya que han permitido alargar la vida de productos de anaquel al evitar la colonización por microorganismos alteradores; razón por la cual el uso de diversos ingredientes con características antimicrobianas como la sal, el azúcar, el vinagre y las especias han tenido gran relevancia en la industria alimenticia, al igual que diversos compuestos capaces de prevenir los procesos de descomposición, entre los que destacan cultivos, proteínas, derivados vegetales y los ácidos orgánicos, así como sus sales. Gracias a este tipo de compuestos se han logrado reducir notablemente las implicaciones económicas tanto para fabricantes (deterioro de materias primas y productos terminados antes de su comercialización) como para distribuidores y consumidores (deterioro del producto luego de su adquisición y antes de su consumo)⁴.

Uno de los factores que gobierna el crecimiento de los microorganismos en los alimentos es el pH. En general las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 6.5 a 7.5) pero sin embargo son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9.

A diferencia de éstas, los mohos y las levaduras toleran un rango más amplio de pH para su crecimiento, ya que pueden crecer a pH por debajo de 3.5. Las levaduras y mohos deteriorativos proliferan más comúnmente en frutas y vegetales debido a sus características inherentes como su bajo pH y baja capacidad reguladora⁵.

Una manera efectiva de limitar el crecimiento de los microorganismos es incrementar la acidez del alimento. La capacidad de limitar el crecimiento de los microorganismos dependerá del tipo de microorganismo, especie, tipo y concentración del ácido, tiempo de exposición y la capacidad reguladora del alimento.

El modo de acción de los ácidos orgánicos en la inhibición del crecimiento microbiano parece estar relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base, interfiriendo en la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos. Los sistemas biológicos y químicos dependen de la interacción entre los sistemas ácido-base. La célula microbiana normalmente refleja este equilibrio atendiendo al mantenimiento de un pH interno cercano a la neutralidad⁵.

El ácido cítrico se caracteriza por ser un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo, siendo uno de los más demandados

comercialmente en el presente siglo, debido a que es utilizado en diferentes campos de la industria, creciendo a razón de 5-8% anual, fabricándose en más de 20 países, donde la Unión Europea, Estados Unidos y China reúnen el 88% del total mundial⁶.

Debido a sus grandes propiedades, tiene diferentes aplicaciones en industrias tales como la de refrescos y bebidas otorgando propiedades refrescantes, de sabor y acidez natural, actuando a su vez como preservantes de éstas; en la industria de alimentos, contribuyendo a mejorar el sabor del helado, relleno de tortas y cremas de frutas entre otras; en la cosmetología como constituyente de formulaciones, contribuyendo a mejorar la vida, la eficiencia y la apariencia del producto final; en la farmacéutica, dando a las drogas la necesaria estabilización de los ingredientes activos por su acción antimicrobial y antioxidante⁶.

En sus inicios el ácido cítrico era obtenido a partir del jugo de limón. Fue obtenido por primera vez en 1784, por un químico Suizo llamado Carl Scheele, usando en el proceso cal sulfúrico. Fue producido comercialmente a partir de limones italianos cerca de 1826, en Inglaterra por John y Edmund Sturge. El ácido cítrico también fue obtenido sintéticamente a partir del glicerol por Grimoux y Adams en 1880 y luego de forma simétrica de dicloroacetona, es químicamente nombrado ácido 2-hidroxy-1, 2, 3-propano-tricarboxílico, es usado ampliamente en la elaboración de alimentos y su uso depende de tres propiedades: acidez, sabor y formación de sales^{7, 8}.

El ácido cítrico puede ser anhídrido o puede contener una molécula de agua; es un sólido cristalino, inodoro, blanco e incoloro; 1g es soluble en 0,5ml de agua y en dos mililitro de etanol. Su ingesta diaria admisible para el hombre está dada incondicionalmente entre 0 a 60 mg/kg de peso corporal y condicionalmente entre 60 y 120 mg/kg de peso corporal³⁹. Además señala que la dosis permisible de ácido cítrico usado como conservante en alimentos no está regulada debido a su baja toxicidad.

La utilización del ácido cítrico en prácticas de conservación de los alimentos es muy variada, al respecto algunos autores lo señalan como agente anti-pardeamiento enzimático en frutas y en la reducción de la tasa de respiración en zanahorias recién cortadas^{9,10}.

El ácido cítrico, utilizado como conservador de alimentos, tiene una actividad antimicrobiana moderada y excepto a bajos valores de pH, no resultan eficaces como inhibidores. Se dice que el ácido cítrico en combinación con ácido ascórbico inhibe el desarrollo y la producción de toxinas de *Clostridium botulinum* tipo B en patatas cocidas envasadas al vacío, así como una concentración de ácido cítrico no disociado de 0.001% inhibe el crecimiento de *S. aureus* en condiciones anaeróbicas¹¹. Sin embargo la supervivencia de *S. aureus* disminuye por el efecto combinado del ácido cítrico y ácido acético a temperatura de refrigeración¹².

Dorko (1994), determinó que el ácido cítrico inhibe procesos respiratorios de algunos productos vegetales y presenta una actividad antioxidante¹³. Se ha descrito que el ácido cítrico inhibe la actividad de la fosfofructokinasa (PFK)

purificada, la cual cataliza la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6 bifosfato en la vía sendero glicólica del metabolismo respiratorio y se ha indicado que esta enzima juega un papel importante en el control de la glicólisis^{14,15}.

De acuerdo al trabajo realizado por Rojas y col (2008), demostrado que el ácido cítrico como conservante en sandía en atmósfera modificada, a una concentración de 0.75% puede reducir la carga microbiana en un periodo determinado, logrando la aceptación por parte del consumidor¹⁶.

También se ha logrado determinar que los tratamientos con ácido cítrico, permite aumentar la vida útil del tomate de árbol. Con un tratamiento de inmersión en solución de ácido cítrico al 2%, se logra obtener la mayor estabilidad y menor oxidación de los pigmentos (antocianinas y carotenoides). En el que la mayor disminución en la tasa de respiración del fruto se presenta mediante la aplicación del ácido cítrico al 2%, lo cual se demostró que con este tratamiento se puede lograr inhibir la tasa respiratoria en un 16,5%¹⁷.

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. Posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus

enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo, además produce septicemia, impétigo y fiebres^{18, 19, 20}.

S. aureus, fue descubierto en 1882 por Rosenbach. Su potencial patógeno para el hombre y los animales se manifiesta de diversas formas. En la microbiología sanitaria tiene especial interés tanto por las enterotoxinas que produce, como por el significado que se deriva de su presencia y cantidad en un alimento^{21, 22}.

S. aureus es un microorganismo integrante de la familia Micrococcaceae, Gram positivas, de forma esférica u ovoide que se agrupa en racimos; sus colonias presentan un pigmento dorado, amarillo y a veces blanco, termolábiles, coagulasa positiva, inmóvil, no esporógeno, produce hemólisis y fermentación del manitol; crece mejor en presencia de oxígeno, a temperatura óptima de 30-37°C, en un rango de pH 7.0 - 7.5, y en concentraciones de cloruro de sodio de 10% (concentración óptima), entre otras propiedades^{20, 21, 23, 24, 25, 26}.

S. aureus posee tolerancia frente a compuestos como el telurito, cloruro mercúrico, neomicina, poliximina y azida sódica. Aunque los primeros estudios pusieron de manifiesto que la mayoría de estafilococos productores de intoxicaciones alimentarias son coagulasa positivos, la relación aún no está clarificada^{24, 27}.

La principal fuente de *S. aureus* es el hombre (nariz, garganta, yema de los dedos, piel afectada con erosión o forúnculos, ojos y tracto intestinal), pero también son los animales, en especial las vacas que presentan mastitis, las cuales contaminan

la leche y sus derivados. De manera consecuente, los alimentos implicados en la intoxicación son aquellos que cumplen con los parámetros de crecimiento del microorganismo tales como productos cárnicos (jamón y análogos), aves, leche, productos de pastelería con crema y huevo, fundamentalmente^{24, 25, 26, 28, 29}.

S. aureus, es una bacteria ubicua, comensal, que se encuentra entre el 20-50% de la población general³⁰. La portación nasofaríngea de *S. aureus* es un hallazgo común en la población y para los manipuladores de alimentos y personal hospitalario constituye un serio problema. Se han realizado varios estudios que evalúan la erradicación de esta portación mediante terapia antibiótica, pero sin buenos resultados^{31, 32}.

Las enterotoxinas estafilocócicas son de las pocas toxinas bacterianas, de naturaleza proteica, que son termoresistentes. La intoxicación estafilocócica se debe a las toxinas preformadas en los alimentos, cuando el organismo causal crece en su interior. Los tipos de toxina que produce *S. aureus* se clasifica en A, B, C, D Y E; siendo la más frecuentemente implicada en casos de intoxicación la enterotoxina "A"^{18, 19}.

La enfermedad se manifiesta como una intoxicación de comienzo repentino y a veces violento, los síntomas pueden aparecer entre 30 min y 8 horas de haber consumido el alimento, con una media entre 2 y 4 horas, con náuseas, cólicos, vómitos y postración, a menudo se acompaña de diarrea e hipotensión arterial. La muerte es rara, por lo general la enfermedad no dura más de 1 ó 2 días^{21, 15, 27}.

La intoxicación comienza por la ingestión de un producto alimentario que contiene enterotoxina estafilocócica. Los alimentos dañados son los que estuvieron en contacto con las manos de personas que los manipularon sin haberlo cocido más tarde o sin calentarlo o refrigerarlo de manera adecuada, como pasteles, flanes, aderezos de ensaladas, emparedados, etc. La toxina también se genera en el jamón y salami mal curados o en queso mal elaborados. Cuando los alimentos permanecen a temperatura ambiente durante varias horas antes de ser ingeridos, los estafilococos productores de toxina se multiplican y elaboran la toxina. Los microorganismos pueden ser de origen humano tales como secreciones purulentas de dedos u ojos infectados, abscesos, erupciones faciales acneiforme, secreciones nasofaríngeas o de piel al parecer normal y también puede provenir de productos bovinos, como la leche o los productos lácteos contaminados.^{21, 22, 25}.

Siendo el hombre la principal fuente de *S. aureus*, indica entonces que, uno de los grandes problemas de contaminación con este microorganismo es la manipulación de los alimentos²⁴, un ejemplo de ello son los purés de papa elaborados en casa en forma artesanal.

Los purés son uno de los primeros alimentos que se introducen en la alimentación complementaria, debido a su contenido elevado de hidratos de carbono y son, por tanto, muy energéticos; contribuyen al suministro de proteínas, minerales, vitaminas y ácidos grasos esenciales³³.

Uno de los purés que es muy usado, es el de *Solanum tuberosum* (papa), gracias a las cualidades y nutrientes que contiene, usado en la dieta de los niños a partir de los seis meses de vida, es decir cuando empiezan su alimentación complementaria.

La papa amarilla es un cultivo alimenticio típico de las tierras altas de los andes, cuya calidad depende del microclima, altura, por la radiación solar y por la humedad del ambiente donde se produce. Su consumo en fresco es altamente valorado por los habitantes del Perú, Bolivia y Ecuador, apreciando sobretodo sus altos contenidos de materia seca y color, textura y sabor ideales para la preparación de papillas, purés y comidas para poblaciones en riesgo como lactantes, ancianos y las madres gestantes. Esta alta valoración ha convertido a la papa amarilla en un cultivo alimenticio de alto valor en el mercado³⁴.

La papa amarilla tiene color y la textura de la yema de un huevo duro. Es un tubérculo de forma redondeada a ovalada, de piel amarilla, ojos profundos y abundantes y carne amarilla intensa. Entre las variedades de consumo masivo, es la más preciada. Se cultiva en los Andes, principalmente en las zonas de Huánuco, Pasco, Junín y Andahuaylas y buena parte de la producción es para el autoconsumo. Por si fuera poco, la papa amarilla tiene sus propias variedades: Tumbay, Huagalina (amarilla del norte) y limeña (que en realidad es cultivada en la sierra central pero posee gran demanda en la capital)³⁴.

El puré de papas o patatas es un plato elaborado con papas cocidas y molidas, así como otros ingredientes tales como leche, mantequilla, entre otros; que además

de darle un sabor especial al puré, poseen nutrientes que favorecen el crecimiento de microorganismos patógenos tales como *S. aureus*.

Manipular los alimentos con las manos contaminadas es la causa de muchos de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. En el caso de gérmenes patógenos en los cuales el principal reservorio es el organismo humano, como es el caso de *Staphylococcus aureus*, las manos contaminadas representan un factor de riesgo muy importante. Se considera además que la proporción de personas sanas portadoras de estafilococos en un momento dado oscila entre 30 y 50 %, cifrándose en 15 a 35% la proporción de portadores permanentes. Los lactantes, ancianos y mujeres gestantes pueden verse expuestos a dosis infecciosas de gérmenes patógenos y con estos sus toxinas que son vehiculizados por los alimentos, al momento de consumir estos alimentos suplementarios como por ejemplo al consumir el puré de papa elaborados en casa en forma artesanal; y sabiendo que el principal objetivo del procesamiento de alimentos es proveer bienestar al ser humano por medio de alimentos seguros, estables y con una vida de anaquel suficiente; es que se realizó la siguiente investigación con la finalidad de determinar la actividad antimicrobiana del ácido cítrico comercial sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa.

OBJETIVOS:

Objetivo general:

- Evaluar el efecto del ácido cítrico sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en puré casero de papa.

Objetivo específico:

- Determinar el efecto del ácido cítrico a una concentración del 2%, 1% y 0.5% sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en puré casero de papa.

DIRECCION DE SISTEMAS DE INFORMATICA Y COMUNICACION

MATERIAL Y MÉTODO

1. Material de estudio.

- ✓ Cultivo de *Staphylococcus aureus*) proporcionado por el Departamento de Microbiología y Tecnología de los Alimentos de la Escuela de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo.
- ✓ Puré casero de papa amarilla.
- ✓ Ácido cítrico comercial.
- ✓ Leche evaporada “gloria”.
- ✓ Mantequilla “gloria”

2. Métodos.

a. Preparación del inóculo bacteriano (Suspensión de *Staphylococcus aureus*).

A partir del cultivo de *S. aureus*, previa purificación, se sembró en Agar nutritivo (AN) inclinado y se incubó a 37° C por 24 con la finalidad de obtener un cultivo joven de *S. aureus*.

Luego, se realizó una suspensión del cultivo en solución salina fisiológica estéril, hasta obtener una concentración de 3×10^8 cel/mL, comparándolo con el tubo número 01 del Nefelómetro de Mac Farland.

b. Preparación del puré de papa (PP).

Se preparó en una olla, 500g de PP para lo cual se utilizó 500g de papa amarilla, 30g de mantequilla, 40 mL de leche evaporada, medio litro de agua y sal al gusto. Se pelaron y cortaron las papas en trozos pequeños, luego se colocó en una olla con cierta cantidad de agua hasta cubrir las papas para cocinarlas, se agregó sal al gusto e hirvió por 15 minutos hasta que estuvieron blandas.

Posteriormente dentro de una cámara de flujo laminar previamente estéril se aplastó la papa por completo con una cuchara, se le agregó la mantequilla y la leche y se mezcló homogéneamente.

c. Distribución de experimentos.

Se repartió en 30 frascos estériles 10g de puré de papa (PP) en cada uno, luego se llevó a pasteurizar en baño maría a 80 °C durante 60 minutos. Se realizó cinco experimentos. Cada experimento consistió en:

-1° Experimento (seis frascos): PP con *Staphylococcus aureus* más ácido cítrico comercial a una concentración del 2% (Problema).

-2° Experimento (seis frascos): PP con *Staphylococcus aureus* más ácido cítrico comercial a una concentración del 1%, (Problema).

-3° Experimento (seis frascos): PP con *Staphylococcus aureus* más ácido cítrico comercial a una concentración del 0.5% (Problema).

-4° Experimento (seis frascos): PP con *Staphylococcus aureus* y sin ácido cítrico comercial (Control positivo).

-5° Experimento (seis frascos): PP sin *Staphylococcus aureus* ni ácido cítrico comercial (Control negativo).

De cada experimento se realizó 6 repeticiones, los tres primeros experimentos fueron utilizados como problemas, es decir como base de comparación con el cuarto y quinto experimento utilizados como controles.

d. Inoculación de la suspensión.

A cada uno de los frascos se le inoculó 0,5mL de la suspensión de *S. aureus* a una concentración de 3×10^8 cel/mL aproximadamente, excepto al sistema 5 (control negativo).

e. Determinación de la población bacteriana sobreviviente.

La población bacteriana sobreviviente fue determinada mediante la técnica de recuento en placa en medio Agar de Baird Parker (ABP), de la siguiente manera:

Al inicio del ensayo (0 horas) y luego cada 24 horas hasta las 120 horas se evaluó cada una de las unidades experimentales (frascos) de los cinco experimentos; es decir se cogió un frasco de cada experimento cada 24 horas, incluyendo las 0 horas. Luego a cada unidad experimental se agregó 90 mL de SSFE con la finalidad de obtener una dilución al décimo (1/10). A partir de la dilución obtenida, se realizó diluciones

seriadas hasta obtener una dilución que al ser sembrada permitió realizar recuento estándar en placa (ANEXO 04). El experimento cinco (control negativo) se sembró además del medio ABP en Agar Cuenta Gérmenes (PCA).

La siembra se realizó por extensión en superficie, se sembró por duplicado de cada dilución. Luego de realizada la extensión, las placas se llevaron a incubar en estufa a 37° C por 48 horas, pasado dicho tiempo se realizó los recuentos correspondientes a fin de determinar la población sobreviviente.

f. Presentación de análisis y resultados.

Se utilizó como prueba estadística, el Análisis de Varianza (ANOVA) para ver si las concentraciones de ácido cítrico comercial influyen en el crecimiento de *S. aureus*; además se utilizó las pruebas de Duncan y Tukey para determinar si existe o no diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de ácido cítrico usadas.

RESULTADOS

En la figura 1, se muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, tanto en el experimento que contiene ácido cítrico comercial a una concentración del 2% como en el experimento que no contiene ácido cítrico (control +), evaluado cada 24 horas, a partir de las cero horas hasta las 120 horas; observándose en el experimento que contiene ácido cítrico al 2% disminución de la población bacteriana, hasta las 72 horas, no evidenciándose crecimiento posteriormente. En el experimento control (+) se observa que hay incremento de la población bacteriana en dos logaritmos.

En la figura 2, se muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, tanto en el experimento que contiene ácido cítrico comercial a una concentración del 1% como en el experimento que no contiene ácido cítrico (control +), evaluado cada 24 horas, a partir de las cero horas hasta las 120 horas; observándose en el experimento que contiene ácido cítrico al 1% disminución de la población bacteriana en cinco logaritmos a las 120 horas de evaluación. En el experimento control (+) se observa incremento en la población bacteriana en dos logaritmos.

En la figura 3, se muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, tanto en el experimento que contiene ácido cítrico comercial a una concentración del 0.5% como en el experimento que no contiene ácido cítrico (control +), evaluado cada 24 horas, a partir de las cero horas hasta las 120 horas, observándose en el experimento que contiene ácido cítrico al 0.5% un

ligero aumento de la población bacteriana. En el experimento control (+) se observa incremento de la población bacteriana en dos logaritmos.

En la figura 4, se muestra una comparación entre todos los cuatro experimentos ya mencionados, observándose en el experimento que contiene ácido cítrico al 2% mayor disminución del crecimiento de *S. aureus*, no evidenciándose crecimiento, posterior a las 72 horas de evaluación; en el experimento que contiene ácido cítrico al 1% también se observa disminución de la población bacteriana, pero en menor proporción que en el experimento con ácido cítrico al 2%; en cambio en el experimento que contiene ácido cítrico al 0.5% se observa un ligero incremento de la población bacteriana; y en el experimento control (+) se observa que hay incremento de la población bacteriana en dos logaritmos.

DIRECCION DE SISTEMAS DE INFORMATICA Y COMUNICACION

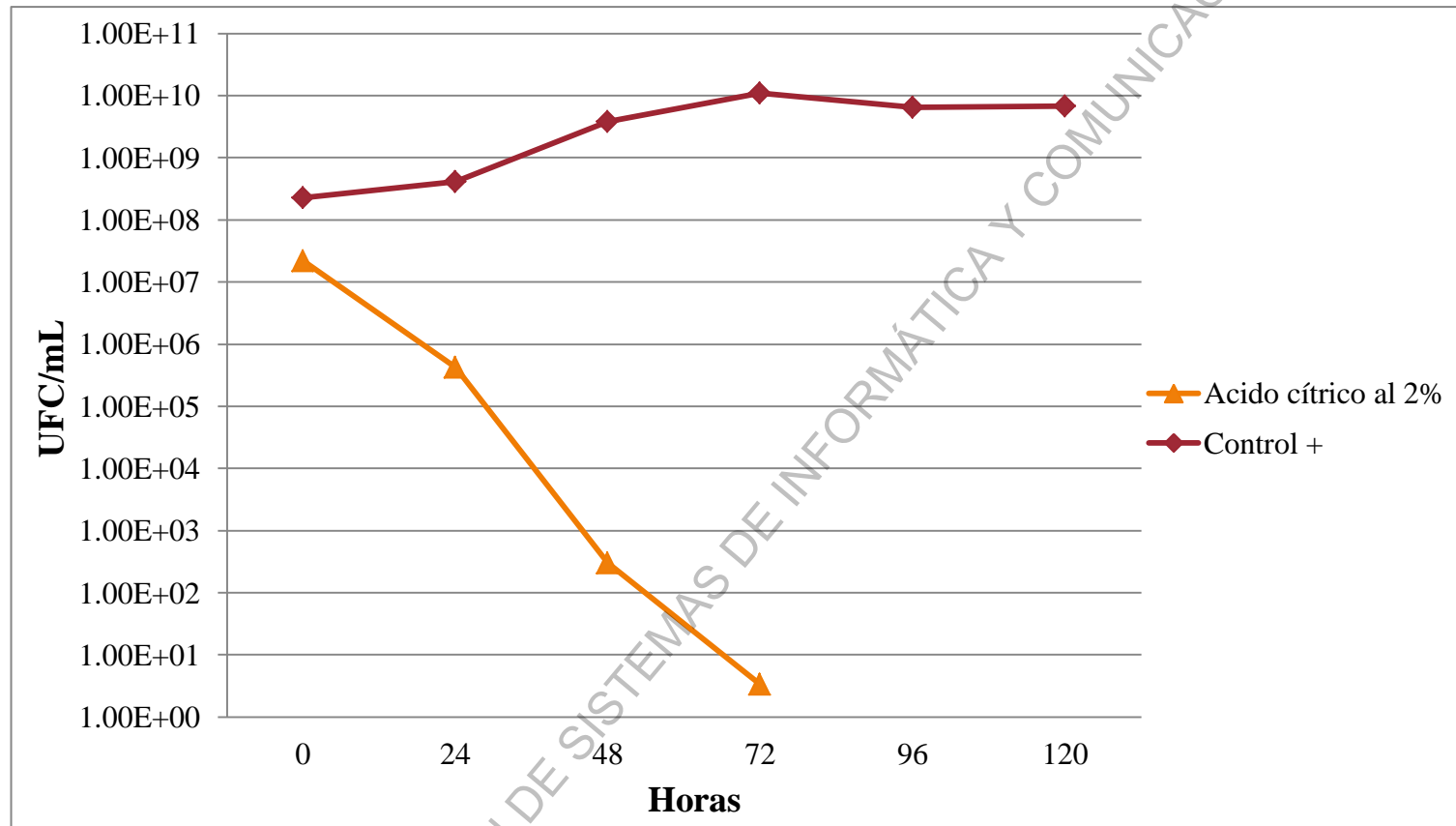


Figura 1: Supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, suplementado con ácido cítrico al 2% y sin ácido cítrico (control +) durante 120 horas de evaluación.

ANOVA: Existe diferencia significativa.

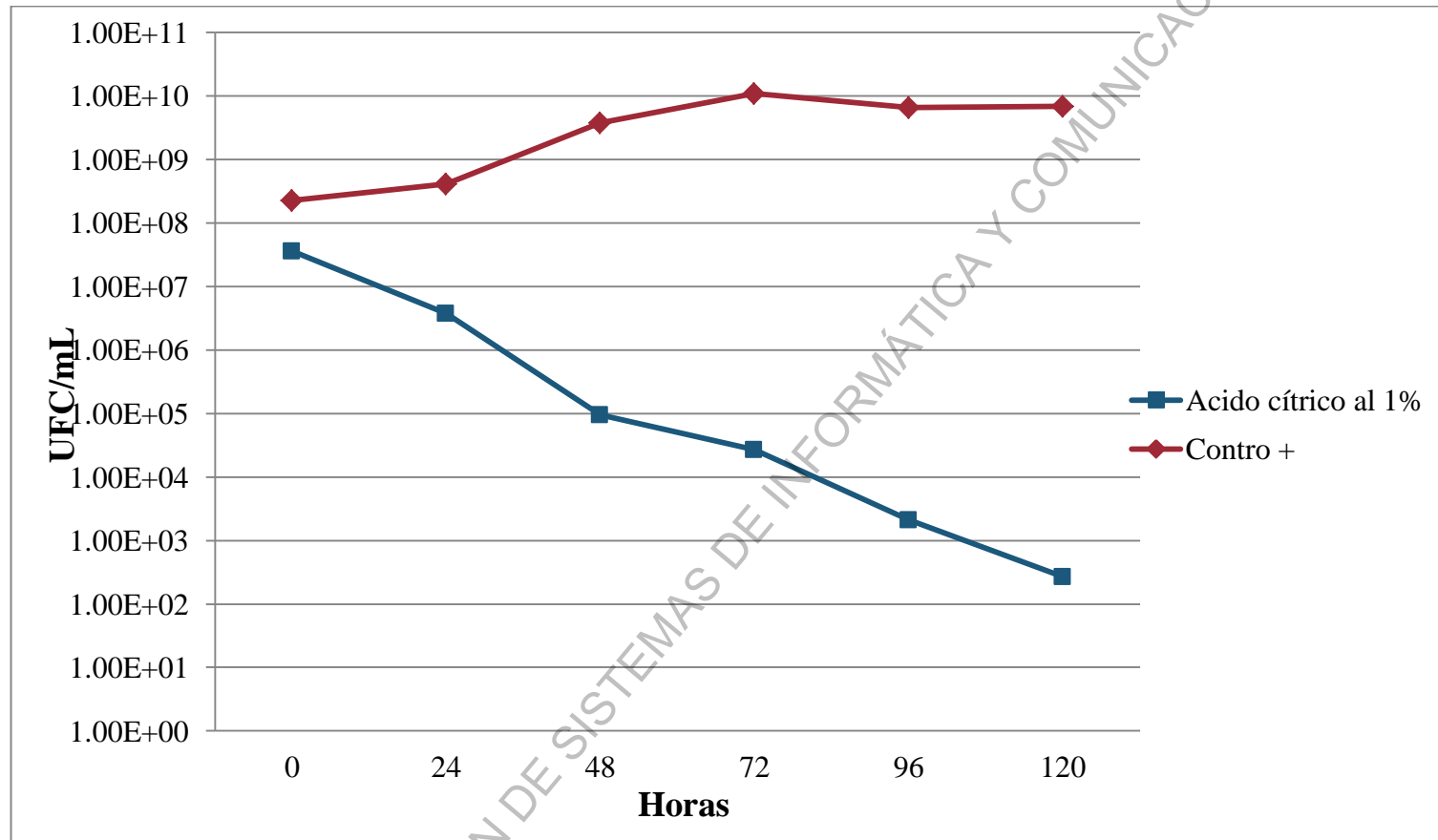


Figura 2: Supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, suplementado con ácido cítrico al 1% y sin ácido cítrico (control +) durante 120 horas de evaluación.

ANOVA: Existe diferencia significativa.

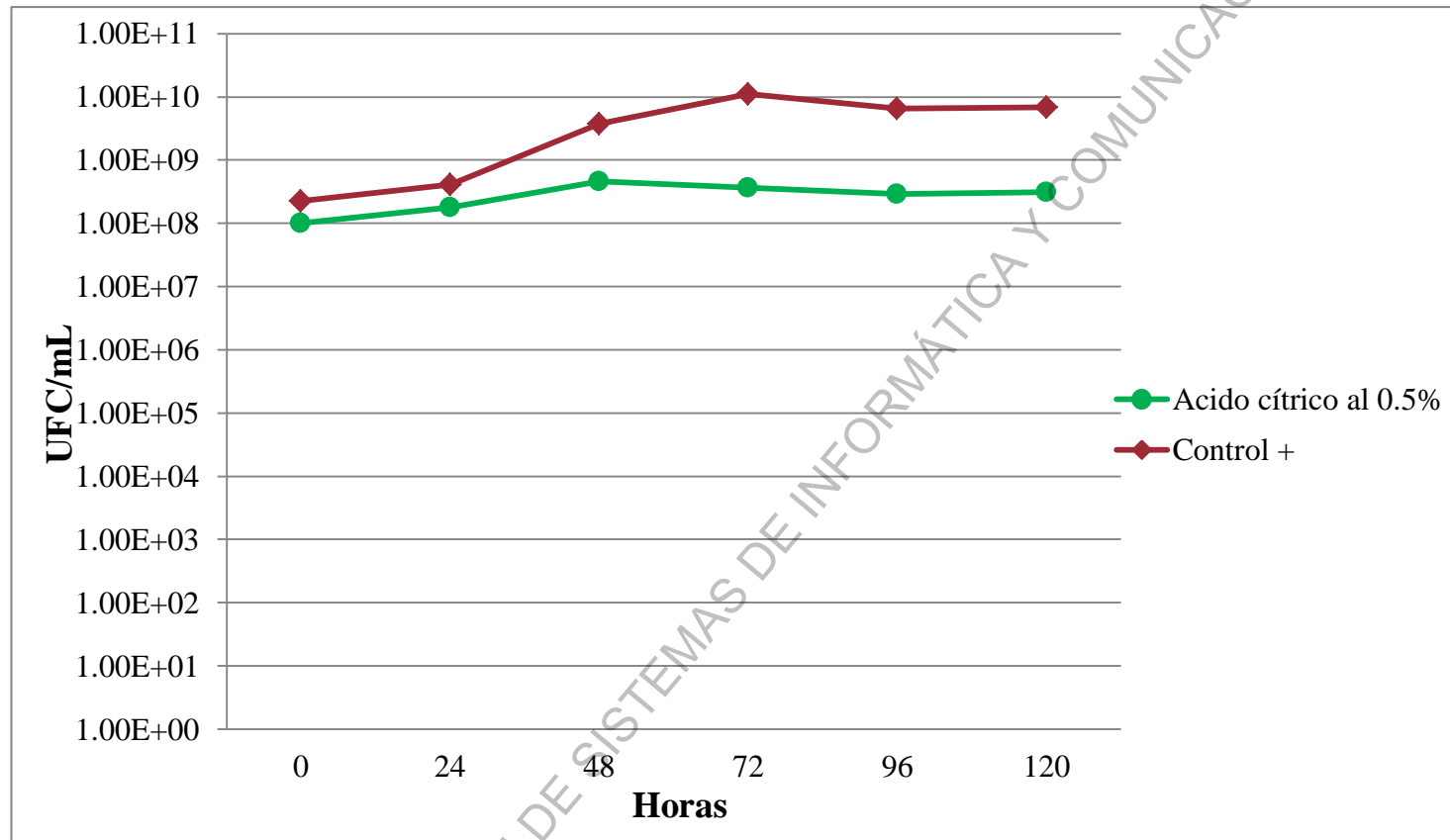


Figura 3: Supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, suplementado con ácido cítrico al 0.5% y sin ácido cítrico (control +) durante 120 horas de evaluación.

ANOVA: No existe diferencia significativa.

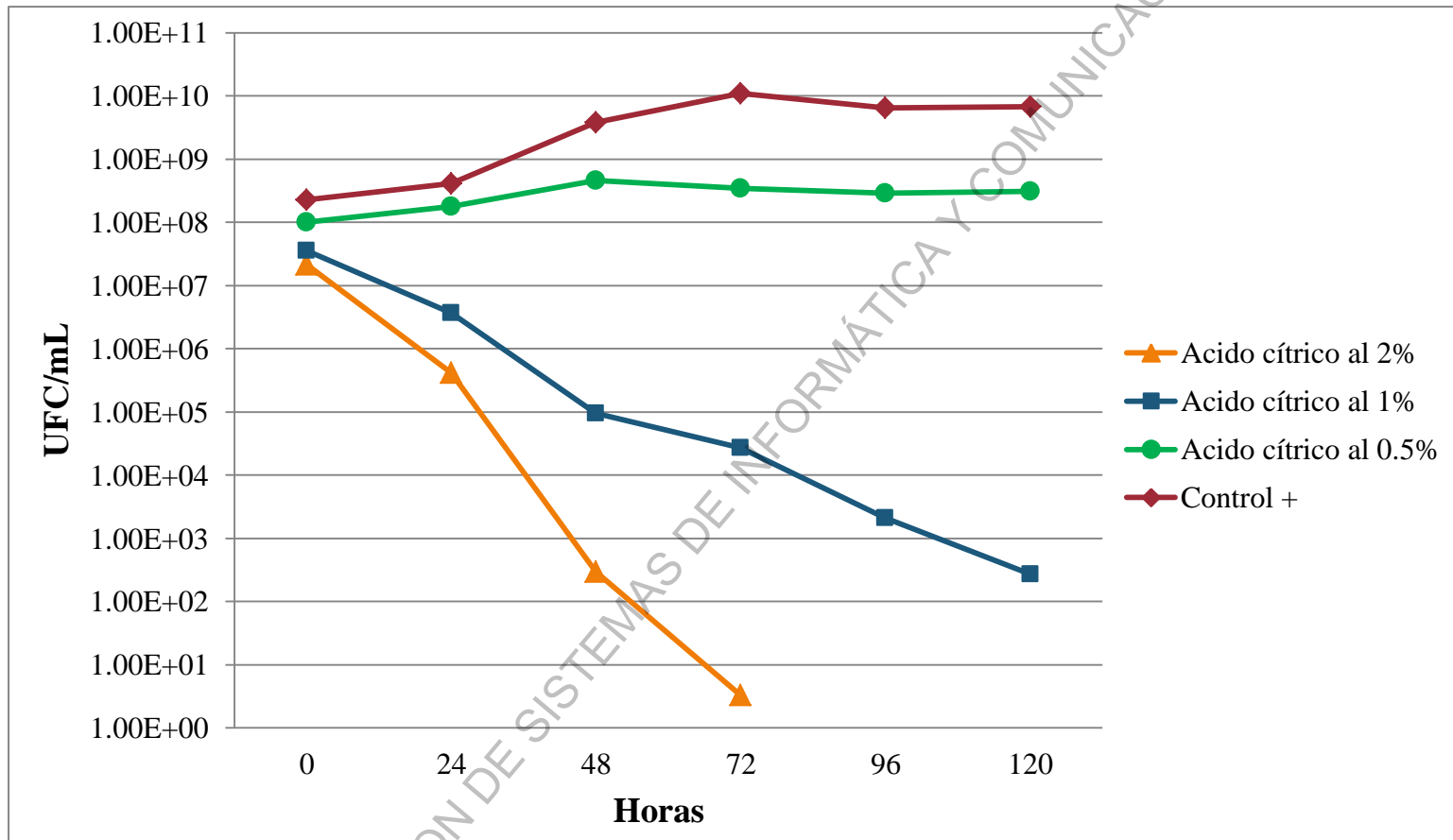


Figura 4: Comparación de la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa, suplementado con ácido cítrico al 2%, 1%, 0.5% y sin ácido cítrico (control +) durante 120 horas de evaluación.

DISCUSIÓN

Uno de los factores que influye en el crecimiento de los microorganismos en los alimentos es el pH. En general las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 6.5 a 7.5), pero sin embargo son capaces de tolerar un rango de pH entre 4 y 9⁵. Por lo tanto una manera efectiva de limitar el crecimiento de los microorganismos es incrementar la acidez del alimento, dependiendo del tipo de microorganismo, especie, tipo y concentración del ácido, tiempo de exposición y la capacidad reguladora del alimento.

El modo de acción del ácido cítrico en la inhibición del crecimiento microbiano está relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base, interfiriendo en la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es la principal causa de la inhibición y muerte de los microorganismos, ya que en el interior de la bacteria, el ácido se disocia y libera protones con lo cual afecta directamente al pH intracelular lo cual afecta gravemente al metabolismo del microorganismo⁵; además, se afecta el gradiente de protones y de carga con el exterior e interfiere de esta manera con los sistemas de transporte de aminoácidos y fosfatos; además muchas de las enzimas esenciales para el metabolismo microbiano se inactivan a pHs ácidos^{35,36}.

En la figura 01, se presenta la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en puré casero de papa en el sistema que tiene ácido cítrico comercial a una concentración

del 2% y el sistema control (+); donde en el sistema con ácido cítrico comercial al 2% parte con una población inicial de 26×10^6 UFC/mL y se reduce a una población menor a 1UFC/mL a las 72 horas de evaluación, no evidenciándose crecimiento posteriormente; este resultados indica que el ácido cítrico comercial a una concentración del 2% tiene un efecto negativo sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*; observándose una diferencia significativa muy marcada con respecto al sistema control (+), en el que se tiene una población inicial de 23×10^7 UFC/mL y transcurrido el tiempo vemos que existe un aumento de la población bacteriana hasta en dos logaritmos a las 72 horas de evaluación (11×10^9 UFC/mL), este aumento de la población se debe a que el puré tiene componentes tales como la leche, mantequilla que ayudan que *S. aureus* pueda utilizar como nutrientes y le permitan desarrollarse, y además por el hecho de no tener una sustancia que pueda afectar su crecimiento como es el caso del ácido cítrico. De esta manera, se concuerda con Ambrosiadis (2000) quien en un trabajo realizado comprobó que la adición de ácido cítrico a salchicha, disminuye el deterioro microbiológico e incluso mantiene la textura y estabilidad del color³⁷.

En la figura 02, se expresa el crecimiento de *S. aureus* a través del tiempo en puré casero de papa tanto en el sistema que contiene ácido cítrico comercial a una concentración del 1% y el sistema control (+); donde en el sistema con ácido cítrico comercial al 1% existe una disminución de la población de 5 logaritmos, que parte con una población inicial de 36×10^6 UFC/mL, y se reduce a 27×10 UFC/mL a las 120 horas de evaluación. Este resultado nos demuestra que el ácido cítrico comercial a una concentración de 1% también tiene un efecto negativo sobre la supervivencia de *S. aureus*; al igual que el sistema con ácido cítrico

comercial al 2%, se evidencia una diferencia significativa con respecto al sistema control (+). Estos resultados coinciden con Rojas y col (2008), en el que su trabajo arrojó que el ácido cítrico en una concentración de 0.75% presentó muy buenos resultados, al permitir conservar fracciones de sandía durante 12 días de almacenamiento¹⁶.

En la figura 03, se muestra el crecimiento de *S. aureus* a través del tiempo en puré casero de papa tanto el sistema que contiene ácido cítrico comercial a una concentración del 0.5% como el sistema control (+). En el sistema con ácido cítrico comercial al 0.5% se observa un ligero aumento de la población bacteriana, teniendo una población inicial de 10×10^7 UFC/mL y luego de las 120 horas se tiene una población de 31×10^7 UFC/mL; lo cual demuestra que el ácido cítrico comercial a una concentración de 0.5% no tiene escaso efecto sobre la supervivencia de *S. aureus*; por lo tanto se evidencia que no existe diferencia significativa con respecto al sistema control. Estos resultados se debe a que el ácido cítrico comercial al 0.5% no logra disminuir el pH por debajo de los valores normales y que pueda afectar la supervivencia de *S. aureus*.

En la figura 4, se muestra una comparación entre los tres sistemas problemas y el sistema control +: en el sistema con ácido cítrico comercial al 2% se puede observar que tiene un mayor efecto con respecto al sistema que tiene una concentración del 1% y en consecuencia a la concentración de 0.5%. Esto demuestra que, a mayores concentraciones de ácido cítrico se obtiene mejores resultados; es decir tendrá mayor efecto sobre la supervivencia de *S. aureus*; y una

de las grandes ventajas de utilizar ácido cítrico como conservantes, es que este ácido no suele regularse las concentraciones máximas permitidas en los alimentos.

El sistema que no tiene agregado suspensión de *S. aureus* ni ácido cítrico (control-), se usó como un control negativo (ANEXO 05), no encontrándose crecimiento alguno de microorganismos durante las 120 horas de evaluación en Agar Cuenta Gérmenes (PCA). Estos resultados demuestran que el puré de papa usado, probablemente no se contaminó con microorganismos propias de la materia prima usada (papa, mantequilla, leche) o producto de la manipulación durante el proceso de evaluación, y que pueda afectar el recuento; lo que nos demuestra que la pasteurización previa que se realizó (80 °C por una hora) fue muy importante para poder eliminar algunos posibles microorganismos presentes en el puré por las causas ya mencionadas.

La sal común (NaCl), es también considerado como un antimicrobiano que permite inhibir el crecimiento de muchos microorganismos, por ello su uso ha sido de gran importancia en la conservación de muchos alimentos desde hace muchos años². Pero existen microorganismos llamados halófilos que tienen la capacidad de tolerar concentraciones elevadas de cloruro de sodio (NaCl), tal es el caso de *S. aureus* que puede tolerar concentraciones de hasta 15% de NaCl³⁸. Por ello la adición de sal común al puré usado en este trabajo no afecta el desarrollo de *S. aureus*, solamente sirvió como un saborizante.

Para que una sustancia pueda ser considerada como un buen conservante, debe cumplir una serie de características, tales como, ser capaz de eliminar los microorganismos presentes en el alimento más que inhibirlos, permanecer en el

alimento hasta el momento del consumo, tolerar los tratamientos aplicados al alimento, no provocar la aparición de cepas resistentes, carecer de toxicidad y que su aplicación sea económicamente factible³; es así que el ácido cítrico tiene todas estas características que le permiten tener un elevado uso en las industrias alimentarias, además la incorporación de ácido cítrico en los alimentos tiene diversas funciones dependiendo de su aplicación particular, tales como poder acidulante, regulador del pH, emulsificante, y efectos organolépticos.

Queda demostrado entonces que el ácido cítrico a las concentraciones de 2% y 1% tiene gran efecto sobre la supervivencia de *S. aureus*; por lo consiguiente sería recomendable su uso como conservante, sobre todo en productos alimenticios que requieren la manipulación durante su elaboración o tratamiento, tal es el caso de los purés preparados en casa que pueden ser contaminados con microorganismos patógenos; sabiendo que este alimento es consumido generalmente por niños o ancianos y que puede ser afectada considerablemente su salud, debido a que sus defensas inmunológicas de estas personas están bajas; teniendo en cuenta que *S. aureus* es un microorganismo oportunista.

CONCLUSIONES

- El ácido cítrico a una concentración del 2% tiene mayor efecto que la concentración del 1% de ácido cítrico sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa.
- El ácido cítrico a una concentración del 0.5% no tiene efecto sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré casero de papa.

DIRECCION DE SISTEMAS DE INFORMÁTICA Y COMUNICACIÓN

RECOMENDACIONES

- Es muy importante trabajar dentro de una cámara de flujo laminar para evitar el uso de varios mecheros que puedan ser un peligro para el manipulador.
- Tener en cuenta en todo momento la Bioseguridad, para evitar contaminaciones con bacterias patógenas como es el caso de *S. aureus*.
- El uso de guantes es importante para evitar la contaminación del puré al momento de su preparación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González J, Calvo A. Despertar de la era antibiótica. Revista Española Quimioterapia. 2005. 18(3): 247-251.
2. Davidson PM, Zivanovic S. The use of natural antimicrobials. En: Food Preservation Techniques. Zeuthen P, L Bogh-Sorensen. (Ed.). Washington, D.C., USA. 2003. Chap. 2: 5-29.
3. Davidson PM. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: Food Microbiology: Fundamentals and frontiers, 2nd Ed. Doyle MP, LR Beuchat, TJ Montville (Eds.). ASM Press, Washington, D.C., USA. 2001. Chap. 29: 593-627.
4. Industria Alimentaria. El control de patógenos en los alimentos. Repaso a fondo de las últimas técnicas para combatir bacterias, hongos y otros microorganismos. 2006.
5. Doores S. Organic acids. En: Antimicrobials in Foods, 2 Ed. Davidson PM, AL Branen. (Ed.). Marcel Dekker, inc. New York, USA. 1993. Chap. 4:95-135.

6. Alderete J.M. Alimentos Argentinos. "Ácido Cítrico, el ingrediente que nos falta." 2008. En línea, [<http://www.alimentosargentinos.gov.ar>], consultado en 2011-09-05.
7. Kristiansen B; Matthey M; Linden J. Citric Acid Biotechnology. Theilor and Francis. Philadelphia. 1999. Pg. 187.
8. Chirife J, Favetto GJ. Somephysico-chemicals basis of food preservation by combined methods. Food Research International 1992; 25(5):389-396.
9. Santerre CR, Cash. JN y Vannorman DJ. Ascorbic acid/ citric acid combinations in the processing of frozen apple slices.J. Food. 1988. Sci. 53: 1713-1717.
10. Kato NH, Watada AE. Citric acid reduces the respiration of fresh-cut carrots. Hort Science. 1997. 32: 136-145.
11. López C. *et al.* Producción de Acido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. . (2006). *Dyna*, 150: 9-57.
12. Calderón Castillo AM. Efecto del vinagre y ácido cítrico en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* en mayonesa cacera. Tesis. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo- Perú. 2008.

13. Dorko C. Antioxidants used in foods. *Food Techn.* . 1994. 48 (4): 33-34.
14. Dennis, DT. Coultate TP. Phosphofructokinase a regulatory enzyme in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1966. 25: 187-191.
15. Kennedy RA, Rumpho ME, Fox TC. Anaerobics metabolism in plants. *Plant Physiol* 1992. 100: 1-6.
16. Rojas Ávila MR., Vargas y Vargas L., Tamayo Cortez JA. Sandia mínimamente procesada conservada en atmósferas modificadas. *Rev. Iberoamericana de tecnología Postcosecha.* 2008. 9(2). Pg. 153-161.
17. Moreno-Álvarez MJ, Pinto MG, García Pantaleón y Belén-Camacho DR. Efecto del ácido cítrico sobre la madurez del tomate de árbol. *Rev. Fac. Agron. (LUZ). Carabobo. Venezuela.* 2007. Vol. 24: 321-342.
18. Brooks G, Butel J and Ornston L. *Medical Microbiology of Jawetz, Melnick and Adelberg.* 24th Ed. New York: McGraw-Hill. 2007.
19. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G y Pfaller M. *Microbiología médica.* 4^{ta} ed. Madrid: Elsevier. 2002.
20. Rippon J. *Microbiología Médica.* 3^{ra}. ed. México: Interamericana. 1990.

21. Bustos J, MuHamdan A, y Gutiérrez M. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev. Biomed. 2006; 17: 287-305.
22. Internacional Comission on Microbiological Spefications for Foods. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. 2000. Vol.1.
23. Torres Vileta MR. Agentes patógenos transmitidos por los alimentos. Universidad de Guadalajara. México. 2002. Vol.1.
24. Meter S, Willams y Wilkins. editor. Bergey's Manual of Systematic bacterioriology. New York 1986. Vol. 2. Pags. 1013-1019,1141-1182.
25. Ingrid LP, Pilar M. Determinación y aislamiento de *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens* enterotoxigénicos a partir de alimentos. Rev. Col. Cienc. Quim. Farm. 2004. 33(1), 59-60.
26. Torres Vileta MR, Castillo Ayala A. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Universidad de Guadalajara. México. 2002. Vol.2.
27. Frazier WC, Westhoff. Microbiología de los alimentos. 4ta. ed. Edit. Acribia. Zaragoza. España. 1993.

28. James MJ. Microbiología moderna de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. 1973. Pags. 190-206, 210-214.
29. John TN, Anthony JS. Microbiología de los Alimentos y sus Procesos de Elaboración. Ed. Acribia Zaragoza 2000. Pg. 206-209.
30. Mendoza CN, *et al.* Infección hospitalaria por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Revista chilena de infectología. 2000. 17(2). Pg: 129-134.
31. Ledermann W. Controversias terapéuticas: Portación de *Staphylococcus aureus*. *Rev Chil Infect.* 1996. 13: 81-4.
32. Kluytmans J, Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997. 10: 505-20.
33. Martínez MJ, Hernández M. Alimentación durante el primer año de vida. En Hernández M. *Alimentación infantil*. Madrid. 1993 pg. 43-53.
34. Fano H, Carmona G, Ordinola M y Scott G. Experiencias de exportación de la papa amarilla peruana. CIP. Lima-Perú. 1998.

35. Adams M., Moss M. microbiología de los alimentos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza. España. 1997.
36. Abee, T., and Wourters, JA. Microbial stress response in minimal processing. Int. J. Food Microbiol. 1999. 50: 65-91.
37. Ambrosiadis I. The effect of encapsulated citric acid on the quality attributes of bologna type sausage. Department of food hygiene and technology, veterinary faculty of Aristotelian university of Thessaloniki. 2000.
38. Tibavisco D, Rodríguez Silva E. *et al.* Enfoque terapéutico de la bacteriemia de *Staphylococcus aureus*. Biomédica. 2007; 27(2): 294-307.
39. FAO/OMS. Evaluación de la toxicidad de diversos antimicrobianos y antioxidantes. Sexto informe. Ginebra- Italia. 1962.

ANEXOS

DIRECCION DE SISTEMAS DE INFORMÁTICA Y COMUNICACIÓN

ANEXO 01

Agar Baird Parker (ABP)

Fórmula (gramos por litro)

Peptona de caseína.....	10.0
Extracto de carne.....	5.0
Extracto de levadura.....	1.0
Piruvato de sodio.....	10.0
Glicina.....	12.0
Cloruro de litio.....	5.0
Agar- Agar.....	15.0

Disolver 60 g en 1 litro de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45 °C y añadir 50 mL/litro de emulsión de yema de huevo-telurito y añadir en placas de petri estériles.

Fundamento

Se trata de una base a la que se debe añadir emulsión de yema de huevo y telurito de potasio. También se puede añadir Sulfametacina para inhibir el crecimiento de *Proteus*. Por la presencia de cloruro de litio y el telurito de potasio se inhibe el crecimiento de microorganismos no deseados. Por la presencia del piruvato de sodio y la glicina se favorece el crecimiento de los estafilococos. A su vez el telurito de potasio combinado con la acción de la yema de huevo permite diferenciar los estafilococos. El *S. aureus* da colonias negras, por la reducción del telurito de potasio a teluro, rodeadas de un halo de transparencia debido a la actividad lecitinasa.

ANEXO 02

Agar nutritivo (AN)

Fórmula (gramos por litro)

Extracto de carne.....	3.0
Peptona de gelatina.....	5.0
Agar-Agar.....	15.0

pH final: 6.8 ± 0.2

Suspender 23g en un litro de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y disolución total y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Fundamento

Se trata de un medio muy simple que contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo de la mayor parte de microorganismos no exigentes. La peptona actúa como fuente de nitrógeno para el crecimiento celular y la glucosa como fuente para el metabolismo celular.

ANEXO 03

Agar Plate Count (PCA)

Fórmula (gramos por litro)

Extracto de levadura.....	2.5
Peptona de caseína.....	1.0
D(+)-Glucosa.....	5.0
Agar-Agar.....	15.0

pH final: 7.0 ± 0.2

Suspender 23.5g en un litro de agua destilada; calentar y agitar hasta disolución total. Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.

Fundamento

La composición del medio basada en la peptona de caseína como aportación nutritiva, el extracto de levadura como sustrato vitamínico y la glucosa como fuente de energética, favorece el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, sin precisar de otros aditivos.

ANEXO 04

TABLA N° 1. Número de diluciones en los diferentes periodos de tiempo y diferentes concentraciones.

	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Ac. Cit. (2%)	$10^{-5} 10^{-6}$	$10^{-2} 10^{-3}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$
Ac. Cit. (1%)	$10^{-5} 10^{-6}$	$10^{-4} 10^{-5}$	$10^{-3} 10^{-4}$	$10^{-3} 10^{-4}$	$10^{-2} 10^{-3}$	$10^{-2} 10^{-3}$
Ac. Cit. (0.5%)	$10^{-5} 10^{-6}$	$10^{-5} 10^{-6}$	$10^{-6} 10^{-7}$	$10^{-6} 10^{-7}$	$10^{-6} 10^{-7}$	$10^{-6} 10^{-7}$
Control (+)	$10^{-6} 10^{-7}$	$10^{-6} 10^{-7}$	$10^{-7} 10^{-8}$	$10^{-7} 10^{-8}$	$10^{-7} 10^{-8}$	$10^{-7} 10^{-8}$
Control (-)	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$

ANEXO 05

TABLA 2. Promedios finales de crecimiento (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* inoculado en puré de papa durante 120 horas de evaluación.

EXPERIMENTOS	TIEMPO					
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Acido cítrico 2%	26×10^6	58×10^4	30×10	0	0	0
Acido cítrico 1%	36×10^6	37×10^5	95×10^3	17×10^3	21×10^2	28×10
Acido cítrico 0.5%	10×10^7	18×10^7	46×10^7	37×10^7	29×10^7	31×10^7
Control (+)	23×10^7	41×10^7	38×10^8	11×10^9	65×10^8	68×10^8
Control (-)	0	0	0	0	0	0

ANEXO 06

TABLA N° 3: **Diferencia significativa entre las medias, mediante Análisis de Varianza (ANOVA) del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, prueba de los efectos inter-grupos ($p < 0.05$).**

Variable dependiente: Crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	212949849832 14390000.000	3	709832832773 8130000.000	4.811	.011
Intra-grupos	295079514891 12810000.000	20	147539757445 5640000.000		
Total	508029364723 27200000.000	23			

$P < 0.05$ significativa

$p > 0.05$ no significativa

Esta prueba se realizó para determinar si existe diferencia significativa entre las medias; obteniendo como resultado que existe una diferencia significativa entre los promedios de las concentraciones de ácido cítrico comercial para *Staphylococcus aureus*.

ANEXO 07

TABLA N° 3: Comparaciones mediante la Prueba de Duncan del análisis de las diferentes concentraciones de ácido cítrico comercial con respecto al control (+).

Variable dependiente: Crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

(I) TTO	(J) TTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
Control (+)	Ac. Cit. 2%	2.230E+009	7.013E+008	.005 (*)	7.67E+008	3.69E+009
	Ac. Cit. 1%	2.230E+009	7.013E+008	.005 (*)	7.67E+008	3.69E+009
	Ac. Cit. 0.5%	2.045E+009	7.013E+008	.061	5.82E+008	3.51E+009

(*) La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Se puede observar, mediante la Prueba de Duncan que en los experimentos 2% y 1% de ácido cítrico existe diferencia significativa comparada con el experimento control (+); en cambio en el experimento 0.5% de ácido cítrico no existe diferencia significativa.

ANEXO 08

TABLA N° 4: Comparaciones mediante la Prueba de Tukey del análisis de las diferentes concentraciones de ácido cítrico comercial con respecto al control (+).

Variable dependiente: crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

(I) TTO	(J) TTO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
Control (+)	Ac. Cit. 2%	2.230E+009	7.013E+008	.022 (*)	2.67E+008	4.19E+009
	Ac. Cit. 1%	2.230E+009	7.013E+008	.022 (*)	2.67E+008	4.19E+009
	Ac. Cit. 0.5%	2.045E+009	7.013E+008	.073	8.25E+007	4.01E+009

(*) La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Se puede observar, mediante la Prueba de Tukey que en los experimentos con 2% y 1% de ácido cítrico existe diferencia significativa comparada con el experimento control (+); en cambio en el experimento con 0.5% de ácido cítrico no existe diferencia significativa.

ANEXO 09



FIGURA: Unidades experimentales de cada uno de los cinco experimentos realizados.

ANEXO 10



FIGURA: Colonias de *Staphylococcus aureus*, sembrado en Agar Baird Parker después de 48 horas a 37 °C.