

Trabajo Práctico de Grado

Carrera: Ingeniería en Alimentos

Año 2013

“Inhibición de microorganismos patógenos mediante el empleo de vitaminas”

Diego Castro

C.I.: 3.891.713-6

Instituciones:

Universidad de la República

Laboratorio Tecnológico del Uruguay

Docente responsable: Dra. Patricia Lema (UdelaR)

Tutor: MSc. I.A. Paula Mussio (LATU)

Índice

	Página
1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Marco Teórico	5
3.1 Vitamina D3	5
3.2 Vitamina B3	5
3.3 Microorganismos alterantes	8
3.4 Microorganismos patógenos	8
3.5 Estudio cinético	10
4. Materiales y Métodos	10
4.1 Cepas utilizadas	10
4.2 Materiales y equipos	11
4.3 Medios de cultivo	12
4.4 Metodología de trabajo	12
5. Resultados	13
5.1 Resultados con vitamina D3	13
5.2 Resultados con vitamina B3	13
6. Discusión	26
7. Bibliografía	27

1. Resumen

El objetivo del presente trabajo experimental fue el estudio del comportamiento de distintas cepas de microorganismos al ser sometidas a condiciones de crecimiento en presencia de vitaminas, con la finalidad de observar desviaciones con respecto al crecimiento normal.

Fueron utilizados microorganismos de referencia de la colección de cepas del Dpto. de Microbiología del LATU y las vitaminas fueron suministradas por la Empresa L&G S.A. Los microorganismos utilizados fueron *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*, y se estudió su crecimiento en presencia de vitamina D3 y B3.

Se estudiaron variaciones en los parámetros cinéticos, en especial la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) para cada condición de ensayo. Cada experimento se realizó por triplicado y se sometieron los datos obtenidos a un tratamiento estadístico con la finalidad de mantener tanto los resultados como la metodología utilizada en un rango de control aceptable.

Los datos obtenidos muestran resultados alentadores, sobre todo en el caso de la Vitamina B3 que demostró ser efectiva en la inhibición bacteriana, afectando drásticamente los parámetros cinéticos estudiados.

2. Introducción

Los alimentos pueden ser degradados por oxidaciones químicas y microbiológicas produciendo alteraciones nutricionales y organolépticas que ocasionan pérdidas en la calidad parcial o total del producto. Las alteraciones nutricionales se deben principalmente a la oxidación de lípidos, proteínas y vitaminas, las cuales son causadas por especies reactivas de oxígeno. Las degradaciones por microorganismos causan deterioro de los alimentos, acortando su vida útil, además de pérdidas nutricionales y generación de compuestos no deseados repercutiendo en la calidad organoléptica. Asimismo, resulta especialmente riesgoso para la salud el desarrollo de microorganismos patógenos constituyendo en tal caso una pérdida en la inocuidad del alimento.

El desarrollo de sustancias que pueden cumplir funciones beneficiosas en los alimentos, en lo que refiere al control del crecimiento microbiano, representa un interesante desafío para la ciencia y la industria de alimentos, pero hay cierta controversia respecto de si causan daño a la salud, a lo que se suma una tendencia a preferir alimentos naturales con el mínimo proceso posible. En el desarrollo de nuevos “conservantes naturales” para su uso en la industria alimentaria existen principalmente dos tipos de problemas: el número limitado de microorganismos sensibles a agentes particulares y la alta concentración de algunos agentes que se requiere para inhibir el crecimiento de los mismos, así como también el costo asociado a su implementación.

El uso de vitaminas permite aumentar las propiedades benéficas y nutricionales de los alimentos proporcionando un potencial alternativo a los conservantes convencionales, actuando como agentes antibacterianos y antifúngicos.

En el presente trabajo se pretende estudiar la influencia de diversas vitaminas sobre la inhibición de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos como un medio alternativo y natural para la conservación de los mismos.

3. Marco Teórico

Las vitaminas participan en la formación de hormonas, células sanguíneas, sustancias químicas del sistema nervioso y material genético. Las diversas vitaminas no están relacionadas químicamente, y la mayoría de ellas tiene una acción fisiológica distinta. Por lo general actúan como catalizadores, combinándose con las proteínas para crear metabólicamente enzimas activas que a su vez producen importantes reacciones químicas en todo el cuerpo. Sin las vitaminas muchas de estas reacciones tardarían más en producirse o cesarían por completo.

Como es sabido, las vitaminas deben ser aportadas en forma externa a través de la alimentación, ya que, a excepción de la vitamina D, no pueden ser sintetizadas por el cuerpo humano.

Si bien existen algunos trabajos científicos que evidencian el efecto antimicrobiano de ciertas vitaminas, o bien como precursoras de sustancias que podrían actuar en el control del crecimiento bacteriano, no se cuenta con una cantidad suficiente de información sobre el tema (10)(11).

La actividad antimicrobiana de algunos análogos de vitaminas sintéticas fue descrita hace algunos años. En particular derivados sintéticos de la vitamina K, como la vitamina K5 evidencian un uso potencial como agente antimicrobiano (5).

Teniendo en cuenta dicha capacidad potencial de las vitaminas de comportarse como agentes antimicrobianos, y con el entusiasmo de poder describir y confirmar dicha actividad en otros derivados vitamínicos, no descritos en la bibliografía científica, se decide plantear una estrategia de trabajo para llevarlo a cabo.

En el presente trabajo se estudia el comportamiento cinético de diversos microorganismos al ser sometidos a condiciones de crecimiento controladas, en presencia de concentraciones conocidas de vitaminas. Las vitaminas en estudio son la vitamina D3 (Colecalciferol), y la vitamina B3 (Niacina). A continuación se describen brevemente las características de dichos compuestos:

3.1 Vitamina D3

La vitamina D es un heterolípido perteneciente al grupo de los esteroides, por lo que presenta naturaleza lipofílica. Ésta representa un papel importante en el mantenimiento de órganos y sistemas a través de múltiples funciones, principalmente en la regulación de los niveles de calcio y fósforo en sangre, promoviendo la absorción intestinal de los mismos a partir de los alimentos y la reabsorción de calcio a nivel renal. Con esto contribuye a la formación y mineralización ósea, siendo esencial para el desarrollo óseo.

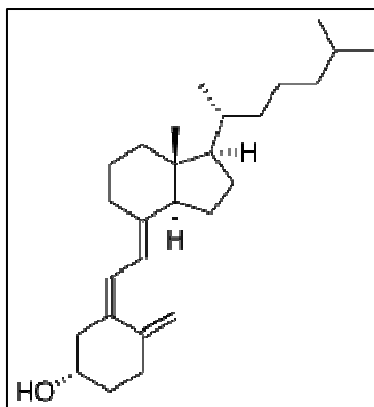


Fig. 1. Estructura química del Colecalciferol (Vitamina D3).

Existen dos formas de esta vitamina: la vitamina D2, también llamada ergocalciferol, que se deriva del colesterol en la dieta (de fuentes vegetales) mientras que la vitamina D3 o colecalciferol (Ver **Fig. 1**) se deriva de fuentes animales. Los rayos ultravioleta de la luz solar son los responsables de la producción de una gran cantidad de la vitamina D3 en el cuerpo. Sin embargo, puede ser muy difícil obtener suficiente vitamina D de fuentes alimentarias, por lo que muchos alimentos son enriquecidos con esta vitamina para satisfacer los requerimientos nutricionales de niños y adultos de edad avanzada.

A continuación se listan algunos alimentos donde se encuentra naturalmente la vitamina D3:

- Productos lácteos: queso, manteca, crema de leche
- Pescado (atún y salmón)
- Ostras
- Cereales

Las importantes funciones benéficas a nivel fisiológico de la vitamina D3 motivaron su uso en el presente trabajo para estudiar su actividad antibacteriana, dado su creciente utilización como aditivo alimentario.

3.2 Vitamina B3

La vitamina B3 (Niacina o ácido nicotínico) es un tipo de vitamina que se ha descubierto a mediados del siglo XIX. Es una vitamina hidrosoluble y actúa en el metabolismo celular como grupo prostético de coenzimas o precursora de ellas. También incluye a la correspondiente amida, denominada Nicotinamida (Ver **Fig. 2**)

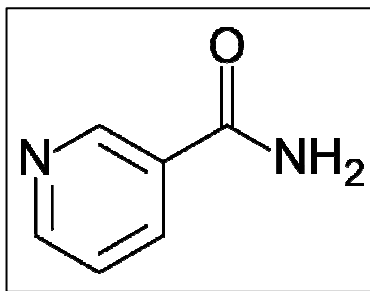


Fig.2. Estructura química de la Nicotinamida (Vitamina B3).

Sus derivados, NADH, NAD⁺, NADPH y NADP⁺, son esenciales en el metabolismo energético de la célula y en la reparación del ADN. Dentro de las funciones de la Niacina se incluyen la eliminación de químicos tóxicos del cuerpo y la participación en la producción de hormonas esteroideas sintetizadas por la glándula adrenal, como son las hormonas sexuales y las hormonas relacionadas con el estrés.

Un factor importante que motivó su uso en el presente trabajo es el amplio espectro de alimentos en los que se encuentra, con lo que al presentar algún tipo de actividad, puede potenciar o actuar como otra barrera al crecimiento bacteriano.

A continuación se listan algunos alimentos donde se encuentra naturalmente la vitamina B3:

- Hígado
- Carnes (ternera, cerdo, pollo, cordero)
- Pescado (salmón, sardina, atún)
- Leche y sus derivados
- Levadura de cerveza
- Cereales integrales
- Derivados de cereales integrales (harina de trigo, harina de maíz, pan integral)
- Semillas
- Frutos secos
- Frutas, verduras, legumbres y setas.

Otro factor importante a tener en cuenta es que al observar su estructura química se identifican grupos potencialmente tóxicos, los que podrían llegar a afectar el metabolismo bacteriano al punto de inhibir su crecimiento, o bien someter al microorganismo a condiciones estresantes en su fase de crecimiento.

3.3 Microorganismos alterantes más frecuentes

Generalmente, cuando se habla de calidad de un alimento, se debe considerar el aspecto microbiológico que resulta fundamental, porque influye en la conservación y la vida útil del producto, pero además porque los microorganismos pueden ser causantes de enfermedades. A continuación se mencionan algunos microorganismos alterantes más frecuentes encontrados en alimentos:

- *Erwinia carotovora*
- *Pseudomona cepacia*
- *Bacillus subtilis*
- *Clostridium puniceum*
- *Peudomonas syringae*
- *Streptomyces scabiae*
- Por su parte los hongos también pueden causar deterioro, como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Alternaria*

3.4 Microorganismos patógenos más frecuentes

Sólo una pequeña parte de las miles de especies de bacterias causan enfermedades humanas conocidas. Las infecciones bacterianas se evitan destruyendo las bacterias con calor, como se hace en las técnicas de esterilización y pasteurización. Cuando se producen, las enfermedades bacterianas se tratan con antibióticos. Pero el abuso de estos compuestos en los últimos años ha favorecido el desarrollo de cepas de bacterias resistentes a su acción.

A continuación se mencionan algunos microorganismos patógenos encontrados en alimentos:

- *Salmonella*
- *Shigella sp.*
- *Vibrio parahaemolyticus*
- *Campylobacter spp.*
- *Bacillus cereus*
- *Clostridium perfringens*
- *Clostridium botulinum*

A continuación se describen algunas propiedades de las cepas de microorganismos patógenos utilizados en el presente trabajo experimental:

- *Escherichia coli*: bacterias bacilos cortos, Gram negativas. Pertenece a las Enterobacteráceas lactosa-positivas, se encuentra en el tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, produce gas a una temperatura de 44 a 44,5 ± 0,2°C
- *Staphylococcus aureus*: son cocos Gram positivos, catalasa positivos que necesitan una fuente de nitrógeno orgánico para poder crecer. Su importancia radica en que algunas cepas son capaces de producir una toxina termoestable la cual causa enfermedad en el hombre. Entre los alimentos implicados en la enfermedad se encuentran carne y derivados, aves, huevo, ensaladas, leche y productos lácteos, productos horneados con relleno, y en especial aquellos alimentos que requieren mucha manipulación durante su preparación y que necesitan mantenerse por largos periodos de tiempo a altas temperaturas después de su cocinado.
- *Listeria monocytogenes*: son bacilos cortos Gram positivos y catalasa positivos. Es muy resistente y puede sobrevivir perfectamente a los efectos del congelamiento, desecación y calentamiento. Los desordenes causados por esta bacteria se conocen como listeriosis, cuyas manifestaciones incluye meningitis, encefalitis, con síntomas caracterizados por fiebre, náuseas, vomito, diarrea.

Las mismas fueron elegidas teniendo en cuenta su prevalencia en alimentos y la peligrosidad que dicha presencia representa para la salud (Ver **Tabla 1**).

Microorganismo	Referencia internacional	Tinción de Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram (+)
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram (-)
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	Gram (+)

Tabla 1. Microorganismos empleados para la evaluación *in vitro* de las vitaminas mencionadas

Nota: ATCC American Type Culture Collection (USA)

Se utilizaron bacterias Gram positivas y Gram negativas con el propósito de observar variaciones en el crecimiento en presencia de vitaminas, teniendo en cuenta la composición de la membrana celular.

3.5 Estudio cinético

El estudio cuantitativo de la cinética microbiana requiere contar con métodos confiables y sencillos para medir el crecimiento de poblaciones. En términos de concentraciones se puede expresar la velocidad específica de crecimiento como

$$\mu = \frac{dX}{X dt} \quad (1)$$

Donde X corresponde a la medida del crecimiento bacteriano, en éste caso expresado como UFC/mL.

El período durante el cual el crecimiento tiene lugar con μ constante se denomina fase exponencial o logarítmica, según se describa el crecimiento en base a X o al $\ln X$. Si μ es constante, a partir de la ecuación (1) tenemos:

$$\mu t = \ln \frac{X}{X_0} \quad (2)$$

La pendiente de la curva $\ln X$ vs t es μ .

Por otro lado se denomina tiempo de duplicación (t_d) el intervalo de tiempo que insume duplicar la biomasa. A partir de la ecuación (2) con $X = 2X_0$ y $t = t_d$ tenemos:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3)$$

En el presente trabajo se determina μ y t_d para cada uno de los microorganismos mencionados en la **Tabla 1**, en ausencia y en presencia de vitaminas.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cepas utilizadas

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo (Tabla 1) fueron obtenidas de la colección de cepas del Departamento de Microbiología del LATU. Fueron mantenidas a -80°C hasta el momento de su uso. Posteriormente se pasaron 0,5 mL de la suspensión del microorganismo al caldo BHI y se las mantuvo un máximo de 10 minutos a temperatura ambiente (ésta etapa se realiza para desestresar al microorganismo). Luego se transfirió una ansada a un tubo inclinado (slant) de TSA enriquecido con extracto de levadura y se incubó a $35,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas. Luego de esta etapa se mantiene la cepa a $4,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

4.2 Materiales y Equipos

Como se mencionó anteriormente las vitaminas fueron suministradas por L&G S.A. y cuentan con certificado de pureza química y microbiológica. De todas formas se realizan monitoreos constantemente para evaluar alguna posible contaminación microbiana de las mismas.

A continuación se listan los materiales y sustancias utilizadas:

- ✓ Vitamina D3
- ✓ Vitamina B3
- ✓ Pipetas automáticas de 100 μ L y 1,0 mL.
- ✓ Tips plásticos
- ✓ Pipetas graduadas de vidrio.
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Frascos de dilución de 200mL y 500 mL
- ✓ Estufa de incubación a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Marca: Memmert, modelo: BVW80)
- ✓ Estufa de incubación a $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Marca: Memmert, modelo: BVW80)
- ✓ Autoclave (Marca: Hogner, modelo: VAP5001 Pharma 551 VL/SP)
- ✓ Balanza (Marca: Precisa, modelo: XT4200C-FR)
- ✓ Cabina de flujo laminar (Marca: The Baker Company INC., modelo: B40-112).
- ✓ Medidor de pH (Marca: Metter-Toledo, modelo: CH8306).
- ✓ Autoclave de descontaminación (Marca: Consolidated, modelo: 271)
- ✓ Equipo para análisis automatizado con el sistema TEMPO^R (Marca: Biomerieux-Tempo, modelos: Tempo Reader y Tempo Filler) y Reactivo Total Viable Count (TVC^R).
- ✓ Termoshaker (Marca: Biosan, modelo: TS-100).

4.3 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivos utilizados fueron preparados un máximo de cinco días previos al ensayo, siguiendo las instrucciones que brinda el fabricante.

Se realizaron controles positivos y negativos de los mismos con cepas de referencia, así como también se controlaron sus valores de pH. Se conservaron a $4,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización. Los medios a base de agar fueron fundidos a 100°C y luego termostatzados a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para ser utilizados.

En la **Tabla 2** se detallan los medios utilizados:

Medio	Composición	Fabricante
Plate Count Agar (PCA)	Triptona 5g/L; Extracto levadura 2,5g/L; Glucosa 1g/L; Agar 9g/L; pH $7,0 \pm 0,2$	Oxoid
Nutrient Broth (NB)	Extracto de carne refinado 1g/L; Peptona 5g/L; Extracto de levadura 2g/L; NaCl 5g/L; pH $7,4 \pm 0,2$	Oxoid
Tryptic Soy Broth (TSB)	Digesto pancreático de caseína 17g/L; Digesto enzimático de soja 3g/L; NaCl 5g/L; Fosfato de hidrógeno dibásico 2,5g/L; Glucosa 2,5g/L; pH $7,3 \pm 0,2$	Oxoid
Brain Heart Infusion (BHI)	Infusión de sesos de ternera 7,7g/L; Corazón de res 9,8g/L; Proteasa peptona 10g/L; Dextrosa 2g/L; NaCl 5g/L; Fosfato disódico 2,5 g/L; pH $7,4 \pm 0,2$	Difco
Tryptic Soy Agar (TSA)	Digesto pancreático de caseína 15g/L; Digesto papaico de soja 5g/L; NaCl 5g/L; Agar 15g/L; Extracto de levadura 6g/L; pH $7,3 \pm 0,2$	Difco

Tabla 2. Medios de cultivo líquidos y sólidos utilizados.

4.4 Metodología de trabajo

A partir del slant de la cepa en estudio se transfiere una ansada a 10 mL de caldo Nutrient Broth (Oxoid) y se incuba el mismo en un termoshaker a 37°C y a 100 rpm, durante 16 horas. Luego de ser sometido a éstas condiciones de incubación se estima que el número de microorganismos presentes asciende hasta un promedio de 1×10^9 UFC/mL.

Luego de la incubación se realizan diluciones sucesivas con la finalidad de obtener una concentración inicial de inóculo de aproximadamente 1×10^2 UFC/mL. Dichas diluciones se realizan en agua fosfatada (0.125%), para evitar variaciones en la

presión osmótica de las células. El último paso de las diluciones se realiza en el medio de cultivo líquido en el cual el microorganismo va a crecer (TSB o BHI), previamente termostatzado a 37°C. La adición de las vitaminas se realiza antes de la inoculación del microorganismo.

Inmediatamente se incuba en un baño de agua a $37,0 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ a 80-90 rpm y adecuada aireación y se extraen muestras a intervalos establecidos de tiempo.

Para el recuento se siembran diluciones adecuadas que permitan obtener entre 30 y 300 colonias por placa. El medio utilizado para el recuento es Plate Count Agar (Oxoid), el mismo se termostatiza a 45°C previo a su uso. Las placas se incuban invertidas a $35,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 horas.

Cada ensayo se realiza por triplicado, las condiciones de trabajo son idénticas y lo único que varía es la concentración de vitamina utilizada.

5. Resultados

El cálculo de los Intervalos de Confianza (IC) se detalla en el **APÉNDICE – Cálculos de Incertidumbre**, sin embargo, para representar el error en los gráficos, se toma el valor conservador de **$\log (\text{UFC/mL}) \pm 0,2$** , ya que éste es el valor calculado y utilizado en el Dpto. de Microbiología del LATU, el cual tiene en cuenta todos los errores sistemáticos y aleatorios relacionados con la metodología de recuento utilizada, la cual es avalada por el organismo acreditador. La misma es calculada según bibliografía (7).

5.1 Resultados obtenidos utilizando vitamina D3 como aditivo

Se estudió el efecto de la vitamina a concentraciones de 0,5, 1,0 y 5,0 g/L. En un caso en particular se realizó un ensayo con una concentración de 50,0 g/L, pero solamente para evaluar su actividad a altas concentraciones.

En los **Gráficos 1, 2 y 3** se presentan las curvas de crecimiento obtenidas para *Escherichia coli*:

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina D3 – 0,5 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	2,063 ± 0,021	1,964 ± 0,019
0,5	2,165 ± 0,021	1,984 ± 0,004
1	2,362 ± 0,005	2,059 ± 0,023
1,5	2,395 ± 0,013	2,315 ± 0,046
2	2,576 ± 0,024	2,771 ± 0,036
3	3,702 ± 0,056	3,637 ± 0,061
4	4,929 ± 0,041	4,716 ± 0,064
5	5,265 ± 0,019	5,150 ± 0,043
6	5,543 ± 0,013	5,503 ± 0,018

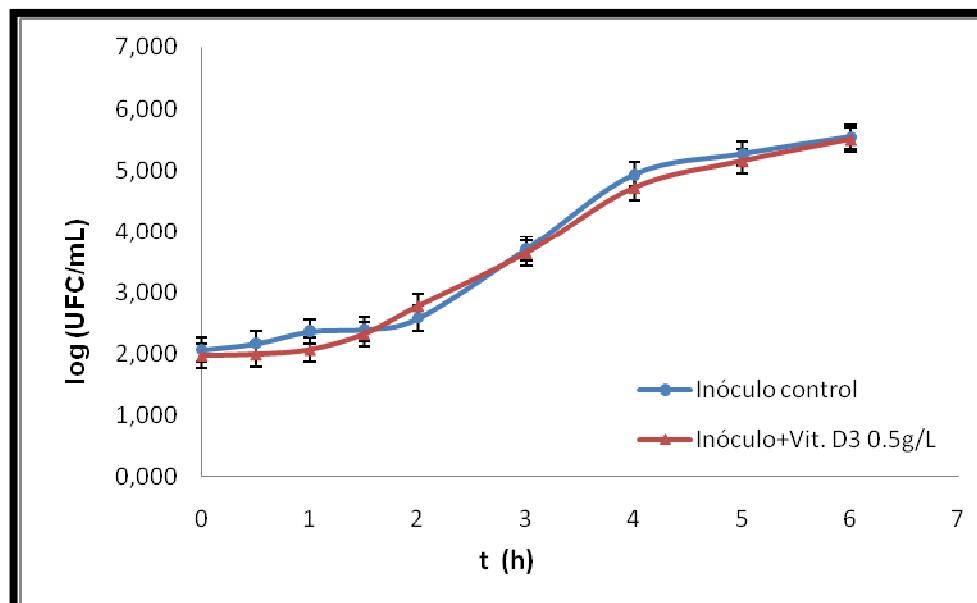


Gráfico 1. Curvas de crecimiento de *E. coli* utilizando una concentración de 0,5g/L de vitamina D3.

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina D3 – 5,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,933 ± 0,011	1,735 ± 0,093
0,5	1,943 ± 0,010	1,863 ± 0,032
1	2,126 ± 0,011	2,068 ± 0,025
1,5	2,710 ± 0,029	2,336 ± 0,016
2	2,896 ± 0,046	2,758 ± 0,032
3	3,491 ± 0,057	3,363 ± 0,047
4	4,417 ± 0,107	4,273 ± 0,173
5	4,988 ± 0,052	4,719 ± 0,073
6	5,398 ± 0,099	5,311 ± 0,088
6,5	5,620 ± 0,065	5,722 ± 0,062
7	6,722 ± 0,078	6,177 ± 0,033

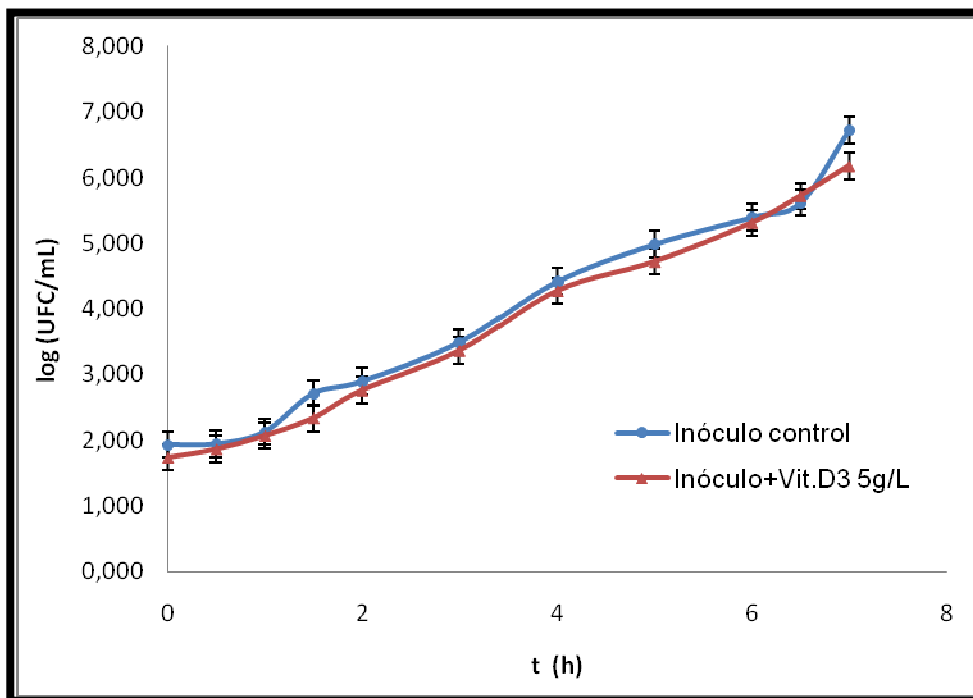


Gráfico 2. Curvas de crecimiento de *E. coli* utilizando una concentración de 5g/L de vitamina D3.

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina D3 – 50,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	2,135 ± 0,097	1,859 ± 0,025
0,5	2,191 ± 0,016	2,116 ± 0,027
1	2,280 ± 0,025	2,237 ± 0,009
1,5	2,403 ± 0,023	2,653 ± 0,047
2	2,613 ± 0,043	3,418 ± 0,024
3	3,746 ± 0,037	3,855 ± 0,058
4	4,246 ± 0,020	4,699 ± 0,098
4,5	4,687 ± 0,040	4,934 ± 0,025
5	5,338 ± 0,026	5,323 ± 0,013
5,5	5,732 ± 0,093	5,899 ± 0,048

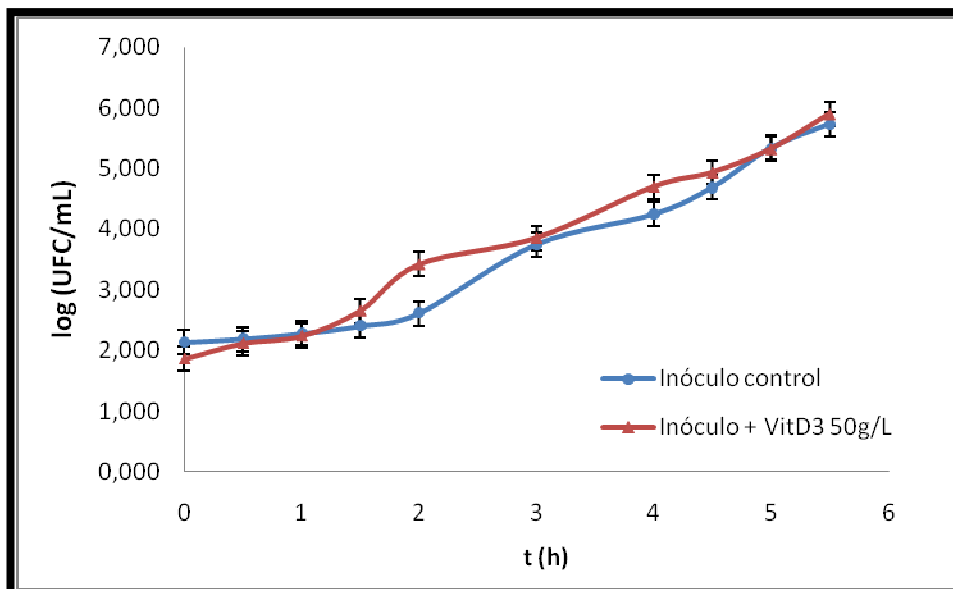


Gráfico 3. Curvas de crecimiento de *E. coli* utilizando una concentración de 50g/L de vitamina D3.

En el **Gráfico 4** se presenta la curva de crecimiento obtenida para *Staphylococcus aureus* :

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina D3 – 5,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,758 ± 0,026	1,308 ± 0,034
0,5	1,808 ± 0,019	1,322 ± 0,028
1	2,086 ± 0,030	1,368 ± 0,063
2	2,496 ± 0,046	2,194 ± 0,015
3	3,342 ± 0,027	3,001 ± 0,009
4	3,931 ± 0,014	3,943 ± 0,035
4,5	4,527 ± 0,053	4,650 ± 0,053
5	5,037 ± 0,047	5,085 ± 0,097

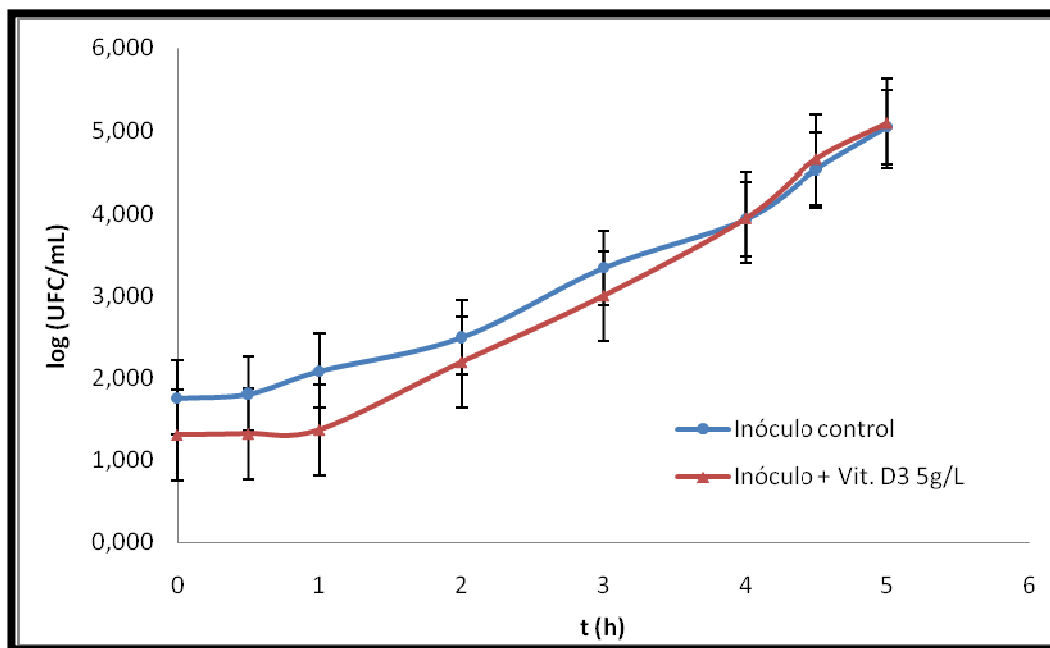


Gráfico 4. Curvas de crecimiento de *S. aureus* utilizando una concentración de 5g/L de vitamina D3.

En el **Gráfico 5** se presenta la curva de crecimiento obtenida para *Listeria monocytogenes* :

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina D3 – 5,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,308 ± 0,034	1,213 ± 0,021
0,5	1,349 ± 0,040	1,329 ± 0,059
1	1,620 ± 0,052	1,669 ± 0,026
2	2,276 ± 0,008	2,083 ± 0,022
3	2,613 ± 0,065	2,488 ± 0,014
4	2,713 ± 0,037	2,776 ± 0,035
4,5	3,045 ± 0,061	3,188 ± 0,030
5	3,334 ± 0,019	3,758 ± 0,070

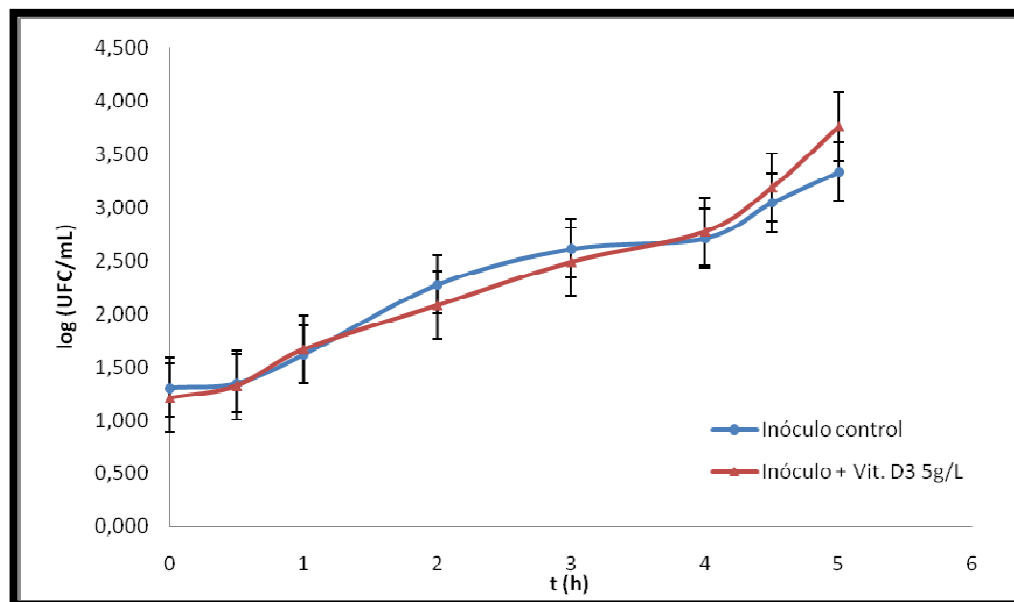


Gráfico 5. Curvas de crecimiento de *L.monocytogenes* utilizando una concentración de 5g/L de vitamina D3.

En la **Tabla 3** se resume los valores obtenidos de velocidad específica de crecimiento y del tiempo de duplicación para los microorganismos en estudio

Microorganismo	Concentración Vitamina D3 (g/L)	μ (h^{-1})		t_d (h)	
		Inóculo control	Inóculo + Vit. D3	Inóculo control	Inóculo + Vit. D3
<i>Escherichia coli</i>	0,5	1,70	1,71	0,41	0,40
	5	1,57	1,55	0,44	0,45
	50	1,82	1,76	0,38	0,39
<i>S. aureus</i>	5	1,62	2,15	0,43	0,32
<i>L. monocytogenes</i>	5	0,94	1,08	0,74	0,63

Tabla 3. Valores de μ y t_d obtenidos utilizando vitamina D3 como aditivo.

5.2 Resultados obtenidos utilizando vitamina B3 como aditivo

Se estudió la actividad de la vitamina B3 a concentraciones de 1,0, 3,0 y 5,0 g/L en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En los **Gráficos 6, 7 y 8** se resumen las curvas de crecimiento obtenidas para *Escherichia coli* :

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina B3 – 1,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) \pm IC	log (UFC/mL) \pm IC
0	1,740 \pm 0,054	1,602 \pm 0,038
0,5	1,743 \pm 0,054	1,713 \pm 0,071
1	1,841 \pm 0,035	1,861 \pm 0,019
1,5	2,438 \pm 0,047	2,077 \pm 0,055
2	2,949 \pm 0,040	2,407 \pm 0,014
3	3,606 \pm 0,086	3,243 \pm 0,048
4	4,295 \pm 0,042	3,997 \pm 0,055
5	5,338 \pm 0,086	4,981 \pm 0,094
5,5	5,705 \pm 0,035	5,548 \pm 0,010
6	6,247 \pm 0,039	6,074 \pm 0,022

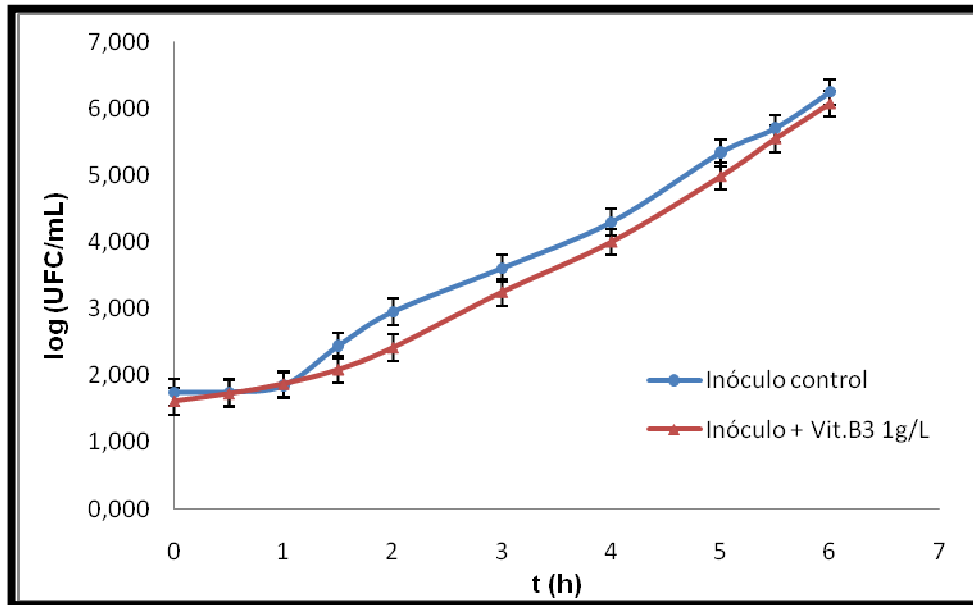


Gráfico 6. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* utilizando una concentración de 1g/L de vitamina B3.

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina B3 – 3,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,591 ± 0,030	1,595 ± 0,038
0,5	1,633 ± 0,062	1,627 ± 0,043
1	1,724 ± 0,086	1,415 ± 0,076
1,5	1,967 ± 0,040	1,477 ± 0,071
2	2,474 ± 0,029	1,442 ± 0,054
3	3,480 ± 0,011	1,421 ± 0,048
4	3,813 ± 0,077	1,301 ± 0,123
5	4,852 ± 0,011	1,404 ± 0,035
6	5,656 ± 0,027	1,362 ± 0,044
6,5	6,540 ± 0,043	1,279 ± 0,031
7	7,054 ± 0,114	1,294 ± 0,061
7,5	7,091 ± 0,027	1,239 ± 0,105

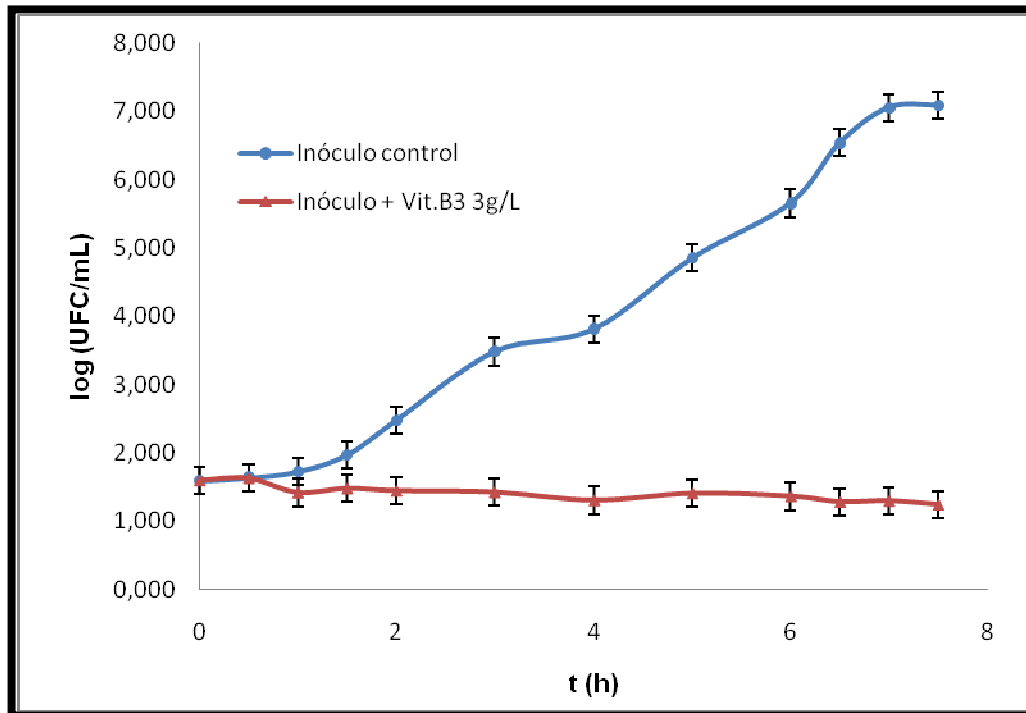


Gráfico 7. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* utilizando una concentración de 3g/L de vitamina B3.

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina B3 – 5,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,773 ± 0,041	1,785 ± 0,039
0,5	1,811 ± 0,032	1,176 ± 0,101
1	1,890 ± 0,055	0,564 ± 0,098
2	2,362 ± 0,026	0 ± N/C
3	3,286 ± 0,095	0 ± N/C
4	4,426 ± 0,079	0 ± N/C
5	5,111 ± 0,017	0 ± N/C
5,5	5,839 ± 0,034	0 ± N/C
6	6,190 ± 0,030	0 ± N/C

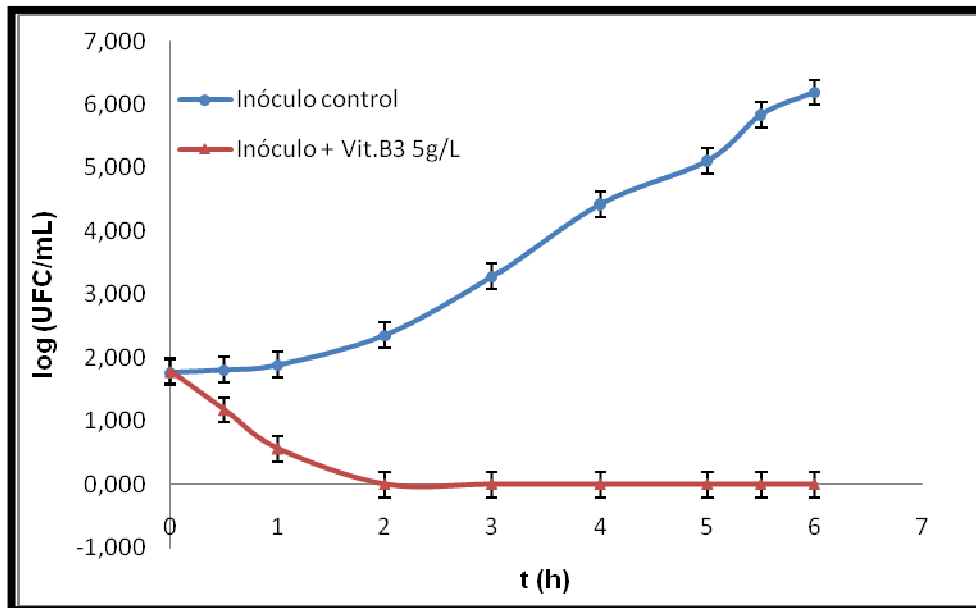


Gráfico 8. Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* utilizando una concentración de 5g/L de vitamina B3.

En los **Gráficos 9, 10 y 11** se presentan las curvas de crecimiento obtenidas para *Staphylococcus aureus*:

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina B3 – 1,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	0,938 ± 0,040	0,824 ± 0,098
0,5	0,938 ± 0,076	0,938 ± 0,108
1	0,970 ± 0,159	1,000 ± 0,098
1,5	1,576 ± 0,058	1,380 ± 0,099
2	1,678 ± 0,031	1,355 ± 0,119
3	2,028 ± 0,062	1,999 ± 0,015
4	2,738 ± 0,027	2,678 ± 0,056
5	3,310 ± 0,020	3,016 ± 0,075
6	4,474 ± 0,005	3,111 ± 0,037
6,5	4,946 ± 0,019	3,272 ± 0,014
7	5,286 ± 0,065	3,306 ± 0,022

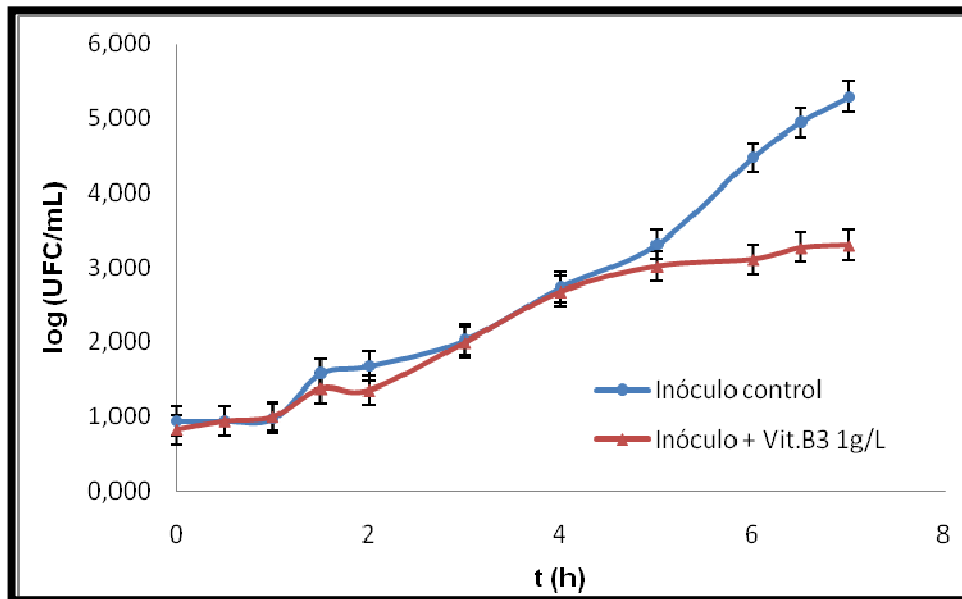


Gráfico 9. Curvas de crecimiento de *S. aureus* utilizando una concentración de 1g/L de vitamina B3.

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina B3 – 3,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,811 ± 0,041	1,851 ± 0,030
0,5	1,820 ± 0,033	1,771 ± 0,045
1	1,923 ± 0,035	1,730 ± 0,026
1,5	2,003 ± 0,014	1,899 ± 0,009
2	2,204 ± 0,011	1,877 ± 0,025
2,5	2,562 ± 0,009	1,908 ± 0,013
3	3,018 ± 0,043	2,006 ± 0,024
4	3,580 ± 0,055	2,024 ± 0,028
5	4,306 ± 0,014	2,289 ± 0,016
6	5,266 ± 0,010	2,534 ± 0,015
7	6,409 ± 0,025	3,159 ± 0,021
8	7,270 ± 0,014	3,462 ± 0,009
9	8,303 ± 0,023	4,308 ± 0,034
9,5	8,456 ± 0,007	4,442 ± 0,051
10	8,459 ± 0,014	4,491 ± 0,036

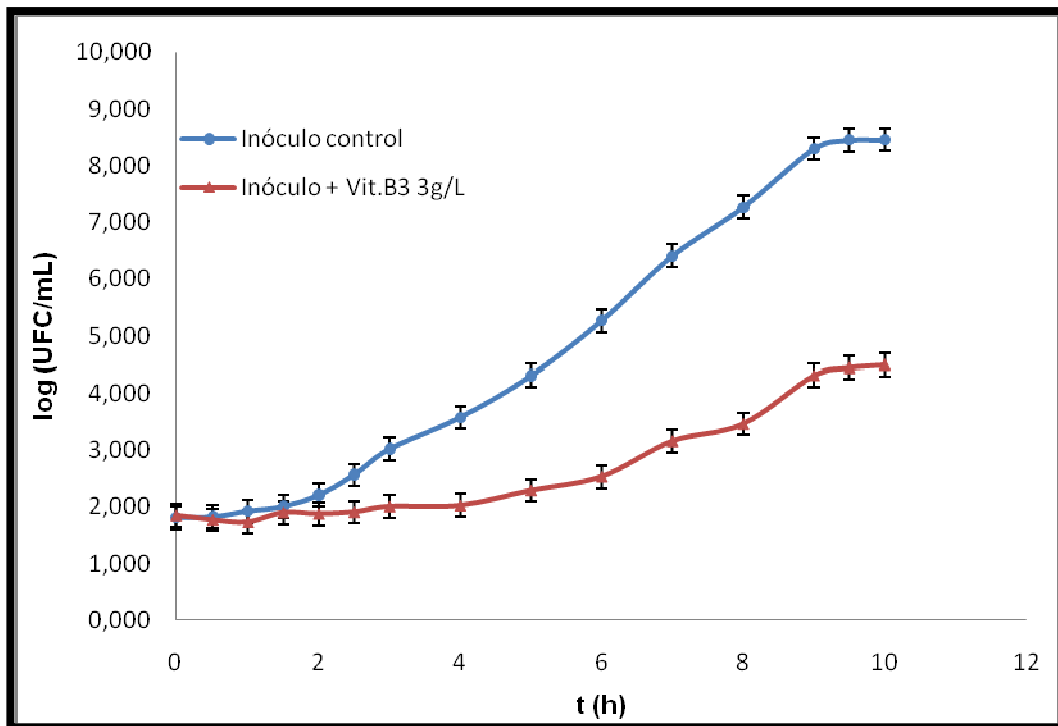


Gráfico 10. Curvas de crecimiento de *S. aureus* utilizando una concentración de 3g/L de vitamina B3.

Inóculo Control		Inóculo con Vitamina B3 – 5,0 g/L
t (h)	log (UFC/mL) ± IC	log (UFC/mL) ± IC
0	1,054 ± 0,078	1,136 ± 0,106
0,5	1,176 ± 0,079	1,067 ± 0,102
1	1,263 ± 0,069	1,091 ± 0,027
2	1,693 ± 0,049	1,067 ± 0,057
3	2,560 ± 0,055	0,970 ± 0,076
4	3,491 ± 0,086	1,103 ± 0,094
5	4,020 ± 0,031	1,091 ± 0,072
5,5	4,576 ± 0,072	1,091 ± 0,104
6	5,037 ± 0,020	0,753 ± 0,115

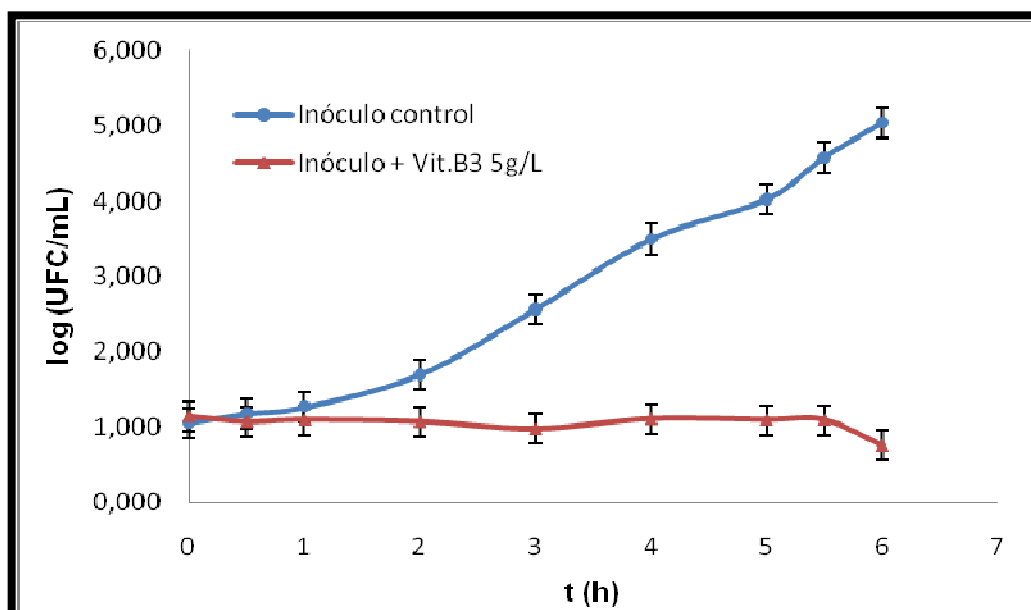


Gráfico 11. Curvas de crecimiento de *S. aureus* utilizando una concentración de 5g/L de vitamina B3.

En la **Tabla 4** se resume los valores obtenidos de velocidad específica de crecimiento y del tiempo de duplicación para los microorganismos en estudio

Microorganismo	Concentración Vitamina B3 (g/L)	μ (h^{-1})		t_d (h)	
		Inóculo control	Inóculo + Vit. B3	Inóculo control	Inóculo + Vit. B3
<i>Escherichia coli</i>	1	1,94	1,96	0,36	0,35
	3	1,93	0	0,36	N/C
	5	2,07	0	0,34	N/C
<i>S. aureus</i>	1	1,61	1,19	0,43	0,58
	3	1,88	1,02	0,37	0,68
	5	1,77	0	0,39	N/C

Tabla 4. Valores de μ y t_d obtenidos utilizando vitamina B3 como aditivo.

6. Discusión

En todos los casos estudiados utilizando vitamina D3, y teniendo en cuenta la incertidumbre asociada al método, no se detectó un efecto significativo de la vitamina sobre los microorganismos estudiados con respecto al control. Los valores de velocidad específica de crecimiento son muy parecidos, y si bien los datos calculados del tiempo de duplicación son sensiblemente menores en la mayoría de los sistemas que contienen vitamina, no es suficiente para afirmar que se haya experimentado un efecto de inhibición del crecimiento.

Los valores de velocidad específicas mayores se podrían explicar teniendo en cuenta que en algunos casos se produce un alargamiento de la fase de latencia, como en el caso de *S. aureus* (Gráfico 4), sin embargo la pendiente de la curva en la fase de crecimiento exponencial se acentúa debido a éste efecto y da como resultado valores mayores de μ .

Los ensayos realizados con vitamina B3 como aditivo muestran una marcada actividad de dicha vitamina a partir de 1,0 g/L. A ésta concentración no se observan efectos importantes en *E. coli*, pero sí se observa una disminución del tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria en *S. aureus* (Gráfico 9), así como una disminución de μ para dicho microorganismo.

Los casos estudiados utilizando concentraciones de vitamina B3 de 3,0 g/L evidencian un marcado efecto de inhibición del crecimiento en *E. coli*, que se mantiene prácticamente constante durante 8 horas (Gráfico 7), y una importante disminución de la velocidad específica de crecimiento para *S. aureus* y de la fracción de microorganismos que alcanzan la fase de mantenimiento (Gráfico 10). También se produce un aumento del tiempo necesario para la duplicación, aumentando en un 84% con respecto al control.

Al utilizar una concentración de vitamina B3 de 5,0 g/L se evidencia una marcada disminución del número de microorganismos de *E. coli*, no registrándose crecimiento alguno a partir de las 2 horas de la inoculación del mismo (Gráfico 8). Para el caso de *S. aureus* se observa una inhibición del crecimiento con una disminución del número de células a partir de las 5,5 horas.

Teniendo en cuenta éstos resultados se puede concluir que la vitamina B3 se podría utilizar como potencial inhibidor de microorganismos al incorporarse a alimentos, teniendo en cuenta su naturaleza hidrofílica, ya que ésta es particularmente favorable para su actividad antimicrobiana al favorecerse el transporte y movilidad dentro del alimento y su migración hasta las células.

Sin duda es una línea de estudio innovadora que requiere de mayores inversiones en investigación y desarrollo de nuevos productos, que lleva asociada la dificultad del manejo adecuado de cepas (lo que permite una identificación y clasificación aceptable de los microorganismos susceptibles), un adecuado mantenimiento de las vitaminas, ya que muchas son sensibles a la descomposición por factores atmosféricos y una adecuada selección de la metodología utilizada, la que lleva a resultados confiables y reproducibles.

7. Bibliografía

1. APHA, “Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods”, 4ta. Edición, Año 2001.
2. Merck Microbiology Manual, 12th Edition, 2000.
3. Microorganism in Foods, Tomo 6, Blackie Academic & Professional.
4. “Standard Methods for the examination of Dairy Products”, H. Michael Wehr; J.F.Frank, 17th Edition, 2004.
5. “*In vitro Growth Inhibition of Food-borne Pathogens and Food Spoilage Microorganism by Vitamin K5*”, J. Miranda; F. Jorge; L. Dominguez; A. Cepeda; C. Franco; Food Bioprocess Technol (2011) 4: 1060-1065.
6. Material del curso Ingeniería Bioquímica, Universidad de la República, Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Montevideo, Uruguay.
7. National Standard Method - “Uncertainty of Measurement in Testing”; Reference N° QSOP 4; Health Protection Agency, UK.
8. Material del curso de Control de Calidad, Universidad de la República, Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Mecánica y Producción Industrial, Montevideo, Uruguay.
9. “El modelado matemático: una herramienta útil para la Industria Alimenticia” – Ciencia Veterinaria. UNLPam-2001.
10. Vitamin B12 and Marine Ecology. The kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis Lutheri* - Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, Vol. 48, 1968.
11. Relation of Bacteria to Vitamins and other Growth Factors – Bacteriology Reviews, 1945, Vol.9, pág. 49-109.

APÉNDICE – Cálculo de Incertidumbres

A continuación se detalla el cálculo de los Intervalos de Confianza (IC) utilizados. Teniendo en cuenta que el crecimiento de poblaciones bacterianas sigue una distribución de Poisson, se saca el valor del parámetro t , que para un nivel de confianza del 95% y para $n=3$ tiene un valor de $t = 2,3534$.

El resultado se expresa de la forma: $\log (\text{UFC/mL})_{\text{promedio}} \pm t.s/(n)^{1/2}$

Siendo s la desviación estándar de los recuentos realizados.

Sin embargo, como se mencionó anteriormente, a los efectos de representar gráficamente la incertidumbre en crecimiento de los microorganismos, se utilizó un valor conservador de $\pm 0,2$, que es el que habitualmente se utiliza en el Dpto. de Microbiología.

En las siguientes páginas se detallan los resultados obtenidos para cada experimento y para cada microorganismo en estudio.

Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	Vitamina: D3	Concentración: 0,5 g/L
--	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	120	112	115	116	2,079	2,049	2,061	2,063	0,015	0,021
0,5	142	145	152	146	2,152	2,161	2,182	2,165	0,015	0,021
1	230	228	232	230	2,362	2,358	2,365	2,362	0,004	0,005
1,5	254	248	243	248	2,405	2,394	2,386	2,395	0,010	0,013
2	360	380	390	377	2,556	2,580	2,591	2,576	0,018	0,024
3	5600	4800	4700	5033	3,748	3,681	3,672	3,702	0,042	0,056
4	81000	92000	82000	85000	4,908	4,964	4,914	4,929	0,031	0,041
5	190000	178000	184000	184000	5,279	5,250	5,265	5,265	0,014	0,019
6	350000	341000	356000	349000	5,544	5,533	5,551	5,543	0,009	0,013

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	92	95	89	92	1,964	1,978	1,949	1,964	0,014	0,019
0,5	96	96	97	96	1,982	1,982	1,987	1,984	0,003	0,004
1	110	115	119	115	2,041	2,061	2,076	2,059	0,017	0,023
1,5	220	189	210	206	2,342	2,276	2,322	2,315	0,034	0,046
2	630	560	580	590	2,799	2,748	2,763	2,771	0,026	0,036
3	3900	4300	4800	4333	3,591	3,633	3,681	3,637	0,045	0,061
4	46000	53000	57000	52000	4,663	4,724	4,756	4,716	0,047	0,064
5	130000	145000	149000	141333	5,114	5,161	5,173	5,150	0,031	0,043
6	310000	316000	329000	318333	5,491	5,500	5,517	5,503	0,013	0,018

Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	Vitamina: D3	Concentración: 5,0 g/L
--	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	86	87	84	86	1,934	1,940	1,924	1,933	0,008	0,011
0,5	89	86	88	88	1,949	1,934	1,944	1,943	0,008	0,010
1	136	131	134	134	2,134	2,117	2,127	2,126	0,008	0,011
1,5	540	490	510	513	2,732	2,690	2,708	2,710	0,021	0,029
2	720	800	840	787	2,857	2,903	2,924	2,896	0,034	0,046
3	3400	2800	3100	3100	3,531	3,447	3,491	3,491	0,042	0,057
4	21000	29000	28400	26133	4,322	4,462	4,453	4,417	0,078	0,107
5	89000	106000	97000	97333	4,949	5,025	4,987	4,988	0,038	0,052
6	300000	220000	230000	250000	5,477	5,342	5,362	5,398	0,073	0,099
6,5	370000	420000	460000	416667	5,568	5,623	5,663	5,620	0,047	0,065
7	6000000	5200000	4600000	5266667	6,778	6,716	6,663	6,722	0,058	0,078

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	47	64	52	54	1,672	1,806	1,716	1,735	0,068	0,093
0,5	73	77	69	73	1,863	1,886	1,839	1,863	0,024	0,032
1	122	112	117	117	2,086	2,049	2,068	2,068	0,019	0,025
1,5	220	220	210	217	2,342	2,342	2,322	2,336	0,012	0,016
2	600	580	540	573	2,778	2,763	2,732	2,758	0,023	0,032
3	2100	2400	2420	2307	3,322	3,380	3,384	3,363	0,035	0,047
4	13000	22000	21200	18733	4,114	4,342	4,326	4,273	0,128	0,173
5	60000	48000	49000	52333	4,778	4,681	4,690	4,719	0,054	0,073
6	240000	180000	194000	204667	5,380	5,255	5,288	5,311	0,065	0,088
6,5	470000	530000	580000	526667	5,672	5,724	5,763	5,722	0,046	0,062
7	1500000	1420000	1590000	1503333	6,176	6,152	6,201	6,177	0,025	0,033

Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	Vitamina: D3	Concentración: 50,0 g/L
--	---------------------	--------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	112	145	152	136	2,049	2,161	2,182	2,135	0,071	0,097
0,5	160	152	154	155	2,204	2,182	2,188	2,191	0,012	0,016
1	190	183	199	191	2,279	2,262	2,299	2,280	0,018	0,025
1,5	260	242	257	253	2,415	2,384	2,410	2,403	0,017	0,023
2	440	410	380	410	2,643	2,613	2,580	2,613	0,032	0,043
3	5900	5600	5200	5567	3,771	3,748	3,716	3,746	0,028	0,037
4	18200	17000	17600	17600	4,260	4,230	4,246	4,246	0,015	0,020
4,5	45000	50000	51000	48667	4,653	4,699	4,708	4,687	0,029	0,040
5	210000	215000	229000	218000	5,322	5,332	5,360	5,338	0,019	0,026
5,5	450000	560000	610000	540000	5,653	5,748	5,785	5,732	0,068	0,093

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	69	73	75	72	1,839	1,863	1,875	1,859	0,018	0,025
0,5	130	125	137	131	2,114	2,097	2,137	2,116	0,020	0,027
1	170	173	175	173	2,230	2,238	2,243	2,237	0,006	0,009
1,5	440	490	420	450	2,643	2,690	2,623	2,653	0,034	0,047
2	2700	2500	2650	2617	3,431	3,398	3,423	3,418	0,017	0,024
3	7100	7900	6500	7167	3,851	3,898	3,813	3,855	0,042	0,058
4	41000	56000	53000	50000	4,613	4,748	4,724	4,699	0,072	0,098
4,5	89000	87000	82000	86000	4,949	4,940	4,914	4,934	0,018	0,025
5	210000	215000	206000	210333	5,322	5,332	5,314	5,323	0,009	0,013
5,5	860000	730000	790000	793333	5,934	5,863	5,898	5,899	0,036	0,048

Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i>	Vitamina: D3	Concentración: 5,0 g/L
---	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	57	55	60	57	1,756	1,740	1,778	1,758	0,019	0,026
0,5	62	65	66	64	1,792	1,813	1,820	1,808	0,014	0,019
1	120	129	117	122	2,079	2,111	2,068	2,086	0,022	0,030
2	300	342	297	313	2,477	2,534	2,473	2,496	0,034	0,046
3	2100	2190	2300	2197	3,322	3,340	3,362	3,342	0,020	0,027
4	8600	8300	8700	8533	3,934	3,919	3,940	3,931	0,011	0,014
4,5	33000	31000	37000	33667	4,519	4,491	4,568	4,527	0,039	0,053
5	100000	110000	117000	109000	5,000	5,041	5,068	5,037	0,034	0,047

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	21	19	21	20	1,322	1,279	1,322	1,308	0,025	0,034
0,5	21	22	20	21	1,322	1,342	1,301	1,322	0,021	0,028
1	21	23	26	23	1,322	1,362	1,415	1,368	0,047	0,063
2	160	152	157	156	2,204	2,182	2,196	2,194	0,011	0,015
3	1000	1020	990	1003	3,000	3,009	2,996	3,001	0,007	0,009
4	8900	9200	8200	8767	3,949	3,964	3,914	3,943	0,026	0,035
4,5	44000	41000	49000	44667	4,643	4,613	4,690	4,650	0,039	0,053
5	100000	129000	136000	121667	5,000	5,111	5,134	5,085	0,071	0,097

Microorganismo:	<i>Listeria monocytogenes</i>	Vitamina:	D3	Concentración:	5,0 g/L
------------------------	-------------------------------	------------------	----	-----------------------	---------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	21	19	21	20	1,322	1,279	1,322	1,308	0,025	0,034
0,5	22	21	24	22	1,342	1,322	1,380	1,349	0,029	0,040
1	40	39	46	42	1,602	1,591	1,663	1,620	0,039	0,052
2	190	186	191	189	2,279	2,270	2,281	2,276	0,006	0,008
3	400	460	370	410	2,602	2,663	2,568	2,613	0,048	0,065
4	480	540	530	517	2,681	2,732	2,724	2,713	0,027	0,037
4,5	1000	1100	1230	1110	3,000	3,041	3,090	3,045	0,045	0,061
5	2090	2160	2230	2160	3,320	3,334	3,348	3,334	0,014	0,019

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	16	16	17	16	1,204	1,204	1,230	1,213	0,015	0,021
0,5	22	23	19	21	1,342	1,362	1,279	1,329	0,043	0,059
1	45	49	46	47	1,653	1,690	1,663	1,669	0,019	0,026
2	120	117	126	121	2,079	2,068	2,100	2,083	0,016	0,022
3	300	308	315	308	2,477	2,489	2,498	2,488	0,011	0,014
4	600	560	630	597	2,778	2,748	2,799	2,776	0,026	0,035
4,5	1500	1630	1490	1540	3,176	3,212	3,173	3,188	0,022	0,030
5	5000	5900	6300	5733	3,699	3,771	3,799	3,758	0,052	0,070

Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	Vitamina: B3	Concentración: 1,0 g/L
---	--------------	------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	55	60	50	55	1,740	1,778	1,699	1,740	0,040	0,054
0,5	60	56	50	55	1,778	1,748	1,699	1,743	0,040	0,054
1	70	73	65	69	1,845	1,863	1,813	1,841	0,026	0,035
1,5	250	289	284	274	2,398	2,461	2,453	2,438	0,034	0,047
2	890	950	830	890	2,949	2,978	2,919	2,949	0,029	0,040
3	4200	3400	4500	4033	3,623	3,531	3,653	3,606	0,063	0,086
4	21400	18900	18900	19733	4,330	4,276	4,276	4,295	0,031	0,042
5	256000	197000	201000	218000	5,408	5,294	5,303	5,338	0,063	0,086
5,5	500000	540000	480000	506667	5,699	5,732	5,681	5,705	0,026	0,035
6	1900000	1670000	1730000	1766667	6,279	6,223	6,238	6,247	0,029	0,039

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	43	39	38	40	1,633	1,591	1,580	1,602	0,028	0,038
0,5	45	53	57	52	1,653	1,724	1,756	1,713	0,053	0,071
1	74	74	70	73	1,869	1,869	1,845	1,861	0,014	0,019
1,5	132	110	116	119	2,121	2,041	2,064	2,077	0,041	0,055
2	262	254	250	255	2,418	2,405	2,398	2,407	0,010	0,014
3	1630	1910	1710	1750	3,212	3,281	3,233	3,243	0,035	0,048
4	10300	10600	8900	9933	4,013	4,025	3,949	3,997	0,041	0,055
5	86000	114000	87000	95667	4,934	5,057	4,940	4,981	0,069	0,094
5,5	360000	348000	352000	353333	5,556	5,542	5,547	5,548	0,007	0,010
6	1140000	1230000	1190000	1186667	6,057	6,090	6,076	6,074	0,017	0,022

Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	Vitamina: B3	Concentración: 3,0 g/L
--	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	41	39	37	39	1,613	1,591	1,568	1,591	0,022	0,030
0,5	48	39	42	43	1,681	1,591	1,623	1,633	0,046	0,062
1	62	50	47	53	1,792	1,699	1,672	1,724	0,063	0,086
1,5	100	90	88	93	2,000	1,954	1,944	1,967	0,030	0,040
2	300	282	311	298	2,477	2,450	2,493	2,474	0,022	0,029
3	2980	3000	3090	3023	3,474	3,477	3,490	3,480	0,008	0,011
4	6000	6000	7520	6507	3,778	3,778	3,876	3,813	0,057	0,077
5	71000	72500	69750	71083	4,851	4,860	4,844	4,852	0,008	0,011
6	460000	430000	470000	453333	5,663	5,633	5,672	5,656	0,020	0,027
6,5	3500000	3200000	3700000	3466667	6,544	6,505	6,568	6,540	0,032	0,043
7	9000000	12000000	13000000	11333333	6,954	7,079	7,114	7,054	0,084	0,114
7,5	12000000	12000000	13000000	12333333	7,079	7,079	7,114	7,091	0,020	0,027

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	37	39	42	39	1,568	1,591	1,623	1,595	0,028	0,038
0,5	45	43	39	42	1,653	1,633	1,591	1,627	0,032	0,043
1	30	24	24	26	1,477	1,380	1,380	1,415	0,056	0,076
1,5	32	26	32	30	1,505	1,415	1,505	1,477	0,052	0,071
2	30	28	25	28	1,477	1,447	1,398	1,442	0,040	0,054
3	24	28	27	26	1,380	1,447	1,431	1,421	0,035	0,048
4	18	25	17	20	1,255	1,398	1,230	1,301	0,090	0,123
5	27	24	25	25	1,431	1,380	1,398	1,404	0,026	0,035
6	22	25	22	23	1,342	1,398	1,342	1,362	0,032	0,044
6,5	20	18	19	19	1,301	1,255	1,279	1,279	0,023	0,031
7	22	19	18	20	1,342	1,279	1,255	1,294	0,045	0,061
7,5	21	16	15	17	1,322	1,204	1,176	1,239	0,078	0,105

Microorganismo: <i>Escherichia coli</i>	Vitamina: B3	Concentración: 5,0 g/L
--	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	63	55	60	59	1,799	1,740	1,778	1,773	0,030	0,041
0,5	68	65	61	65	1,833	1,813	1,785	1,811	0,024	0,032
1	75	86	72	78	1,875	1,934	1,857	1,890	0,040	0,055
2	220	230	240	230	2,342	2,362	2,380	2,362	0,019	0,026
3	1800	2300	1700	1933	3,255	3,362	3,230	3,286	0,070	0,095
4	27000	23000	30000	26667	4,431	4,362	4,477	4,426	0,058	0,079
5	132000	125000	130000	129000	5,121	5,097	5,114	5,111	0,012	0,017
5,5	730000	690000	650000	690000	5,863	5,839	5,813	5,839	0,025	0,034
6	1640000	1490000	1520000	1550000	6,215	6,173	6,182	6,190	0,022	0,030

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	65	57	61	61	1,813	1,756	1,785	1,785	0,029	0,039
0,5	18	13	14	15	1,255	1,114	1,146	1,176	0,074	0,101
1	4	4	3	4	0,602	0,602	0,477	0,564	0,072	0,098
2	0	0	0	0	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C
3	0	0	0	0	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C
4	0	0	0	0	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C
5	0	0	0	0	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C
5,5	0	0	0	0	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C
6	0	0	0	0	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C	N/C

Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i>	Vitamina: B3	Concentración: 1,0 g/L
---	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	9	8	9	9	0,954	0,903	0,954	0,938	0,030	0,040
0,5	10	8	8	9	1,000	0,903	0,903	0,938	0,056	0,076
1	12	9	7	9	1,079	0,954	0,845	0,970	0,117	0,159
1,5	42	36	35	38	1,623	1,556	1,544	1,576	0,043	0,058
2	50	48	45	48	1,699	1,681	1,653	1,678	0,023	0,031
3	100	100	120	107	2,000	2,000	2,079	2,028	0,046	0,062
4	520	570	550	547	2,716	2,756	2,740	2,738	0,020	0,027
5	2000	2000	2120	2040	3,301	3,301	3,326	3,310	0,015	0,020
6	30000	29800	29500	29767	4,477	4,474	4,470	4,474	0,004	0,005
6,5	90000	90000	85000	88333	4,954	4,954	4,929	4,946	0,014	0,019
7	200000	210000	170000	193333	5,301	5,322	5,230	5,286	0,048	0,065

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	6	6	8	7	0,778	0,778	0,903	0,824	0,072	0,098
0,5	7	9	10	9	0,845	0,954	1,000	0,938	0,080	0,108
1	12	9	9	10	1,079	0,954	0,954	1,000	0,072	0,098
1,5	20	28	24	24	1,301	1,447	1,380	1,380	0,073	0,099
2	28	19	21	23	1,447	1,279	1,322	1,355	0,087	0,119
3	100	97	102	100	2,000	1,987	2,009	1,999	0,011	0,015
4	480	430	520	477	2,681	2,633	2,716	2,678	0,041	0,056
5	890	1120	1100	1037	2,949	3,049	3,041	3,016	0,056	0,075
6	1200	1320	1350	1290	3,079	3,121	3,130	3,111	0,027	0,037
6,5	1820	1890	1900	1870	3,260	3,276	3,279	3,272	0,010	0,014
7	2020	1950	2100	2023	3,305	3,290	3,322	3,306	0,016	0,022

Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i>	Vitamina: B3	Concentración: 3,0 g/L
---	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	62	62	70	65	1,792	1,792	1,845	1,811	0,030	0,041
0,5	69	67	62	66	1,839	1,826	1,792	1,820	0,024	0,033
1	79	83	89	84	1,898	1,919	1,949	1,923	0,026	0,035
1,5	102	102	98	101	2,009	2,009	1,991	2,003	0,010	0,014
2	160	157	163	160	2,204	2,196	2,212	2,204	0,008	0,011
2,5	370	359	365	365	2,568	2,555	2,562	2,562	0,007	0,009
3	1130	1020	980	1043	3,053	3,009	2,991	3,018	0,032	0,043
4	4200	3700	3500	3800	3,623	3,568	3,544	3,580	0,041	0,055
5	20800	20000	19900	20233	4,318	4,301	4,299	4,306	0,011	0,014
6	184000	182000	188000	184667	5,265	5,260	5,274	5,266	0,007	0,010
7	2660000	2450000	2580000	2563333	6,425	6,389	6,412	6,409	0,018	0,025
8	19100000	18600000	18200000	18633333	7,281	7,270	7,260	7,270	0,010	0,014
9	198000000	210000000	195000000	201000000	8,297	8,322	8,290	8,303	0,017	0,023
9,5	282000000	287000000	289000000	286000000	8,450	8,458	8,461	8,456	0,005	0,007
10	295000000	281000000	287000000	287666667	8,470	8,449	8,458	8,459	0,011	0,014

Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i>	Vitamina: B3	Concentración: 3,0 g/L
---	---------------------	-------------------------------

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	68	70	75	71	1,833	1,845	1,875	1,851	0,022	0,030
0,5	58	64	55	59	1,763	1,806	1,740	1,771	0,033	0,045
1	51	55	55	54	1,708	1,740	1,740	1,730	0,019	0,026
1,5	78	80	80	79	1,892	1,903	1,903	1,899	0,006	0,009
2	73	79	74	75	1,863	1,898	1,869	1,877	0,018	0,025
2,5	82	79	82	81	1,914	1,898	1,914	1,908	0,009	0,013
3	105	102	97	101	2,021	2,009	1,987	2,006	0,017	0,024
4	101	105	111	106	2,004	2,021	2,045	2,024	0,021	0,028
5	190	200	193	194	2,279	2,301	2,286	2,289	0,011	0,016
6	345	332	349	342	2,538	2,521	2,543	2,534	0,011	0,015
7	1390	1490	1450	1443	3,143	3,173	3,161	3,159	0,015	0,021
8	2940	2900	2850	2897	3,468	3,462	3,455	3,462	0,007	0,009
9	21700	19800	19500	20333	4,336	4,297	4,290	4,308	0,025	0,034
9,5	25000	28900	29100	27667	4,398	4,461	4,464	4,442	0,037	0,051
10	29700	33200	30000	30967	4,473	4,521	4,477	4,491	0,027	0,036

Microorganismo: <i>Staphylococcus aureus</i>	Vitamina: B3	Concentración: 5,0 g/L
---	---------------------	-------------------------------

Inóculo Control										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	13	11	10	11	1,114	1,041	1,000	1,054	0,058	0,078
0,5	15	17	13	15	1,176	1,230	1,114	1,176	0,058	0,079
1	16	19	20	18	1,204	1,279	1,301	1,263	0,051	0,069
2	50	45	53	49	1,699	1,653	1,724	1,693	0,036	0,049
3	360	330	398	363	2,556	2,519	2,600	2,560	0,041	0,055
4	2700	3600	3000	3100	3,431	3,556	3,477	3,491	0,063	0,086
5	10500	9900	11000	10467	4,021	3,996	4,041	4,020	0,023	0,031
5,5	36000	43000	34000	37667	4,556	4,633	4,531	4,576	0,053	0,072
6	110000	105000	112000	109000	5,041	5,021	5,049	5,037	0,014	0,020

Inóculo con Vitamina										
t (h)	(UFC/mL) ₁	(UFC/mL) ₂	(UFC/mL) ₃	(UFC/mL) _{prom}	log(UFC/mL) ₁	log(UFC/mL) ₂	log(UFC/mL) ₃	log(UFC/mL) _{prom}	s	Intervalo de confianza t.s/(n ^{1/2})
0	11	15	15	14	1,041	1,176	1,176	1,136	0,078	0,106
0,5	14	11	10	12	1,146	1,041	1,000	1,067	0,075	0,102
1	12	13	12	12	1,079	1,114	1,079	1,091	0,020	0,027
2	13	11	11	12	1,114	1,041	1,041	1,067	0,042	0,057
3	10	8	10	9	1,000	0,903	1,000	0,970	0,056	0,076
4	12	15	11	13	1,079	1,176	1,041	1,103	0,069	0,094
5	14	12	11	12	1,146	1,079	1,041	1,091	0,053	0,072
5,5	14	10	13	12	1,146	1,000	1,114	1,091	0,077	0,104
6	7	5	5	6	0,845	0,699	0,699	0,753	0,084	0,115