

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación
Análisis de la biodinámica y sobrevivencia de *Salmonella spp.* en
activados a base de microorganismos de montaña.

Estudiante

Jaime Andrés Zelaya Ruíz

Asesores

Ligia Elizabeth Luna Jarrín, M.Sc.

Adriana Hernández Santana, Dr.Sc.

Mayra Márquez González, Ph.D.

Honduras, noviembre 2023

Autoridades

SERGIO ANDRÉS RODRÍGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Director(a) Departamento de Agroindustria alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Luis Fernando Maldonado Ph.D, sin cuyos aportes y apoyo no habría sido posible la realización de este proyecto. Para el ingeniero Francisco Robles y al personal de la finca agroecológica de Zamorano por el apoyo incondicional y diligente con las necesidades del proyecto. Para las licenciadas Belinda Mayel Mateo y Mayra Jackeline Alvarado, por su valioso apoyo en los diferentes procesos experimentales que contemplo la realización de este proyecto.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de Cuadros.....	6
Índice de Figuras	7
Índice de Anexos	8
Resumen	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Materiales y Métodos	14
Localización del Estudio	14
Investigación de Campo	14
Proceso de Elaboración de los Activados a Base de MM.....	14
Procedimiento de Activaciones Para Estudio de Biodinámica Entre Consorcios Microbianos	15
Evaluación de Poblaciones Microbianas en Activados a Base de MM.	15
Determinación y Cuantificación de Ácidos Orgánicos	19
Determinación y Cuantificación de Etanol.....	20
Métodos Para Análisis de Supervivencia de <i>Salmonella spp.</i> en Activados a Base de MM	21
Descripción de las Cepas y Preparación del Inóculo	21
Método de Evaluación de Supervivencia de <i>Salmonella spp.</i> en los Activados a Base de MM	23
Método de Determinación de <i>Salmonella spp.</i> por Métodos Tradicionales	24
Pruebas de Sensibilidad en Disco Para <i>Salmonella spp.</i>	26
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	28
Resultados y Discusión.....	31
Biodinámica de los Activados a Base de MM	31
pH de los Activados a Base de MM.....	31

Temperatura de los Activados a Base de MM	32
Cambios de Color en los Activados a Base de MM	33
Dinámica de Grupos Microbianos Presentes en Activados a Base de MM	34
Determinación y Cuantificación de Ácidos Orgánicos por Fase de Activación.	39
Determinación de Contenido de Etanol por Fase de Activación.	41
Dinámica de Consorcios Microbianos y Metabolitos Presentes en Activados a Base de MM.	42
Sobrevivencia de <i>Salmonella spp.</i> en los Activados a Base de MM.....	45
Sobrevivencia de <i>Salmonella spp.</i> en Procesos de Confección de Activados a Base de MM.....	45
Prueba de Sensibilidad en Disco para Concentraciones de Metabolitos en Activados Líquidos a Base de MM.....	48
Conclusiones	50
Recomendaciones.....	51
Referencias.....	52
Anexos.....	56

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Condiciones de operación en cromatografía líquida de alta presión para determinación de ácidos orgánicos.....	20
Cuadro 2 Condiciones de operación en cromatografía de gases para determinar etanol.	21
Cuadro 3 Descripción de tratamientos para análisis de biodinámica en activados líquidos a base de MM.....	28
Cuadro 4 Descripción de tratamientos para análisis de sobrevivencia de <i>Salmonella spp.</i> en activados a base de MM.	29
Cuadro 5 Cambios de color a través del tiempo en activados líquidos a pase de MM.	34
Cuadro 6 Dinámica de poblaciones microbianas en activados a base de MM.....	35
Cuadro 7 Correlación de grupos microbianos con metabolitos en activados líquidos a base de MM en 6 DDA.	43
Cuadro 8 Correlación de grupos microbianos con metabolitos en activados líquidos a base de MM en 12 DDA.	43
Cuadro 9 Sobrevivencia de <i>Salmonella spp.</i> en activados a base de MM según fase de activación....	46

Índice de Figuras

Figura 1 Diagrama de Flujo experimental de elaboración de activados a base de MM y días de muestreo.....	18
Figura 2 Diagrama de Flujo de elaboración de inóculo de <i>Salmonella spp.</i>	22
Figura 3 Diagrama de Flujo experimental de elaboración de activados a base de MM y días de muestreo para sobrevivencia de <i>Salmonella spp.</i>	23
Figura 4 Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por métodos tradicionales.....	25
Figura 5 Procedimiento para análisis de sensibilidad de disco para <i>Salmonella spp.</i>	27
Figura 6 Gráfico de parámetro de pH durante el proceso de activación y confección de MM.....	32
Figura 7 Gráfico parámetro de temperatura durante el proceso de activación y confección de MM.	33
Figura 8 Dinámica de poblaciones microbianas en activados líquidos a base de MM.....	38
Figura 9 Formación de biofilm a 3 DDA, 6 DDA y 12 DDA en activados líquidos a base de MM.....	39
Figura 10 Contenido de ácido acético según DDA en activados líquidos a base de MM.	40
Figura 11 Contenido de ácido propiónico según DDA en activados líquidos a base de MM.	41
Figura 12 Contenido de etanol expresado en %volumen según DDA en activados líquidos a base de MM.....	42
Figura 13 Dinámica de formación de metabolitos en activados a base de MM.....	45
Figura 14 Curva de sobrevivencia de <i>Salmonella spp.</i> en activados a base de MM.....	48
Figura 15 Antibiógramas para <i>Salmonella spp.</i> en activados a base de MM.	49

Índice de Anexos

Anexo A Fase de activación solida de MM 30 DDA.	56
Anexo B Fase de activación líquida de MM.	57
Anexo C Montaje de activados líquidos a base de MM.	58
Anexo D Medición diaria de parámetros de fermentación.	59
Anexo E Destilación de ácidos orgánicos en activados líquidos a base de MM.	60
Anexo F Condiciones de pH y temperatura (°C) de los activados de MM.	61
Anexo G Morfología microscópica y tinción Gram de BAA en activados a base de MM.	64
Anexo H Morfología microscópica y tinción Gram de BAL en activados a base de MM.	65
Anexo I Morfología microscópica y tinción Gram de levaduras en activados a base de MM.	66
Anexo J Contenido de ácido acético y ácido propiónico por etapa de activación en activados líquidos a base de MM.	67
Anexo K Contenido de etanol expresado en %volumen por etapa de activación en activados líquidos a base de MM.	68
Anexo L Cromatograma para determinación de ácidos orgánicos en activados líquidos a base de MM.	69
Anexo M Cromatograma para determinación de etanol en activados líquidos a base de MM.	70

Resumen

Los Microorganismos de Montaña (MM) han ganado popularidad gracias a su versatilidad en prácticas agropecuarias. La comprensión de las biodinámicas de los MM y el control de patógenos en los procesos de activación son áreas poco exploradas. Se realizó una secuenciación de activaciones sólidas y líquidas, evaluando bacterias ácido-acéticas (BAA), bacterias ácido-lácticas (BAL), hongos, levaduras (HyL), etanol, ácido acético y ácido propiónico, llevando control de las condiciones de fermentación y se utilizó un diseño completamente al azar para evaluar los tratamientos, correspondientes a las fases y días de activación específicos. Durante el experimento el pH disminuyó, la temperatura se ajustó a la temperatura ambiente y se observaron cambios de color en los activados líquidos. Las poblaciones de BAA, BAL y HyL presentaron variaciones en el tiempo, las concentraciones de ácido acético, propiónico y porcentaje de volumen de etanol disminuyeron al final de cada activación líquida. Se inoculó *Salmonella spp.* desde la fase sólida y se siguió la secuenciación de activaciones. La sobrevivencia de *Salmonella spp.* disminuyó en los activados líquidos en el tiempo, siendo la competencia microbiana la principal barrera de control. Se evidenció la simbiosis entre grupos microbianos en los activados y se sugiere la utilización de los metabolitos producidos en procesos biológicos del consorcio. En conclusión, la biodinámica de los activados cambia en el tiempo y las fases de activación, además, estos biopreparados son capaces suprimir contaminaciones de patógenos como *Salmonella spp.* a través de la competencia y antagonismo microbiano, aumentando la confianza de su uso.

Palabras clave: Biopreparados, competencia microbiana, consorcios microbianos, días de activación, fases de activación.

Abstract

Mountain Microorganisms (MM) have gained popularity due to their versatility in agricultural practices. Understanding the biodynamics of MM and controlling pathogens in activation processes are areas that have been little explored. Solid and liquid activation sequencing was performed, evaluating acetic acid bacteria (AAB), lactic acid bacteria (LAB), yeasts, molds (Y&M), ethanol, acetic acid, and propionic acid. Fermentation conditions were monitored, and a completely randomized design was used to evaluate treatments corresponding to specific activation phases and days. During the experiment, the pH decreased, the temperature was adjusted to room temperature, and color changes were observed in the liquid activations. The populations of AAB, LAB, and Y&M showed variations over time, and the concentrations of acetic acid, propionic acid, and ethanol volume percentage decreased at the end of each liquid activation. *Salmonella spp.* was inoculated from the solid phase, and activation sequencing was followed. The survival of *Salmonella spp.* decreased over time in the liquid activations, with microbial competition being the main control barrier. Symbiosis between microbial groups in the activations was evident, and the use of metabolites produced in the consortium's biological processes is suggested. In conclusion, the biodynamics of activations change over time and activation phases. Additionally, these biopreparations are capable of suppressing pathogen contaminations such as *Salmonella spp.* through microbial competition and antagonism, increasing confidence in their use.

Keywords: Activation days, activation phases, biopreparations, microbial competition, microbial consortia.

Introducción

En los últimos años se ha popularizado el uso de insumos biológicos en la producción agrícola y pecuaria debido a la creciente preocupación por efectos perjudiciales de los insumos sintéticos, resultado de la residualidad de estos en los productos agropecuarios (Restrepo y Hensel, 2009). Además, se ha dado el crecimiento de la tendencia del uso de productos y remedios naturales para el tratamiento o prevención de afecciones como la inflamación de la mucosa gástrica o para la regeneración de la microflora intestinal, a través del uso de probióticos. Los microorganismos de montaña (MM) son definidos como poblaciones microbianas benéficas de origen en zonas antropológicamente no afectadas, las cuales favorecen el crecimiento vegetal en las plantas y optimizan la producción pecuaria, al incrementar la biodiversidad de la microflora (Córdor et al., 2007), potenciando la ganancia de peso gracias a su potencial probiótico. Al ser un tópico de reciente introducción en el entorno científico, las investigaciones acerca de la dinámica microbiana y la inocuidad de estos preparados durante el proceso de elaboración de estos son sumamente escasas. La contaminación por microorganismos patógenos de los activados probióticos destinados a la producción animal puede resultar en pérdidas durante la ganancia de peso, impactando directamente en los niveles productivos. También, puede causar problemas de salud a las personas que por desinformación confíen plenamente en estas creencias, ya que, aun cuando los activados probióticos sean considerados inocuos, se han reportado casos particulares de pacientes con bacteriemia y fungemia (Bertelli et al., 2015).

Existen diversos estudios previos en los que las propiedades probióticas de los MM han sido puestas a prueba en la producción animal. Los microorganismos de montaña obtenidos de ecosistemas poco afectados de forma antropogénica son una fuente de bacterias productoras de ácidos orgánicos, que pueden mejorar el valor nutricional del ensilaje y ser utilizados como probióticos en el agua de bebida, incrementando el rendimiento en el proceso de engorde del conejo (Medina-Saavedra et al., 2021). Sin embargo, las investigaciones se limitan a observar el funcionamiento de

estos activados probióticos en las actividades productivas agropecuarias, en base a supuestos en cuanto a la dinámica microbiana de los activados y sin tomar en cuenta la posibilidad de contaminación por microorganismos patógenos. Esto evidencia la necesidad de evaluar las posibles barreras que puede llegar a tener el producto para controlar microorganismos patógenos y otros peligros durante su proceso de elaboración, ya que, se afirma que los preparados a base de MM son productos inocuos (Camacho et al., 2018). Sin embargo, se han realizado muy pocas investigaciones extendidas con un enfoque específico en el aspecto del análisis de biodinámicas y la inocuidad de los preparados probióticos de MM. Investigaciones relacionadas a medios fermentados de consumo animal sugieren que la producción de ácidos orgánicos disminuye el pH del medio en gran medida, esto funciona como barrera de control frente a diversos patógenos (Muck, 2010). Se sugiere una relación antagónica entre los microorganismos fermentativos como las bacterias ácido lácticas (BAL), bacterias acéticas (BAA), hongos y levaduras (HyL), frente a microorganismos entéricos, describiendo un comportamiento disminuido de estas últimas, mientras las bacterias fermentativas se encuentran en crecimiento activo y dinámico. También se ha propuesto que, estos líquidos fermentados, debido a su alta acidez, inhiben la actividad de patógenos. Además, estos preparados, tienen un efecto sobre el tracto digestivo del receptor, protegiéndolo de actividad de patógenos como *Salmonella spp.* (Am Missotten et al., 2015; Plumed-Ferrer y Wright, 2009).

El alcance de este estudio va asociado a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) hambre cero, producción y consumo responsables, acción por el clima y vida de ecosistemas terrestres, desde un enfoque integral de producción de alimentos, inocuidad alimentaria y sostenibilidad en sistemas resilientes. Además, asegurar la inocuidad de los activados probióticos de MM puede aumentar la confianza en estas técnicas que, forman parte de la agricultura orgánica, abriendo las puertas a la integración a mayor escala de estos activados probióticos en el ámbito productivo. Los resultados van dirigidos a los productores interesados en integrar activados probióticos a sus tratamientos productivos y personas adeptas a las prácticas naturalistas y orgánicas que consumen este tipo de

preparados. Ambas poblaciones tienen en común que buscan activados probióticos inocuos, libres de peligros para la salud tanto de animales y personas. Las contribuciones de este estudio van desde cimentar las bases de confianza en un los activados probióticos de MM y como su dinámica influye en el control/inactivación de microorganismos patógenos, hasta profundizar la investigación en un tema de reciente introducción al ámbito científico.

Al tratarse de poblaciones microbianas benéficas que son características de locaciones específicas, los resultados de este estudio únicamente son aplicables para activados probióticos elaborados con MM provenientes de bosques del corredor seco característicos de la región centroamericana del triángulo norte. Sin embargo, los resultados de esta investigación pueden ser extrapolados a preparados probióticos con dinámicas y características microbianas similares, elaborados bajo parámetros similares y bajo el mismo principio de fermentación de los MM. El propósito de este estudio consistió en estudiar la biodinámica presente entre los grupos microbianos en los activados a base de MM y determinar la sobrevivencia de *Salmonella* spp durante al proceso de confección de MM, por lo que el alcance de este estudio se basó en los siguientes objetivos:

Estudiar la biodinámica existente entre los grupos microbianos mayoritarios en el proceso de elaboración de los activados a base de MM.

Determinar y cuantificar metabolitos resultantes de procesos fermentativos de los activados a base de MM.

Estudiar la sobrevivencia de *Salmonella* spp. durante la preparación de activados a base de MM.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

El estudio se llevó a cabo en condiciones controladas en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano (LMAZ), Departamento de Agroindustria Alimentaria.

Investigación de Campo

El estudio tomó como materia prima MM recolectados en la finca agroecológica de Zamorano, la finca se ubica en el valle del Yeguaré, municipio de San Antonio de Oriente, departamento de Francisco Morazán, a 33 km al sureste de la ciudad de Tegucigalpa, Honduras. La finca se localiza en 13°59'18.00" N, 86°58'46.00" O, a 700-800 msnm. Esta región corresponde a bosques secos, la temperatura media anual es de 24°C. La precipitación promedio anual supera los 2000 mm por año (Fortín, 2018).

Para la recolección de materia prima de MM se utilizó la metodología de Castro (2014), dentro de la finca agroecológica de Zamorano se identificaron puntos protegidos del sol y con abundante humedad dentro de las zonas boscosas protegidas aledañas. Dichas zonas fueron elegidas con el criterio de nulo impacto antropológico. Una vez identificados los puntos de recolección, se sacó la primera capa de hojas (2 cm) y se recolectó la segunda capa que contiene muchos microorganismos silvestres.

Proceso de Elaboración de los Activados a Base de MM

La metodología se desarrolló de acuerdo a lo descrito por Castro y González (2021). En estos estudios indican un mejor desenvolvimiento en el tratamiento de aireación pasiva, debido a que se registraron recuentos de microorganismos superiores con respecto a los demás tratamientos y un descenso más lento del pH, por lo que, se replicó el método de aireación pasiva.

El método de Castro (2014) establece las cantidades recomendadas de cada componente para la elaboración de los activados sólidos. Se mezcló un inóculo de 100 gramos de material de MM

recolectado, 50 gramos de semolina de arroz, 4.75 mililitros de melaza y 25 mililitros de agua. Por otra parte, la metodología de Castro y González (2021) indica las proporciones adecuadas de cada componente para la preparación de los activados líquidos. La dosis del inóculo proveniente de la fase de activación sólida es de 40 gramos por litro de agua, mientras que la dosis de melaza recomendada es de 19 mililitros por cada litro de agua.

Se utilizó como parámetro de tiempo de fermentación el concepto de los días de activación (DDA). Estos indican los días de fermentación necesarios para la confección de los activados a base de MM, siendo 30 DDA para activados sólidos y 12 DDA para activados líquidos (Castro y González, 2021).

Procedimiento de Activaciones Para Estudio de Biodinámica Entre Consorcios Microbianos

Evaluación de Poblaciones Microbianas en Activados a Base de MM.

Para esta fase del estudio se utilizaron como inóculos activados a base de MM en fase sólida a 30 DDA. A partir de esto, se realizaron secuenciaciones de activaciones líquidas, las cuales, se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales durante el proceso de fermentación.

Se tomaron 40 gramos como inóculo de los activado sólido a 30 DDA para la primera activación líquida, esto se colocó dentro de una bolsa de gasa confeccionada para este estudio y se sumergió en una solución de agua con melaza, utilizando 19 mL de melaza por litro de agua. Luego de concluidos 12 días de activación (DDA) siendo estos los días de fermentación que toma el proceso de activación de preparados líquidos, la bolsa con el inóculo sumergida en el medio acuoso del primer activado líquido fue trasladada a un nuevo contenedor con la misma solución acuosa de agua y melaza, convirtiéndose en el inculó del segundo activado líquido tal como lo indica la metodología de secuenciación de COMSA S.A de C.V (2019). Se siguió este mismo proceso hasta concluirlo en el quinto activado liquido de MM para evaluar si existen diferencias significativas entre las poblaciones microbianas con cada fase de activación , ya que, según Castro y González (2021) aún no se establece un parámetro de cuantas activaciones líquidas puede llegar a soportar un inóculo de activado sólido sin que las poblaciones microbianas sufran reducciones significativas (Figura 1).

Para el muestro de microbiológico de los inóculos de activados sólidos a 30 DDA, se pesaron 10 g de muestra y se añadieron 90 ml de buffer de fosfatos, luego se homogenizo utilizando Stomacher durante dos minutos para obtener una dilución 10^{-1} , a partir de esta, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . En el caso de los activados líquidos, transcurridos 6 DDA y 12 DDA se tomó 1.0 mL de la muestra y se añadieron 9.0 mL de buffer de fosfatos para obtener una dilución 10^{-1} y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} , en el caso de la dilución 10^0 se sembró directamente de la muestra.

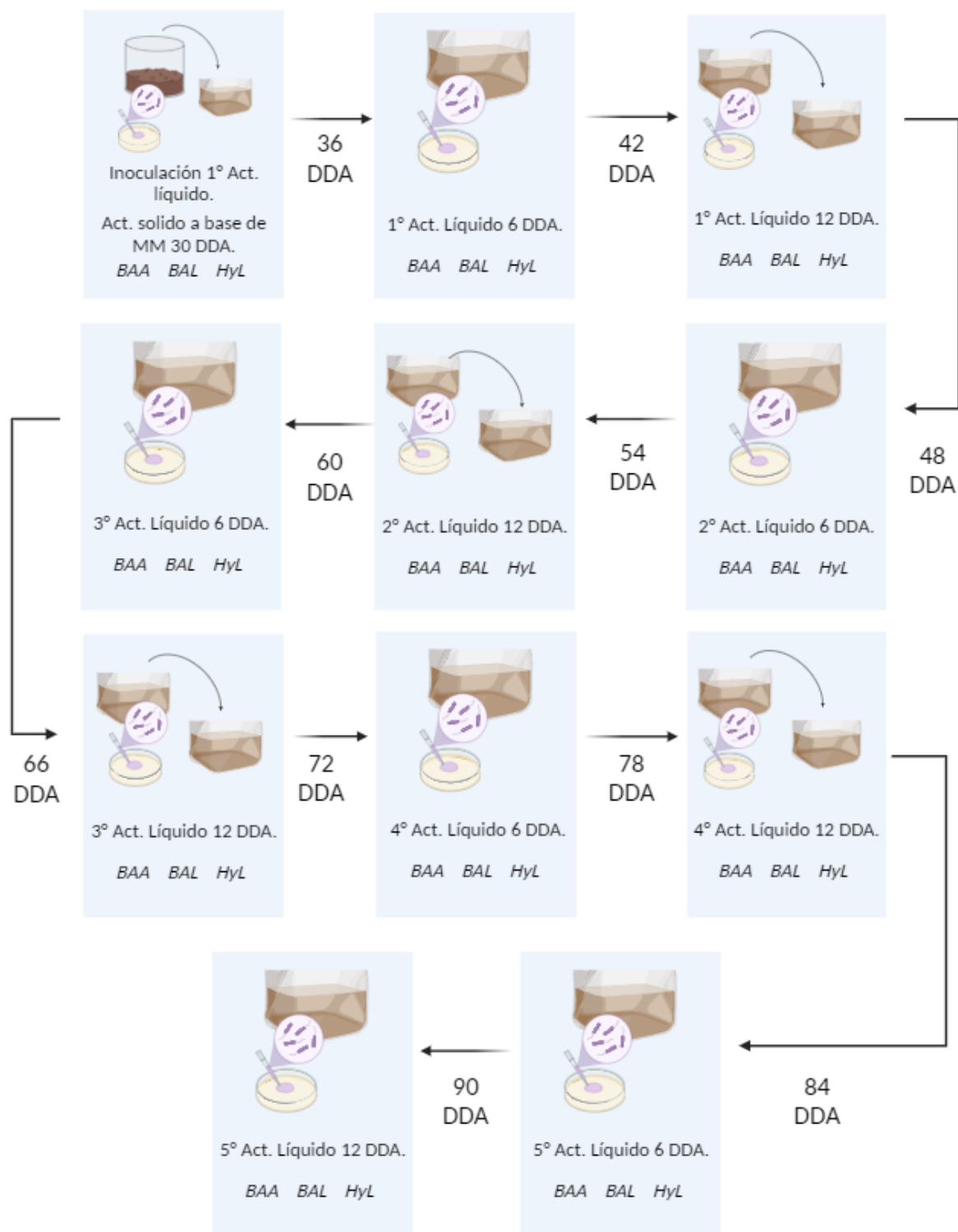
Se realizaron estos muestreos para bacterias ácido-acéticas (BAA), bacterias ácido-lácticas (BAL), hongos y levaduras (HyL) en los activados sólidos a 30 DDA y en cada uno de los activados líquidos a 6 DDA y 12 DDA. Para BAL se utilizó agar M.R.S el cual es un medio selectivo para BAL, el cual debe ser incubado a 33-37 °C durante 24-72 horas en condiciones anaeróbicas, para ello se utilizó un contenedor de anaerobiosis GasPak EZ (Laboratorios Britania S. A., 2021a). Para BAA se utilizó agar Acetobacter (Manitol) el cual es un medio para BAA, el cual debe ser incubado a 33-37 °C durante 24-48 horas (HIMEDIA, 2015), para favorecer el crecimiento de BAA y obtener recuentos microbiológicos se ajustó el pH del medio a 5.8 ± 0.2 y se incubó bajo condiciones aerobias, las cuales limitan el crecimiento de BAL y HyL en este tipo de medios de cultivo, siendo posible utilizarlos para la obtención de recuentos de BAA (Du Toit y Lambrechts, 2002). Por último, para HyL se utilizó agar rosa bengala con cloranfenicol el cual es un medio selectivo para HyL, el cual debe ser incubado a 25-30 °C durante 5-7 días (Laboratorios Conda, 2021). Todos los conteos se hicieron por la metodología de extendido en superficie.

Adicionalmente se llevó control de condiciones de fermentación de proceso diariamente durante todo el proceso de activación. Se utilizó el potenciómetro Orion 5-Star plus para la medición de pH en activados sólidos y líquidos, además, se utilizó una sonda para la medición de temperatura de las masas fermentables. También, se evaluó el cambio de color en la primera activación líquida en

los días 0, 6 y 12 de activación, donde se utilizó el equipo Colorflex para la obtención de coordenadas en valores L, a y b para evaluar cambios significativos en el color con respecto a los DDA.

Figura 1

Diagrama de Flujo experimental de elaboración de activados a base de MM y días de muestreo.



Nota. Secuenciación adaptada de COMSA S.A de C.V (2019). DDA: días de activación. MM: microorganismos de montaña. BAA: Bacterias ácido-acéticas. BAL: Bacterias ácido-lácticas. HyL: hongos y levaduras.

Determinación y Cuantificación de Ácidos Orgánicos

Se realizó el procedimiento de determinación y cuantificación de ácidos orgánicos en cada una de las fases de activación líquida en los días 6 y 12 de activación, con el objetivo de observar la dinámica de las poblaciones con respecto a las cantidades de ácidos orgánicos producidos en cada fase de activación líquida. Se utilizó la metodología propuesta por Simal-Lozano (1990) como base para determinar las condiciones de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se obtuvieron los cromatogramas donde se identificaron los ácidos orgánicos por medio de sus tiempos de elusión en los activados líquidos a base de MM, los cuales corresponden a los diferentes tiempos en que las moléculas de ácidos orgánicos son detectadas en el proceso de determinación.

Con este objetivo se utilizó el equipo de cromatografía líquida (HPLC) Agilent 1100 Series, con un detector DAD-UV G1315B a 244nm y una columna de fase reversa PL1512-5500 de 5 μ m 250 $\times$ 4.6 mm. La fase móvil consistió en agua destilada de grado HPLC con ácido sulfúrico al 0.2 de normalidad (Cuadro 1).

Se realizaron estándares de ácidos orgánicos para identificar los tiempos de elusión de los ácidos orgánicos, estos consisten en diluciones de eluyente con ácido acético (30 mg/10ml) y ácido propiónico (50 mg/10ml), además, se realizaron curvas estándar para cuantificar cada ácido orgánico. Para la elaboración de estos estándares se tomó en cuenta la pureza de cada estándar comercial.

Las muestras de activados líquidos se centrifugaron 6000 rpm con el objetivo de sedimentar los sólidos suspendidos en la solución, luego el sobrenadante pasó por un proceso de destilación en un rotavapor a una temperatura de 50°C y 10 mPa por 20 minutos, con el objetivo de extraer los ácidos de la solución madre de activados líquidos a base de MM. Posteriormente se filtró en acrodiscos (poro de 0.22 μ m) y se introdujo en los viales de muestra para HPLC.

Cuadro 1

Condiciones de operación en cromatografía líquida de alta presión para determinación de ácidos orgánicos.

Módulos	Parámetros
Eluyente	Agua destilada de grado HPLC con ácido sulfúrico (0.2 de normalidad)
Columna	PL1512-5500 5 µm 250 × 4.6 mm Temperatura 45°C
Detector (DAD G1315B)	244nm
Flujo	0.4 ml/min
Duración del método	50 min
Volumen de inyección	20.0 µL (microlitros)
Patrones	Ácido acético Ácido propiónico

Determinación y Cuantificación de Etanol

Se realizó el procedimiento de determinación y cuantificación de porcentaje de volumen de etanol en cada una de las fases de activación líquida en los días 6 y 12 de activación, con el objetivo de observar la dinámica de las poblaciones con respecto a los porcentajes de etanol presentes en cada fase de activación líquida.

La cuantificación de etanol se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890 Series GC System, con software GC ChemStation 2010, utilizando el método 984.14 de la AOAC (Cuadro 2). Se utilizó una solución de propanol al 5% con la cual se elaboró una curva estándar de diferentes concentraciones, utilizando una relación de 1:1 de solución de etanol y solución de propanol al 5%. Las concentraciones de las soluciones de etanol para la curva estándar fueron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1%. Para la elaboración de cada muestra, se trabajó de igual manera, en una relación muestra y n-Propanol al 5% (1:1).

Cuadro 2

Condiciones de operación en cromatografía de gases para determinar etanol.

Módulos	Parámetros
Gases	Hidrógeno
Columna	SP - 30 m × 0.320 mm × 0.25 µm
Horno	Temperatura inicial 55°C, tiempo 3 min Temperatura final 120°C, tiempo 2 min Velocidad de calentamiento 20°C/min
Detector (FID)	Temperatura 250°C
	Presión de aire 450 mL/min
Inyector (Split)	Presión de hidrógeno 40.0 mL/min Temperatura 175°C Split radio 80.0
	Velocidad lineal 39 cm/seg
Duración del método	8.25 min
Volumen de inyección	1.0 µL (microlitros)
Patrones	Etanol

Nota. Adaptado de AOAC 984.14

Métodos Para Análisis de Sobrevivencia de *Salmonella* spp. en Activados a Base de MM

Descripción de las Cepas y Preparación del Inóculo

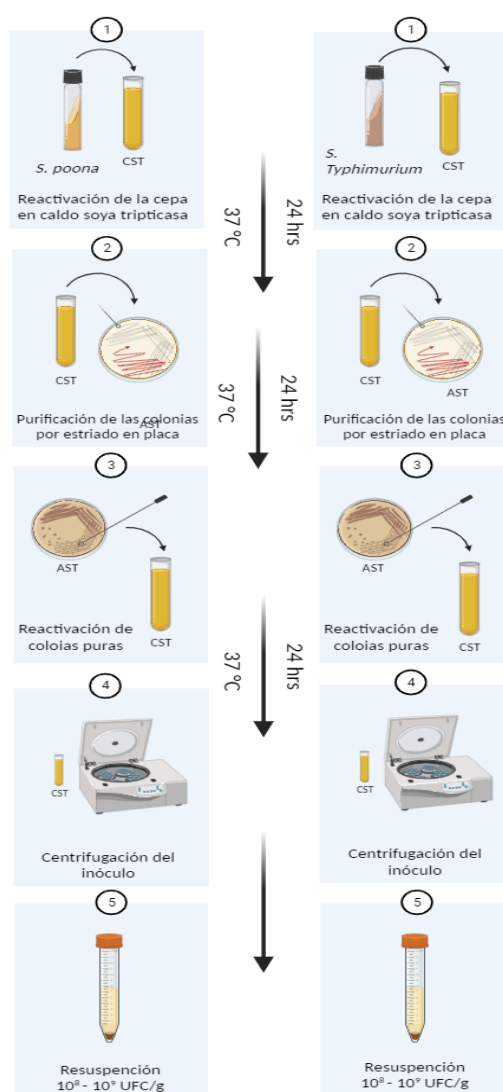
Para la preparación del inóculo se utilizaron distintas cepas de *Salmonella* spp., *Salmonella* entérica serovar Typhimurium (ATCC® 14028™) y la cepa *Salmonella* entérica Poona serovar (ATCC® BA-1673™). Estas cepas se mantuvieron bajo condiciones adecuadas de almacenamiento para evitar deterioro y contaminación.

El inóculo se preparó según la metodología de Velásquez y García (2014) (Figura 2). Cada una de las cepas se cultivó por separado en Caldo Soya Trypticase con Extracto de Levadura en tubos de ensayo, se incubó el inóculo a 37°C por 24 horas, según la recomendación para recuperar microorganismos de fácil crecimiento (Laboratorios Britania S. A., 2011). Luego se inoculó en platos Petri con Agar Soya Trypticase por medio de la técnica de estriado en placa, esto para obtener colonias aisladas del patógeno, donde la recomendación para recuperar microorganismos de fácil crecimiento es incubación a 33-37°C durante 18 a 24 horas (Laboratorios Britania S. A., 2021b). Luego se tomó una muestra de estas colonias aisladas y se colocó nuevamente en de Caldo Soya Trypticase con Extracto de Levadura en tubos de ensayo para enriquecer las colonias puras de la cepa, posterior a ello se

centrifugó a 3500 rpm para obtener un precipitado de la masa bacteriana, el cual se resuspendió. Se realizó una mezcla con ambas cepas y se inoculó en la fase sólida de activados a base de MM. Con el fin de obtener una carga bacteriana inicial de 7 logaritmos, se inoculó la mezcla del patógeno a una concentración del 1% en relación con el peso total del activado en fase sólida durante su elaboración. La muestra resultante pasó un proceso de homogenización, por medio de mezclado de la materia prima, cabe destacar que este procedimiento experimental se realizó por separado en activados sólidos diferentes a los que se utilizaron para el análisis de biodinámicas.

Figura 2

Diagrama de Flujo de elaboración de inóculo de Salmonella spp.



Nota. Adaptado de Velásquez y García (2014).

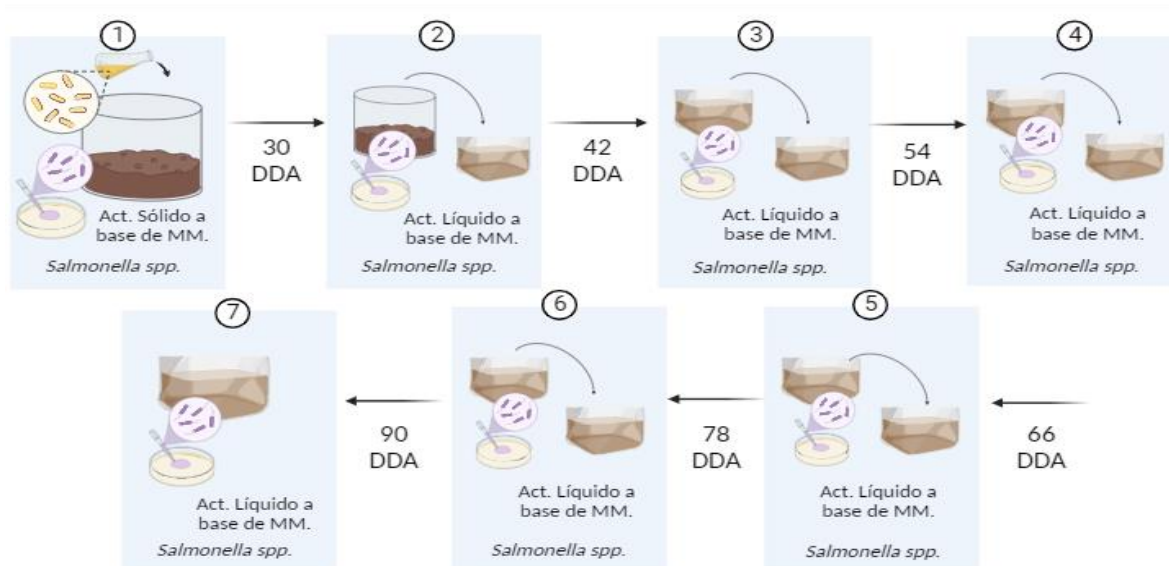
Método de Evaluación de Supervivencia de *Salmonella* spp. en los Activados a Base de MM

Se realizaron muestreos para *Salmonella* spp. en los activados sólidos en el día 0 de activación al momento de la inoculación del patógeno y en el día 30 de activación, previo a las fases de activación líquida. Posteriormente, se realizaron muestreos al final de las activaciones líquidas en el día 12 de activación.

Para el muestreo de activados sólido a 0 DDA y 30 DDA, se pesaron 10 g de muestra y se añadieron 90 mL de buffer de fosfatos, luego se homogenizó utilizando Stomacher durante un minuto para obtener una dilución 10^{-1} , a partir de esta, se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} . En el caso de los activados líquidos a 12 DDA se tomó 1.0 mL de la muestra y se añadieron 9.0 mL de buffer de fosfatos para obtener una dilución 10^{-1} y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-5} , en el caso de la dilución 10^0 se sembró directamente de la muestra. Se utilizó agar bismuto sulfito (ASB), el cual, es un medio selectivo para *Salmonella* spp. cuyas condiciones de incubación están entre 40 y 48 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (Laboratorios Conda, 2019) (Figura 3).

Figura 3

*Diagrama de Flujo experimental de elaboración de activados a base de MM y días de muestreo para supervivencia de *Salmonella* spp.*



Nota. Secuenciación adaptada de COMSA S.A de C.V (2019). DDA: días de activación. MM: microorganismos de montaña.

Método de Determinación de Salmonella spp. por Métodos Tradicionales

Una vez se alcanzó el límite de detección de la técnica para recuentos de *Salmonella* spp, se realizó una determinación por métodos tradicionales (Figura 4). Este se encuentra descrito en el procedimiento para la determinación de *Salmonella* spp. del LMAZ (LMAZ, 2022), el cual se basa en el método APHA (Salfinger y Tortorello, 2015), debido a que debe haber ausencia de este patógeno en 25 g de producto (Unión Europea, 2011). Este consta en cinco fases, la primera consistió en una etapa de preenriquecimiento, donde se tomaron 25 mL de la muestra del activado líquido de MM y fue añadida a 225 mL de Agua buffer peptonada, esta se dejó incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. La segunda fase consistió en un enriquecimiento selectivo en caldos, donde se utilizó un tubo con 10 mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis y un tubo con 10 mL de Caldo Tetrationato, se transfirieron 0.1 mL y 1.0 mL de muestra a cada tubo respectivamente. Se dejaron incubar a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

La tercera fase consistió en un aislamiento diferencial en agar, donde se tomaron muestras de los dos caldos de cultivo anteriores con un asa de inoculación estéril y se sembró por estría por Frobisher en placas Petri con agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar Hektoen (HKT) y agar sulfito bismuto (ASB). Se dejaron incubar las placas en posición invertida $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, luego se observaron las características macroscópicas de las colonias y se seleccionaron las sospechosas.

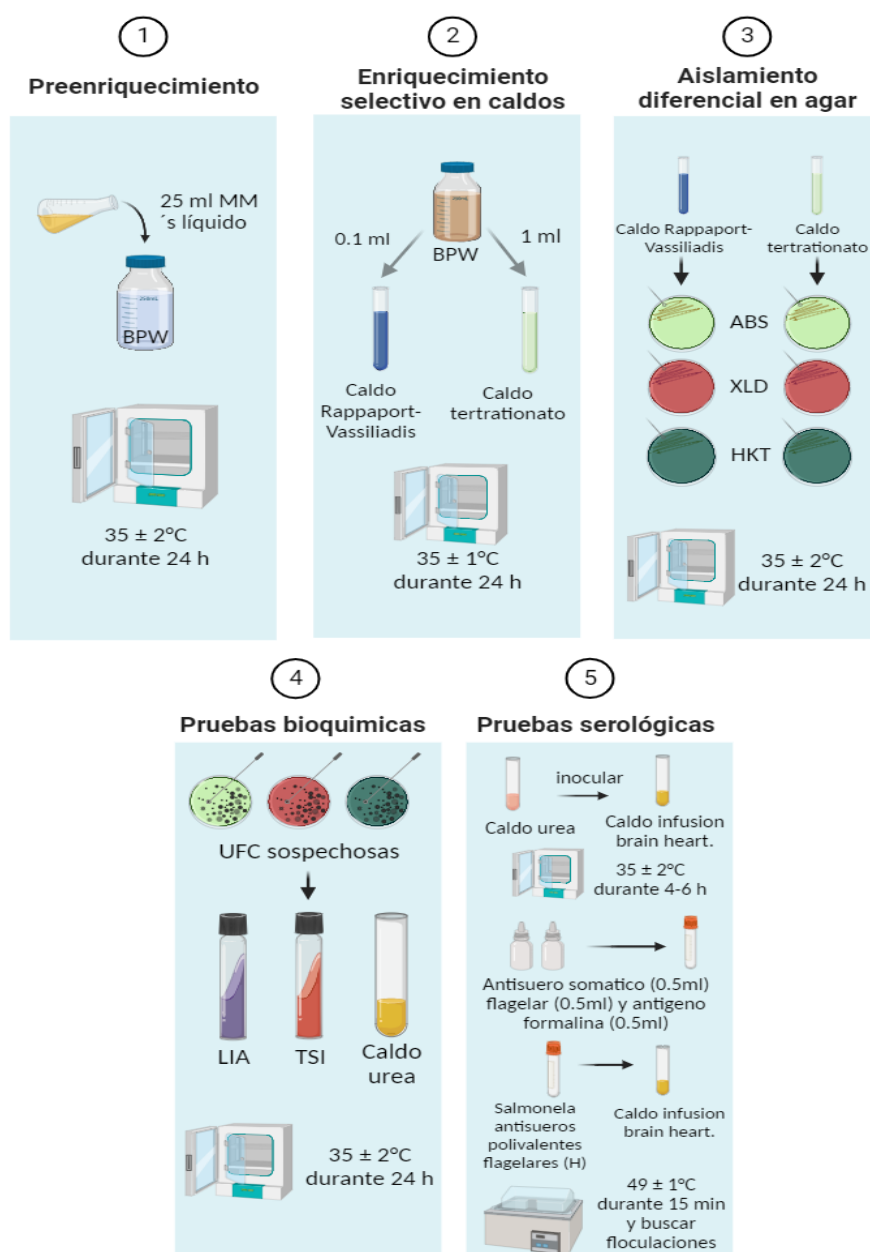
La cuarta fase fue una serie de pruebas bioquímicas, donde las colonias sospechosas fueron puestas a prueba en agar triple azúcar hierro (TSI), agar lisina Hierro (LIA) y caldo urea. Para LIA y TSI se tomaron colonias sospechosas y se sembró por picadura y estría en los tubos de agar inclinado, en el caso del caldo urea se tomaron las colonias sospechosas y se inocularon en un tubo con caldo, se preparó adicionalmente un tubo control para detectar reacciones falsas positivas para *Salmonella* spp. Se dejaron incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Finalmente, la quinta fase consistió en una prueba serológica donde se tomaron los tubos de ureasa negativa y se inocularon en caldo infusión de cerebro corazón, estos se dejaron incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 4 a 6 horas, además, se aislaron las colonias sospechosas por la técnica de Frobisher en

ACE. Se mezclaron 0.5 mL de antisuero somático, flagelar polivalente y antígeno formalina en un tubo de ensayo serológico y se probó con los cultivos anteriores, adicionalmente, se preparó una solución control mezclando 0.5 mL de solución salina fisiológica formalinizada con 0.5 mL de cultivo de prueba formalinizado, dejando incubar en baño maría entre 48-50°C. Luego de 15 minutos se buscaron floculaciones y se registraron los resultados al cabo de una hora.

Figura 4

Procedimiento para la determinación de Salmonella spp por métodos tradicionales.



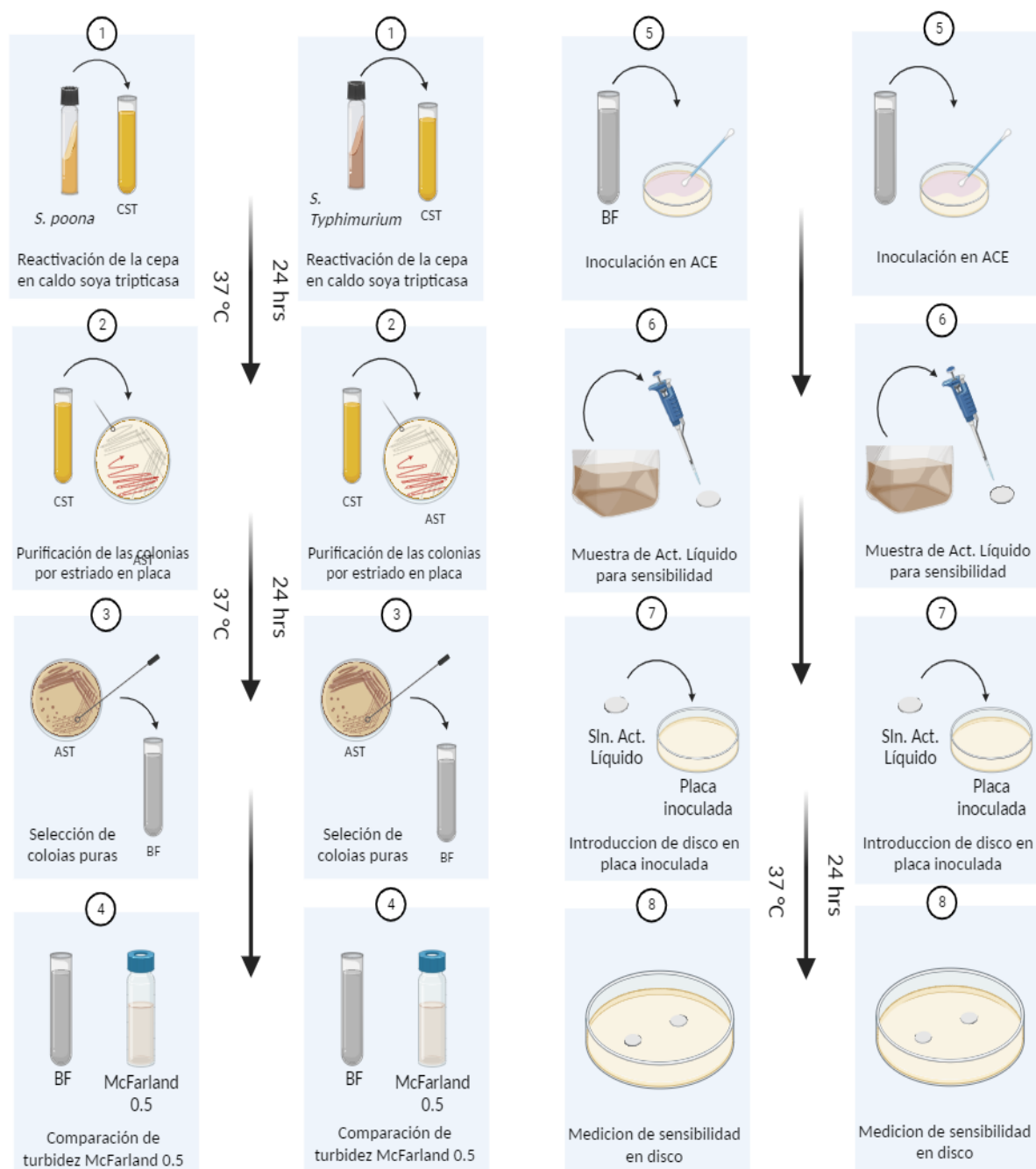
Nota. Adaptado de Salfinger y Tortorello (2015).

Pruebas de Sensibilidad en Disco Para Salmonella spp.

Se realizaron antibiogramas para evaluar la sensibilidad microbiana de *Salmonella spp.* frente a las diferentes fases de activación de los preparados a base de MM, con el objetivo de evaluar la capacidad inhibitoria de las concentraciones de metabolitos presentes en los activados líquidos (Figura 5). Para ello se realizaron 4 repeticiones por cada fase de activación a 6 y 12 DDA. Se requirió la utilización de inóculos estándar, para ello, se utilizó la escala de McFarland 0.5, la cual, corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de 1.5×10^8 células por mililitro (BD, 2005) para determinar un número de bacterias aproximado. Para ello, se resuspendieron colonias puras aisladas de *Salmonella* entérica serovar Typhimurium (ATCC® 14028™) y la cepa *Salmonella* entérica serovar Poona (ATCC® BA-1673™) en buffer de fosfatos y se llevó al nivel de turbidez del estándar de la escala de McFarland 0.5. Luego, se realizó la técnica de Kirby-Bauer, donde se extendió el inóculo de cada cepa separada sobre la superficie de placas distintas con ACE y se colocaron discos de papel filtro Whatman grado 1 estéril con 10 µl de la solución de activados a base de MM por cada fase de activación.

Figura 5

Procedimiento para análisis de sensibilidad de disco para Salmonella spp.



Nota. Procedimiento realizado para cada una de las fases de activación líquida a 6 DDA y 12 DDA.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para la realización de cinco etapas experimentales.

Para la etapa de evaluación de poblaciones microbianas de BAA, BAL y HyL en activados a base de MM se tomaron los días 6 y 12 de activación de las 5 fases de activación líquida. Con un total de 40 unidades experimentales (UE). En el caso de la etapa de determinación y cuantificación de ácidos orgánicos y etanol, donde únicamente se evaluaron las fases líquidas de activación a 6 y 12 días de activación (DDA) con un total de 40 UE. En ambos casos se consideraron las fases de activación en cada día de activación como tratamientos, siendo un total de 10 tratamientos compuestos por la fase de activación y el día de activación DDA (Cuadro 3).

Para la etapa de análisis de pruebas de sensibilidad en disco por la técnica de Kirby-Bauer, se evaluaron las fases líquidas de activación a 6 y 12 DDA utilizando los mismos tratamientos de las etapas experimentales anteriores. Se llevaron a cabo cuatro repeticiones, siendo así, un total de 40 unidades experimentales (Cuadro 3).

Cuadro 3

Descripción de tratamientos para análisis de biodinámica en activados líquidos a base de MM.

Tratamiento	Descripción
Activado liquido 1 a 36 DDA	Primera fase de activación líquida a 6 días de activación
Activado liquido 1 a 42 DDA	Primera fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado liquido 2 a 48 DDA	Segunda fase de activación líquida a 6 días de activación
Activado liquido 2 a 54 DDA	Segunda fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado liquido 3 a 60 DDA	Tercera fase de activación líquida a 6 días de activación
Activado liquido 3 a 66 DDA	Tercera fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado liquido 4 a 72 DDA	Cuarta fase de activación líquida a 6 días de activación
Activado liquido 4 a 78 DDA	Cuarta fase de activación líquida a 12 días de activación

Tratamiento	Descripción
Activado líquido 5 a 84 DDA	Quinta fase de activación líquida a 6 días de activación
Activado líquido 5 a 90 DDA	Quinta fase de activación líquida a 12 días de activación

Nota. Tratamientos realizados para las cuatro repeticiones de las etapas de evaluación de poblaciones microbianas, determinación y cuantificación de ácidos orgánicos y etanol y prueba de sensibilidad en disco para *Salmonella spp.*

Por otra parte, para la etapa de análisis de sobrevivencia de *Salmonella spp.* se tomaron los días 0 y 30 de activación de la fase sólida y el día 12 de activación de las 5 fases, se realizaron cuatro repeticiones siendo un total de 28 UE. Se consideraron las fases de activación en cada día de activación como tratamientos, siendo un total de 7 tratamientos compuestos por la fase de activación y el día de activación DDA (Cuadro 4).

Cuadro 4

Descripción de tratamientos para análisis de sobrevivencia de Salmonella spp. en activados a base de MM.

Tratamiento	Descripción
Activado sólido 1 a 0 DDA	Primera fase de activación sólida a 0 días de activación
Activado sólido 1 a 30 DDA	Primera fase de activación sólida a 30 días de activación
Activado líquido 1 a 42 DDA	Primera fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado líquido 2 a 54 DDA	Segunda fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado líquido 3 a 66 DDA	Tercera fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado líquido 4 a 78 DDA	Cuarta fase de activación líquida a 12 días de activación
Activado líquido 5 a 90 DDA	Quinta fase de activación líquida a 12 días de activación

Nota. Tratamientos realizados para las 4 repeticiones de la etapa de evaluación de sobrevivencia de *Salmonella spp.* en activados a base de MM.

Por último, para la etapa de evaluación de color, donde se tomaron los días 0, 6 y 12 de activación de una fase líquida, se llevaron a cabo 4 repeticiones con 3 medidas repetidas en el tiempo, siendo así, un total de 12 UE.

Se realizaron separaciones de medias con la prueba DUNCAN para evaluar diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de cada grupo microbiano, concentraciones de metabolitos, carga microbiana de *Salmonella spp.* y variaciones de color a diferentes días de activación (DDA). Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las cargas microbianas de los consorcios microbianos en los activados líquidos a base de MM y los metabolitos producidos durante los procesos fermentativos para evaluar si existe correlación entre estos. Se analizó con una significancia de 95% ($P \leq 0.05$) y se utilizó el paquete de análisis estadístico “Statistical Analysis Software” (SAS®).

Resultados y Discusión

Biodinámica de los Activados a Base de MM

pH de los Activados a Base de MM

El comportamiento del pH de los activados a base de MM sirvió como indicador del proceso de fermentación, considerando los diferentes tiempos de fermentación asignados a los activados sólidos y a los activados líquidos. El pH se mantuvo en valores por encima de 4 en los activados sólidos, sin embargo, en los activados líquidos los valores de pH estuvieron por debajo de 4 (Figura 6).

Durante los primeros 30 (días de activación) DDA correspondientes a la primera activación sólida se registraron valores de pH al inicio y al final de la activación de 5.41 ± 0.19 y 6.57 ± 0.15 respectivamente, donde los valores mínimos de pH encontrados entre los 12 y 17 DDA estuvieron entre 5.32 ± 0.24 y 5.54 ± 0.67 . Por otra parte, durante los 31 DDA y 42 DDA correspondientes a la primera activación líquida los valores de pH observados al inicio y al final de la activación fueron de 5.34 ± 0.17 y 4.44 ± 0.20 respectivamente, siendo los 34 DDA donde se registraron los valores de pH más bajos que estuvieron entre 3.88 ± 0.07 .

Durante la segunda activación líquida se registraron valores al inicio y al final de la activación aproximadamente de 5.26 ± 0.10 y 3.67 ± 0.41 respectivamente, siendo los 49 DDA y 51 DDA donde se registraron los valores de pH más bajos que estuvieron entre 3.49 ± 0.22 y 3.49 ± 0.19 . Durante la tercera y cuarta activación líquida se presentaron comportamientos similares a la segunda activación líquida, presentando valores de pH mínimos de 3.53 ± 0.25 para la tercera activación y 3.72 ± 0.18 para la cuarta activación. Sin embargo, estos valores lograron mantenerse estables entre 3 y 6 DDA en ambos activados líquidos, esto concuerda con los resultados obtenidos por Castro y González (2021) para activados líquidos con sistema de aireación pasiva.

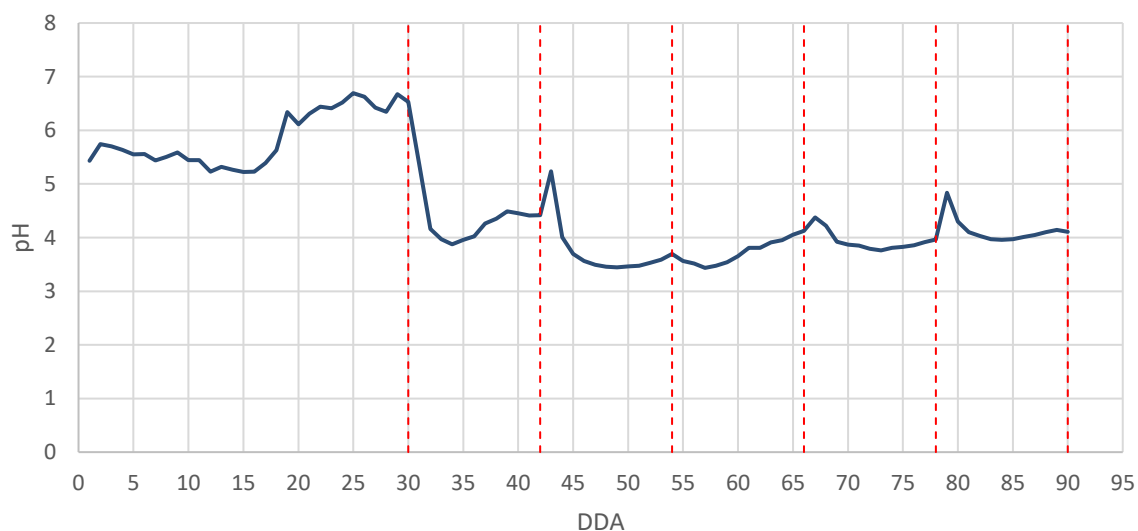
Finalmente, durante la quinta activación líquida se registraron valores al inicio y al final de la activación aproximadamente de 4.81 ± 0.13 y 4.10 ± 0.09 respectivamente, siendo valores más

estables a través del tiempo. El valor de pH más bajo registrado fue de 3.95 ± 0.15 al séptimo DDA, mostrando picos descendentes y ascendentes cada vez más lentos.

Según Barre (2003), en los activados líquidos a base de MM los valores de pH en sus primeros días de activación deben ser inferiores a 4.0, siendo el óptimo 3.5. De acuerdo con los autores, valores superiores a 4.0 pueden funcionar como indicador de defectos, daños o contaminaciones de las soluciones a base de MM, los cuales son provocados por la presencia de otros microorganismos no deseados en los activados a base de MM.

Figura 6

Gráfico de parámetro de pH durante el proceso de activación y confección de MM.



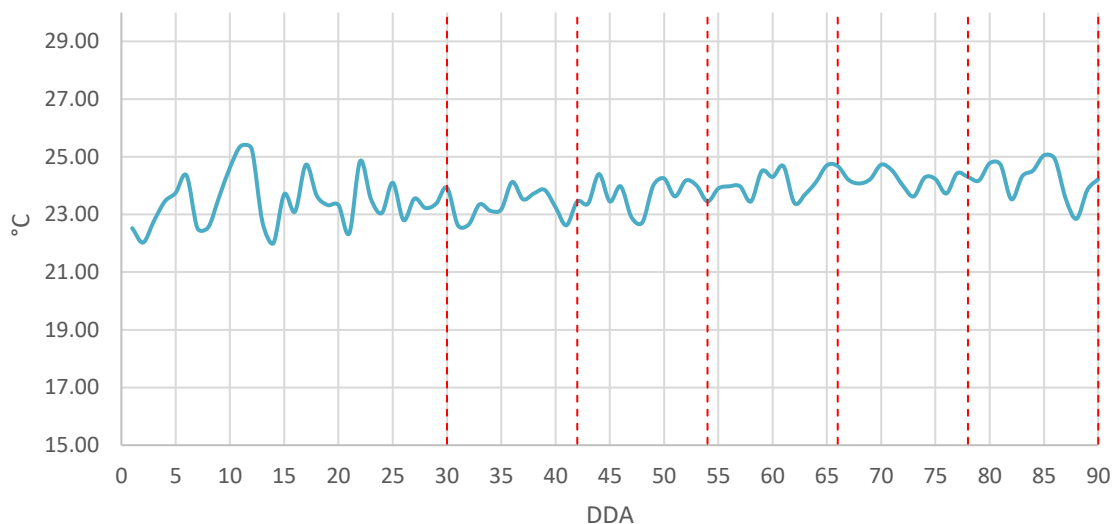
Nota. Cada medida de pH representa la media de 4 repeticiones. Valores hasta primer marcador rojo en 30 días de activación corresponden a los activados en fase sólida. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan para los valores de las cinco activaciones en fase líquida.

Temperatura de los Activados a Base de MM

El comportamiento de la temperatura de fermentación de los activados a base de MM fue similar durante todas las activaciones (Figura 7), la temperatura osciló entre valores alineados con la temperatura ambiente de almacenamiento. Esto puede deberse a que la temperatura de la masa fermentable depende hasta cierto punto de la temperatura y las condiciones ambientales donde se lleva a cabo el proceso de fermentación (Betancur y Zurita, 2020).

Figura 7

Gráfico parámetro de temperatura durante el proceso de activación y confección de MM.



Nota. Cada medida de pH representa la media de 4 repeticiones. Valores hasta primer marcador rojo en 30 días de activación corresponden a los activados en fase sólida. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan para los valores de las cinco activaciones en fase líquida. °C: temperatura en grados Celsius.

Cambios de Color en los Activados a Base de MM

Se evaluó el cambio del color de activados líquidos a base de MM a los 0 DDA, 6 DDA y 12 DDA, donde se detectaron diferencias significativas entre las coordenadas de color dentro de la escala L, a, b (Cuadro 5). Los valores del componente de luminosidad (L) y amarillo-azul (b) de los activados líquidos a 6 DDA y 12 DDA no mostraron diferencias significativas entre sí, sin embargo, fueron significativamente mayores a los valores de las componentes L y b de los activados líquidos a 0 DDA. Siendo así, los tonos pardos de los activados líquidos a 6 DDA y 12 DDA mucho más amarillentos y claros en comparación a los activados líquidos a 0 DDA. En el caso del componente rojo - verde (a) se detectaron diferencias significativas entre todos los activados líquidos a base de MM, siendo mayores a 6 DDA y 12 DDA, teniendo un tono con mayor tendencia a rojo que los activados a 0 DDA. Esto concuerda con las observaciones de Barre (2003), donde se detectaron tonos pardos mucho más

claros y amarillentos en los activados líquidos a base de MM a medida transcurrió el tiempo de fermentación.

Cuadro 5

Cambios de color a través del tiempo en activados líquidos a base de MM.

DDA	L $\pm$ D.E	a $\pm$ D.E	b $\pm$ D.E
0 DDA	13.68 $\pm$ 1.71 ^B	19.52 $\pm$ 1.35 ^C	22.89 $\pm$ 2.83 ^B
6 DDA	25.84 $\pm$ 0.60 ^A	27.98 $\pm$ 0.28 ^A	36.25 $\pm$ 1.57 ^A
12 DDA	26.4 $\pm$ 2.18 ^A	26.20 $\pm$ 0.31 ^B	41.33 $\pm$ 3.46 ^A
CV (%)	7.12	3.53	8.07
R ²	0.96	0.97	0.95
P	0.0002	0.0001	0.0009

Nota. Cada medición de coordenadas de color L, a, b representa la media de cuatro repeticiones. MM: microorganismos de montaña.

DDA: días de activación. P: probabilidad C.V.: coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: desviación estándar. R: ajuste del modelo. A-C:

letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre coordenadas a determinado día de activación.

Dinámica de Grupos Microbianos Presentes en Activados a Base de MM

Se evaluaron las poblaciones de BAA, BAL y HyL en las diferentes fases de activación líquida de MM, esto con el objetivo de describir una dinámica de las densidades poblacionales de cada grupo microbiano en los activados a base de MM. Se evaluaron las cargas microbianas de cinco fases de activación líquida en 12 DDA de cada activación, donde según Castro y González (2021) estos activados han alcanzado madurez para su uso, además, se añadió un día de muestreo a 6 DDA para evaluar los cambios de las poblaciones microbianas según tiempo y fase de activación (Cuadro 6).

Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de BAA en cada fase de activación líquida de preparados a base de MM. Las densidades poblacionales de BAA a los 12 DDA en cada fase fueron mayores con respecto a los activados líquidos a los 6 DDA, los cuales, presentaron menores densidades poblacionales de BAA en cada fase de activación. Además, estas poblaciones disminuyeron conforme se realizaron más fases líquidas, disminuyendo significativamente de $8.44 \pm$

0.12 en la primera activación líquida en 12 DDA hasta 8.18 ± 0.15 en la quinta activación líquida a 12 DDA (Cuadro 6).

Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de BAL en cada fase de activación de preparados a base de MM. Las densidades poblacionales de BAL a 12 DDA en cada fase fueron menores con respecto los activados líquidos en el día 6 de activación, los cuales, presentaron mayores densidades poblacionales de BAL en cada fase de activación. Estas poblaciones se mantuvieron conforme se realizaron las fases líquidas a 6 y 12 DDA, ya que, no se presentaron diferencias significativas entre las fases en estos días de activación (Cuadro 6).

Se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones de HyL entre las fases de activación de preparados a base de MM. Las cargas microbianas mostraron un comportamiento estable entre las fases de activación, donde las densidades poblacionales a 48 DDA en la segunda fase de activación líquida presentaron una menor carga microbiana con respecto a las cargas microbianas encontradas durante la primera fase de activación líquida. Por otra parte, las demás cargas microbianas no presentaron diferencias significativas entre sí, siendo que las cargas al final de cada activado líquido en 12 DDA no presentaron diferencias significativas entre sí. Por lo tanto, las cargas microbianas de HYL se mantuvieron estables en los momentos evaluados en cada activado (Cuadro 6).

Cuadro 6

Dinámica de poblaciones microbianas en activados a base de MM.

Activación	Descripción	BAA Log (UFC/g) $\pm D.E$	BAL Log (UFC/g) $\pm D.E$	HyL Log (UFC/g) $\pm D.E$
MM Líquido 1 (6 DDA)	36 ^{to} DDA	8.11 ± 0.11^{CDY}	8.33 ± 0.13^{AX}	5.81 ± 0.12^{AZ}
MM Líquido 1 (12 DDA)	42 ^{do} DDA	8.43 ± 0.12^{AX}	8.17 ± 0.19^{ABX}	5.75 ± 0.22^{AY}
MM Líquido 2 (6 DDA)	48 ^{vo} DDA	8.02 ± 0.15^{DEY}	8.35 ± 0.12^{AX}	5.44 ± 0.27^{BZ}
MM Líquido 2 (12 DDA)	54 ^{to} DDA	8.37 ± 0.12^{ABX}	8.01 ± 0.13^{BX}	5.55 ± 0.36^{ABY}
MM Líquido 3 (6 DDA)	60 ^{mo} DDA	7.91 ± 0.13^{EY}	8.35 ± 0.14^{AX}	5.73 ± 0.16^{AZ}
MM Líquido 3 (12 DDA)	66 ^{to} DDA	8.22 ± 0.12^{BCX}	8.09 ± 0.17^{BX}	5.56 ± 0.22^{ABY}

Activación	Descripción	BAA Log (UFC/g) $\pm D.E$	BAL Log (UFC/g) $\pm D.E$	HyL Log (UFC/g) $\pm D.E$
MM Líquido 4 (6 DDA)	72 ^{do} DDA	7.92 ± 0.15^{EY}	8.34 ± 0.11^{AX}	5.72 ± 0.13^{ABZ}
MM Líquido 4 (12 DDA)	78 ^{vo} DDA	8.16 ± 0.13^{CDX}	8.07 ± 0.12^{BX}	5.60 ± 0.15^{ABZ}
MM Líquido 5 (6 DDA)	84 ^{to} DDA	7.90 ± 0.15^{EY}	8.32 ± 0.15^{AX}	5.69 ± 0.15^{ABZ}
MM Líquido 5 (12 DDA)	90 ^{mo} DDA	8.18 ± 0.15^{CDX}	8.02 ± 0.15^{BX}	5.60 ± 0.15^{ABY}
CV (%)		1.29	1.63	3.05
R^2		0.90	0.81	0.74
P		<0.0001	0.0006	0.5272

Nota. Cada medición de carga microbiana representa la media de cuatro repeticiones. MM: microorganismos de montaña. DDA: días de activación. BAA: bacterias ácido-acéticas. BAL: bacterias ácido-lácticas. HyL: hongos y levaduras. P: probabilidad C.V.: coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: desviación estándar. R: ajuste del modelo. A-E: letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cargas microbianas de un mismo grupo microbiano a diferentes días de activación. X-Z: letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cargas microbianas de BAA, BAL y HyL según día de activación.

En la Figura 8 se puede observar la dinámica de los grupos microbianos a través del tiempo y las fases de activación. Las densidades poblacionales de BAL son mayores a los 6DDA de cada activación líquida con respecto a las poblaciones de BAA, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre las poblaciones de BAL y BAA a los 12 DDA de cada activación líquida. Las densidades poblacionales de HyL se mantuvieron bastante estables durante los procesos de activación líquida. Al mismo tiempo, las poblaciones de HyL son menores a las densidades de BAL y BAA. Esto cumple con las consideraciones de las soluciones a base de MM utilizadas por Barre (2003), donde establece que las soluciones y activados a base de MM deben poseer al menos entre 3 y 4 logaritmos de BAL, HyL fermentadoras y bacterias fototróficas, además, concuerda con los resultados según Castro y González (2021) donde las cargas microbiológicas de los grupos evaluados oscilaron entre 10^6 y 10^8 , según el tiempo transcurrido desde la activación.

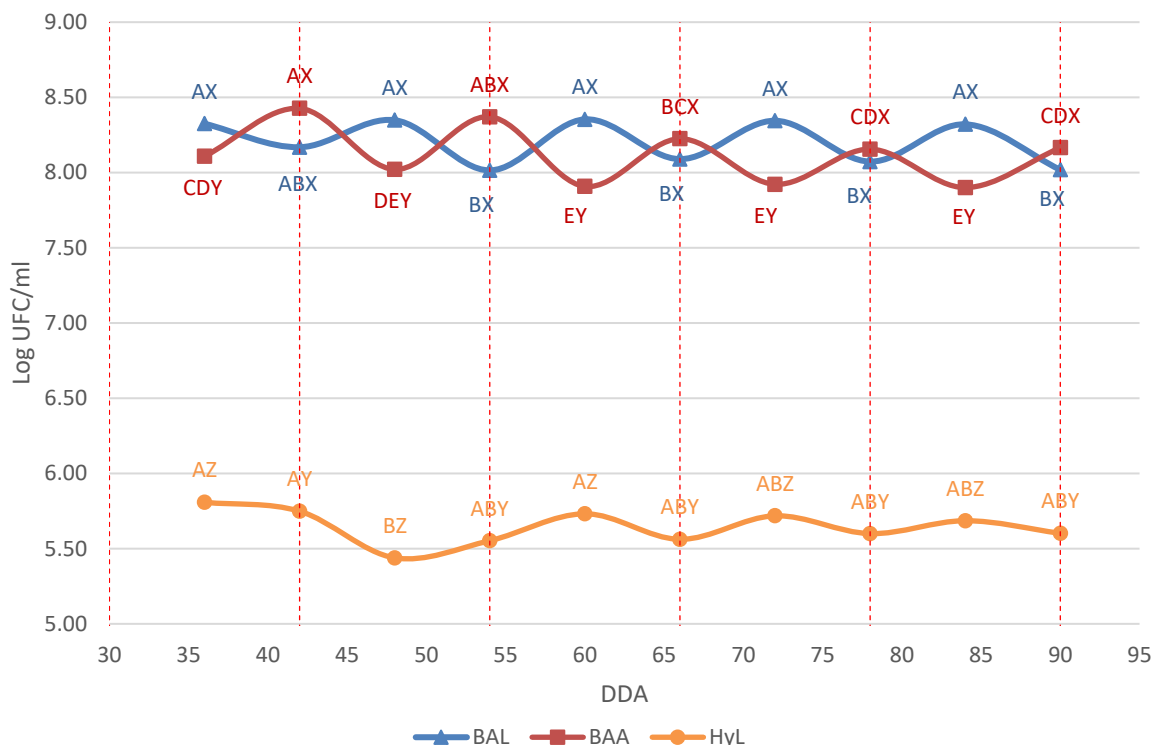
Cabe destacar, que la metodología de activaciones en secuencia aplicada supone un efecto de dilución de la carga microbiana del inóculo al momento ser trasladado a un nuevo medio líquido sin fermentar. Donde el inóculo alberga cargas microbianas de BAL y levaduras en la zona sumergida del inóculo y una alta carga microbiana de BAA en la parte superior donde se forma biopelícula. Lo que,

provoca a su vez la dilución de los metabolitos y compuestos químicos en el sustrato, esta disminución afecta el ritmo metabólico y de crecimiento de los diferentes grupos microbianos. En el caso de las levaduras, estas deben nuevamente iniciar el proceso de fermentación alcohólica a partir de los azúcares fermentables disponibles en la solución y recuperar las poblaciones perdidas por el efecto de dilución. Esto puede retrasar el ritmo metabólico y crecimiento de las BAA, debido a que se debe esperar más tiempo para que las concentraciones de etanol aumenten y realizar el proceso de acetificación. Por lo tanto, el impacto de este efecto de dilución se ve reflejado en el lento desarrollo de las BAA que logran estabilizar sus poblaciones con las BAL hasta el final del proceso de cada activación líquida, por lo que, resulta necesario el estudio de las fases más tempranas de activación líquida en 1 y 3 DDA.

Adicionalmente, el sustrato de agua y melaza utilizado no se trata de un medio estéril, ya que, diferentes microorganismos se encuentran presentes en los insumos utilizados. En este estudio se buscó recrear fielmente los procesos de activación seguidos según la metodología de secuenciación de COMSA S.A de C.V (2019), donde no se toma en cuenta la esterilización del medio acuoso de activación. En el caso de la melaza, se utilizó un mismo lote de este insumo para la realización de todas las fases de activación. Por lo general, la melaza ronda el 0.65 de actividad de agua reduciendo la actividad de microorganismos como hongos y levaduras, sin embargo, al realizar el medio acuoso de activación para MM es posible reactivar estos microorganismos, que también sufren un efecto de dilución debido a la proporción de melaza utilizada (19 mL de melaza por 1000 mL de agua).

Figura 8

Dinámica de poblaciones microbianas en activados líquidos a base de MM.



Nota. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan los valores para las cinco activaciones en fase líquida. BAA: bacterias ácido-acéticas.

BAL: bacterias ácido-lácticas. HyL: hongos y levaduras. A-E: letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cargas

microbianas de un mismo grupo microbiano a diferentes días de activación. X-Z: letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cargas microbianas de BAA, BAL y HyL según día de activación.

Además, se observó la formación de biofilm en la superficie de los reactores de contención de los activados líquidos a base de MM, donde se incrementó la densidad y el grosor del biofilm conforme transcurrieron más DDA (Figura 9). La presencia de biofilm se asocia a la multiplicación de BAA y otros grupos microbianos, este biofilm es producto de la generación de celulosa en los procesos fermentativos asociados a estos grupos microbianos (Gullo et al., 2018). Las BAA son microorganismos aerobios estrictos que forman biofilm en condiciones de estrés para la utilización eficiente de los recursos disponibles en el medio, mejorar su disponibilidad de oxígeno debido al agotamiento del oxígeno disuelto en la solución y protección ante la depredación, lo que, promueve los ambientes anaerobios dentro de las soluciones de activados líquidos por debajo del biofilm (Supanitsky, 2022).

Figura 9

Formación de biofilm a 3 DDA, 6 DDA y 12 DDA en activados líquidos a base de MM.



Nota. Imágenes tomadas de la superficie de los reactores de activados líquidos a base de MM.

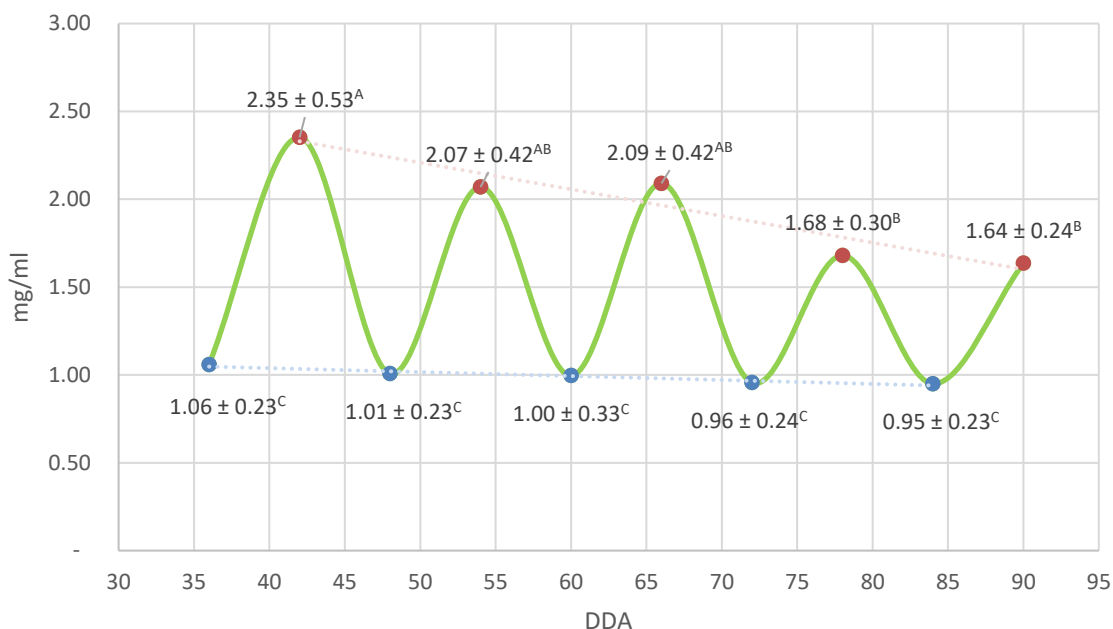
Determinación y Cuantificación de Ácidos Orgánicos por Fase de Activación.

Se evaluaron las concentraciones de ácido acético y ácido propiónico únicamente en las diferentes fases de activación líquida de MM, esto con el objetivo de describir el comportamiento de estos metabolitos asociados a algunos de los grupos microbianos en los activados a base de MM. Se evaluó la concentración de estos ácidos orgánicos en las 5 fases de activación líquida en 6 DDA y 12 DDA.

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de ácido acético en las fases de activación líquida de los preparados a base de MM (Figura 10). Las concentraciones de ácido acético en el día 12 de activación en cada fase de activación fueron mayores, siendo así, los activados líquidos en el día 6 de activación los que presentaron menores concentraciones en cada fase de activación. Las concentraciones de ácido acético a 12 DDA disminuyeron significativamente conforme se realizaron las cinco fases de activación, mientras que las concentraciones 6 DDA se mantuvieron estables durante el proceso.

Figura 10

Contenido de ácido acético según DDA en activados líquidos a base de MM.

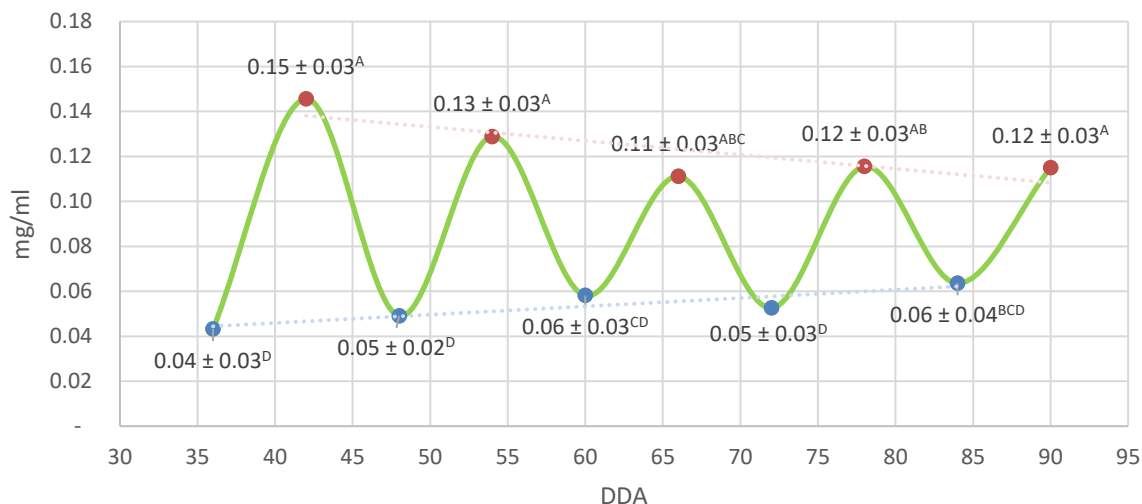


Nota. Marcadores azules indican valores a 6 días de activación. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan los valores para las cinco activaciones en fase líquida. Cada medición de concentración de ácidos orgánicos en mg/mL representa la media de cuatro repeticiones en cinco fases de activación líquida ± desviación estándar. DDA: días de activación. A-C: letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre concentraciones a determinado día de activación.

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de ácido propiónico en las fases de activación líquida de los preparados a base de MM (Figura 11). Las concentraciones de ácido propiónico en el día 12 de activación en cada fase de activación fueron mayores, siendo así, los activados líquidos en el día 6 de activación los que presentaron menores concentraciones en cada fase de activación. Las concentraciones de ácido propiónico se mantuvieron a 12 DDA conforme se realizaron las cinco activaciones líquidas, así mismo, las concentraciones de ácido propiónico a 6 DDA no presentaron diferencias significativas conforme se realizaron más fases de activación líquida.

Figura 11

Contenido de ácido propiónico según DDA en activados líquidos a base de MM.



Nota. Marcadores azules indican valores a 6 días de activación. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan los valores para las cinco activaciones en fase líquida. Cada medición de concentración de ácidos orgánicos en mg/mL representa la media de cuatro repeticiones en cinco fases de activación líquida $\pm$ desviación estándar. DDA: días de activación. A-C: letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre concentraciones a determinado día de activación.

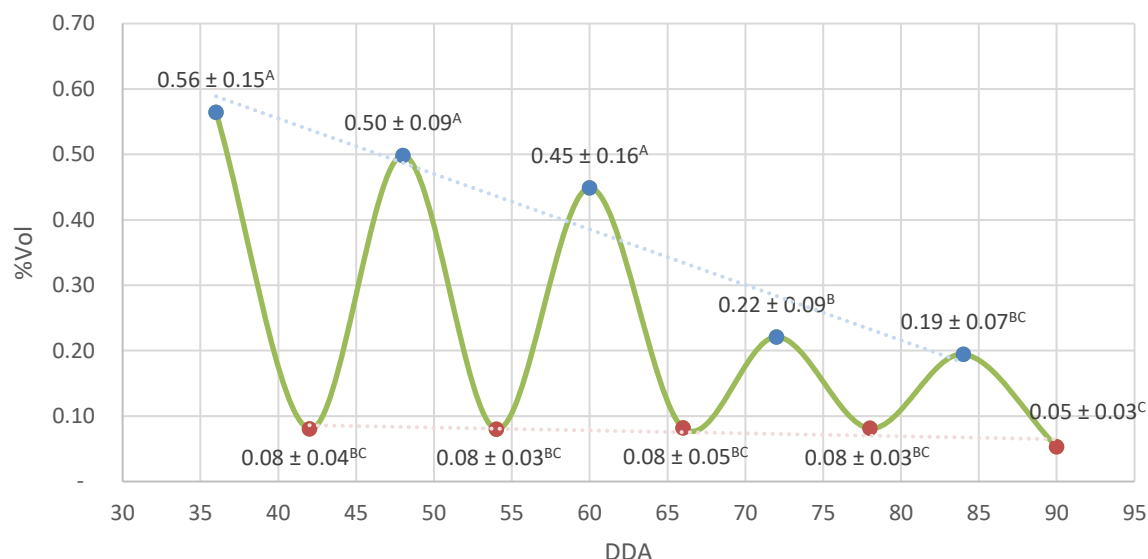
Determinación de Contenido de Etanol por Fase de Activación.

Se evaluaron los porcentajes de volumen de etanol en diferentes fases de activación de MM, esto con el objetivo de describir el comportamiento de este metabolito asociado a algunos de los grupos microbianos en los activados a base de MM. Se evaluó el porcentaje de volumen de etanol en las 5 fases de activación líquida en 6 DDA y 12 DDA de cada activación (Figura 12).

Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de volumen de etanol en las cinco fases de activación líquida de los preparados a base de MM. Los porcentajes de volumen de etanol en los activados líquidos a 12 DDA fueron menores en todos los casos con respecto a los porcentajes de volumen de etanol de los activados líquidos a 6 DDA. Estas concentraciones disminuyeron significativamente en los activados líquidos a 6 DDA conforme se realizaron las cinco fases de activación líquida, por otra parte, las concentraciones a 12 DDA no presentaron diferencias significativas.

Figura 12

Contenido de etanol expresado en %volumen según DDA en activados líquidos a base de MM.



Nota. Marcadores azules indican valores a 6 días de activación. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan los valores para las cinco activaciones en fase líquida. Cada medición de concentración de ácidos orgánicos en mg/mL representa la media de cuatro repeticiones en cinco fases de activación líquida $\pm$ desviación estándar. DDA: días de activación. A-C: letras diferentes indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre concentraciones a determinado día de activación.

Dinámica de Consorcios Microbianos y Metabolitos Presentes en Activados a Base de MM.

Durante los primeros 6 DDA de los activados líquidos a base de MM hubo correlación entre algunos grupos microbianos y metabolitos presentes en el consorcio microbiano (Cuadro 7). Las densidades poblacionales de BAL presentaron una correlación negativa media con las concentraciones de ácido acético, donde las densidades poblacionales de BAL fueron mayores cuando las concentraciones de ácido acético fueron más bajas. No se presentaron más correlaciones significativas entre el resto de los grupos microbianos y metabolitos resultantes dentro de los activados líquidos a base de MM. No obstante, el porcentaje de volumen de etanol presentó una correlación negativa media con respecto a los 6 DDA de cada fase de activación líquida, disminuyendo estos porcentajes a 6 DDA a medida se realizaron más fases de activación líquida.

Cuadro 7

Correlación de grupos microbianos con metabolitos en activados líquidos a base de MM en 6 DDA.

	Ácido acético mg/ml	Ácido propiónico mg/ml	% Volumen de etanol
BAA	-0.18242	-0.28306	0.31648
P-Value	0.4414	0.2265	0.1740
BAL	-0.65894	-0.12502	-0.23178
P-Value	0.0016	0.5995	0.3255
Hyl	-0.14291	-0.12824	-0.15997
P-Value	0.5478	0.5900	0.5005
DAA	-0.17111	0.23032	-0.78906
P-Value	0.4707	0.3286	<0.0001

Nota. DDA: días de activación. BAA: bacterias ácido-acéticas. BAL: bacterias ácido-lácticas. Hyl: hongos y levaduras. P-Value: probabilidad.

P ≤ 0.05 indican correlación entre variables.

Durante los primeros 12 DDA de los activados líquidos a base de MM hubo correlación entre algunos grupos microbianos y metabolitos presentes en el consorcio microbiano (Cuadro 8). Se presentó una correlación positiva media entre las BAA y la concentración de ácido acético, habiendo mayores cantidades de ácido acético cuando las densidades poblacionales de BAA son más altas.

Por último, las concentraciones de ácido acético presentaron una correlación negativa media con respecto a los 12 DDA de cada fase de activación líquida, disminuyendo estas concentraciones a 12 DDA a medida se realizaron más fases de activación líquida.

Cuadro 8

Correlación de grupos microbianos con metabolitos en activados líquidos a base de MM en 12 DDA.

	Ácido acético mg/ml	Ácido propiónico mg/ml	% Volumen de etanol
BAA	0.49956	0.23809	0.14513
P-Value	0.0249	0.3121	0.5415
BAL	0.11600	0.0715	0.05803
P-Value	0.6262	0.7644	0.8080
Hyl	-0.14110	0.35719	-0.36145
P-Value	0.5529	0.1221	0.1174
DAA	-0.59266	-0.28210	-0.22330
P-Value	0.0059	0.2282	0.3438

Nota. DDA: días de activación. BAA: bacterias ácido-acéticas. BAL: bacterias ácido-lácticas. Hyl: hongos y levaduras. P-Value: probabilidad.

P ≤ 0.05 indican correlación entre variables.

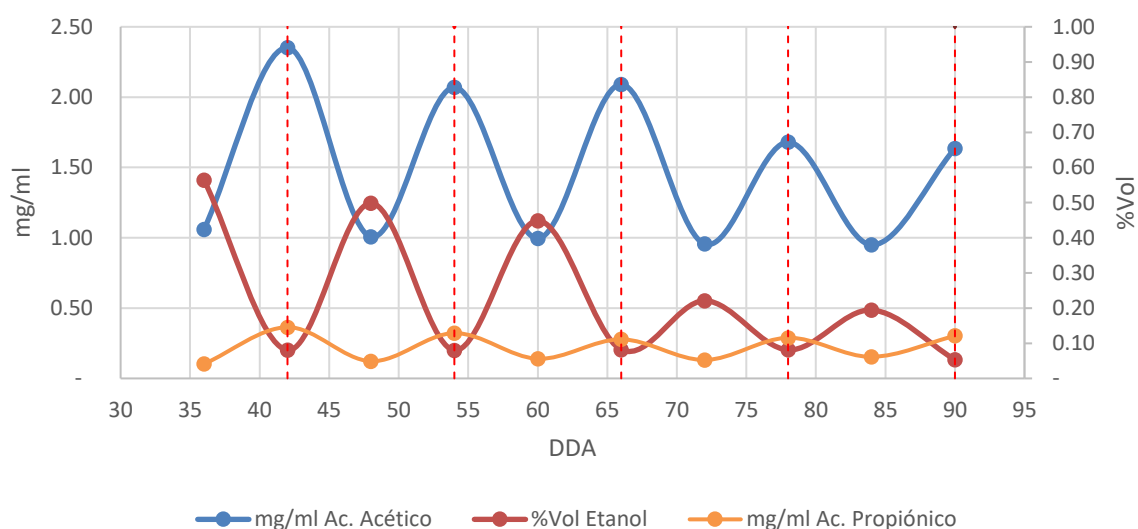
En la Figura 13 se puede observar la dinámica de los metabolitos producidos por los diferentes grupos microbianos a través del tiempo y las fases de activación. Este comportamiento indica que se llevaron a cabo procesos de acetificación por parte de las BAA durante los procesos de activación de MM, para el cual se utilizó el etanol producido por las levaduras presentes en los activados a base de MM para la producción de ácido acético, las cuales, a su vez, utilizaron los azúcares fermentables disponibles en el medio acuoso de MM para realizar un proceso de fermentación alcohólica produciendo etanol. Al disminuir la producción de etanol, también disminuye la producción de ácido acético, obteniendo concentraciones más bajas de ácido acético conforme se realizan más activaciones líquidas. Esto concuerda con el patrón de comportamiento de pH en activados a base de MM (Figura 6), donde el pH tiende a bajar mucho más rápido conforme se realizaron más activados líquidos a partir de una masa fermentada.

Cabe destacar que no se detectó ácido láctico en los activados líquidos a 6 DDA y 12 DDA en ninguna fase de activación, la fermentación ácido láctica se divide en dos tipos, la fermentación homoláctica la cual culmina en la producción casi exclusiva de ácido láctico y la fermentación heteroláctica la cual resulta en la producción menos eficiente (un mol de ATP por mol de glucosa, a diferencia de la fermentación homoláctica que produce 2 moles de ATP por mol de glucosa) de dióxido de carbono, etanol y ácido láctico en una relación 1:1:1 en presencia de azúcares fermentables disponibles y temperaturas entre 30 – 50°C (Carbonero, 1975), sin embargo, durante el proceso de activación la temperatura varió entre 22 – 25°C, lo que, afecta los procesos de fermentación ácido láctica impidiendo que estos se desarrollen correctamente y ralentizando los procesos metabólicos de las BAL. Por otra parte, las condiciones necesarias para los procesos de fermentación ácido acética incluyen temperaturas entre 25 – 30°C (Levitski, 1999). Estas condiciones son más cercanas a las observadas durante el proceso de activación, permitiendo que se desarrolle correctamente este proceso fermentativo. Por otro lado, el ácido propiónico tiende a mantener un comportamiento

mucho más estable, donde las concentraciones en los activados a 12 DDA son mayores en todos los casos a los activados a 6 DDA.

Figura 13

Dinámica de formación de metabolitos en activados a base de MM.



Nota. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan para los valores de las cinco activaciones en fase líquida.

Sobrevivencia de *Salmonella spp.* en los Activados a Base de MM

Sobrevivencia de *Salmonella spp.* en Procesos de Confección de Activados a Base de MM

Se evaluó la sobrevivencia de *Salmonella spp.* en los activados sólidos y líquidos a base de MM de manera separada al estudio de la biodinámica de consorcios microbianos (Cuadro 9). El inóculo inicial tuvo una concentración de 7.57 ± 0.32 logaritmos de *Salmonella spp.*, al final del periodo de activación del primer activado sólido la concentración de *Salmonella spp.* se redujo significativamente a 7.06 ± 0.22 logaritmos, donde ambas cargas microbianas presentaron diferencias significativas al cabo de 30 DDA. Por otra parte, la carga microbiana disminuye hasta 2.83 ± 0.56 logaritmos al final de los 12 DDA del primer activado líquido, reduciendo la población de *Salmonella spp.* mostrando diferencias significativas respecto a los resultados obtenidos durante la primera fase de activación sólida.

Durante la segunda activación líquida no se obtuvieron recuentos en placa de *Salmonella spp.*, por lo que, se realizó el proceso de determinación por métodos tradicionales (Figura 4) en la segunda activación líquida en el 54^{to}. DDA, sin embargo, el resultado fue de ausencia en 25 mL en todos los casos, indicando que la carga microbiana es menor a 0.04 células por mL. Por lo tanto, se logró un nivel de reducción de al menos 8.97 logaritmos con respecto a la carga microbiana inicial de 7.57 ± 0.32 logaritmos de *Salmonella spp.* El mismo proceso se realizó en la tercera, cuarta y quinta activación dando resultado de ausencia de *Salmonella spp.* en 25 mL de activados a base de MM en todas las repeticiones, cumpliendo con el criterio fijado por Unión Europea (2011) de ausencia de *Salmonella spp.* en el caso de este tipo de agro insumos.

Cuadro 9

Sobrevivencia de Salmonella spp. en activados a base de MM según fase de activación.

Activación	Descripción	Log (UFC/g) $\pm D.E$	Log de reducción $\pm D.E$
MM Sólido (0 DDA)	1 ^{er} DDA	7.57 ± 0.32^A	—
MM Sólido (30 DDA)	30 ^{mo} DDA	7.06 ± 0.22^B	0.51 ± 0.14^B
MM Líquido 1 (12 DDA)	42 ^{do} DDA	2.84 ± 0.56^C	4.74 ± 0.44^A
MM Líquido 2 (12 DDA)	54 ^{to} DDA	$<-1.40^*$	$> 8.97^{**}$
CV (%)		4.78	
R^2		0.99	0.99
P		<0.0001	0.0027

Nota. Cada medición de carga microbiana representa la media de cuatro repeticiones. MM: microorganismos de montaña. DDA: días de activación. P: probabilidad C.V.: coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: desviación estándar. Log de reducción: de la expresión matemática $\log(N/N_0)$ es la diferencia de logaritmos entre la carga microbiana obtenida al final de cada fase de activación y la carga microbiana inicial, indicando logaritmos de reducción en cada fase de activación según la carga inicial. A-C: letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre cargas microbianas a determinado día de activación. *Valor de logaritmo reportado para ausencia de *Salmonella spp.* en 25 mL de muestra correspondiente a 0.04 UFC/g. **Valor de reducción mínima de *Salmonella spp.* en durante el proceso de confección de activados a base de MM.

La curva de sobrevivencia de *Salmonella spp.* en activados a base de MM (Figura 14) muestra una clara tendencia a la baja a través del tiempo, sin embargo, a partir del segundo activado líquido no se obtuvieron recuentos de *Salmonella spp.* La carga microbiana de 7.57 ± 0.32 logaritmos de *Salmonella spp.* inoculada en el día 0 de activación en las fases sólidas logró controlarse y erradicarse

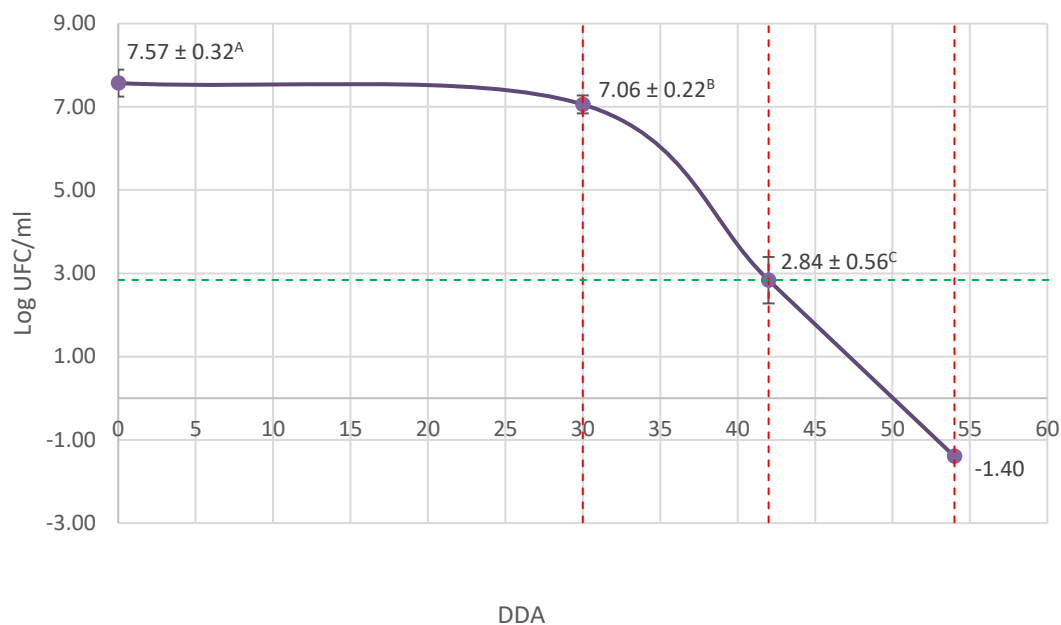
hasta llegados los 54 DDA, los cuales corresponden a los 12 DDA de la segunda fase de activación líquida. Microorganismos patógenos como *Salmonella spp.* tienden a disminuir significativamente entre cada etapa de activación, la reducción fue mayor en los activados líquidos a base de MM. No obstante, se presentó mayor sobrevivencia del patógeno en los activados sólidos, siendo así, la heterogeneidad espacial de la distribución de la materia orgánica y la ausencia de competencia directa entre consorcios microbianos factores que influyen en el mantenimiento de las poblaciones microbianas (Portell et al., 2018). Por lo tanto, las cargas microbianas de microorganismos patógenos pueden mantenerse gracias a la ubicación de los recursos y la ausencia de competencia directa en los activados sólidos a base de MM, por otra parte, el medio acuoso de los activados líquidos proporciona una distribución homogénea de los recursos y facilita la movilidad de microorganismos en el sustrato aumentando así la competencia directa entre consorcios microbianos.

Adicionalmente, las condiciones de fermentación en activados sólidos como pH (Figura 6) y temperatura (Figura 7) no resultaron hostiles para la sobrevivencia de *Salmonella spp.* en los activados sólidos a base de MM, gracias a la respuesta adaptativa del patógeno a amplios niveles de acidez y temperatura, donde los valores para de temperatura y pH para sobrevivencia se encuentran entre 5.5 – 45°C y 4 – 7.5 para pH (Lound et al., 2017). El caso contrario ocurre en el caso de los valores de pH en los activados en fase líquida, donde los valores de pH se encuentran por debajo de 4 (Figura 6), siendo este el valor mínimo para la sobrevivencia del patógeno.

Por otra parte, los microorganismos dentro del consorcio microbiano tienen un efecto en la sobrevivencia de *Salmonella spp.*, altas poblaciones de estos microorganismos crean mucha más competencia por espacio y recursos en el medio acuoso de los activados líquidos. Según Merino (2019), microorganismos como las BAL y BAA son excelentes candidatas para reducir la sobrevivencia de este patógeno, a través de competencia por los nutrientes disponibles o por la producción de compuestos antimicrobianos que provocan condiciones de estrés para *Salmonella spp* reduciendo progresivamente su desarrollo.

Figura 14

Curva de sobrevivencia de Salmonella spp. en activados a base de MM.



Nota. Valores hasta primer marcador rojo en 30 días de activación corresponden a los activados en fase sólida. Marcadores rojos ubicados cada 12 días separan a los valores para las cinco activaciones en fase líquida. Valores hasta marcador verde obtenidos a través de recuentos microbiológicos (límite de obtención de recuentos en placa). Valor en día 54 representa resultado de ausencia en procedimiento de determinación de *Salmonella spp.* a través de métodos tradicionales de -1.40 logaritmos indicando 8.97 logaritmos mínimos de reducción microbiana.

Prueba de Sensibilidad en Disco para Concentraciones de Metabolitos en Activados Líquidos a Base de MM

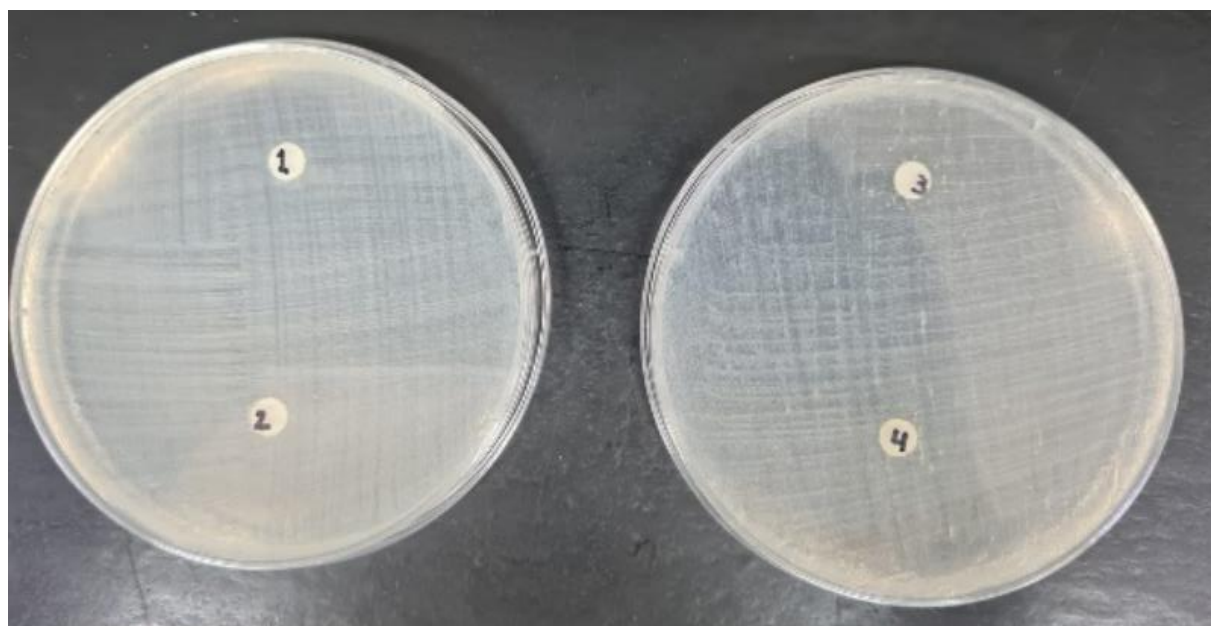
Para identificar el impacto sobre la viabilidad de *Salmonella spp.* que pueden tener los metabolitos presentes en los activados líquidos a base de MM, se realizaron antibiogramas para *Salmonella spp.* para cada una de las fases de activación de los preparados a base de MM, sin embargo, no se detectó ningún grado de sensibilidad a la solución a base de MM (Figura 15). El mismo caso se presentó en todas las fases de activación líquida, lo que, indica que el mecanismo de control no viene directamente de los metabolitos o bacteriocinas producidos a partir de los procesos fermentativos y

de crecimiento de los consorcios microbianos presentes en la solución de activados líquidos a base de MM.

Según Harris et al. (2012), concentraciones de 0.2 % a 0.6 % de ácido acético son efectivas para reducir las cargas microbianas de *Salmonella spp.*, las cuales corresponden a concentraciones de 20 mg/mL a 60 mg/ml, sin embargo, los activados líquidos a base de MM no presentaron concentraciones de ácido acético mayores a 2.35 ± 0.08 mg/mL en ninguna de las fases de activación líquida. Por otra parte, los porcentajes de volumen de etanol no superaron el $0.56 \% \pm 0.03$, siendo este patógeno capaz de tolerar porcentajes de volumen de etanol de incluso 8% (Moreno, 2020), por lo que, las concentraciones de los metabolitos detectados resultan ineficaces para la inhibición de *Salmonella spp.* Por lo tanto, los MM no deben considerarse como un funguicida o bactericida, pues son una medida biológica para suprimir o controlar patógenos, a través del incremento de la competencia y antagonismo (Asia Pacific Natural Agriculture Network, 1995).

Figura 15

Antibiogramas para Salmonella spp. en activados a base de MM.



Nota. Las concentraciones presentes en los activados líquidos a base de MM mostraron el mismo resultado en la prueba de antibiogramas por el método de Kirby-Bauer en todas las fases de activación líquida.

Conclusiones

La biodinámica de los grupos microbianos mayoritarios demostró variabilidad en las densidades poblacionales de microorganismos entre las diferentes fases de activación líquida a través del tiempo.

Los metabolitos resultantes de los procesos fermentativos demostraron variabilidad con respecto a los días y fases de activación debido a la utilización de estos en procesos metabólicos de los microorganismos, existiendo una relación simbiótica entre los componentes del consorcio microbiano.

La sobrevivencia de *Salmonella spp.* durante la preparación de activados a base de MM se ve afectada a través del tiempo, siendo así, los activados en fase líquida a base de MM capaces de controlar o suprimir contaminaciones de microorganismos patógenos como *Salmonella spp.*, a través de la competencia y antagonismo de los consorcios microbianos.

Recomendaciones

Evaluar el comportamiento de la biodinámica de los activados a base de MM en las fases más tempranas de fermentación a 1 y 3 DDA.

Realizar caracterizaciones de los grupos microbianos a nivel de especies en los activados a base de MM.

Realizar análisis comparativos de las biodinámicas de activados a base de MM al modificar y controlar la temperatura de fermentación como un parámetro condicionante de los procesos de activación.

Evaluar el efecto en la biodinámica de los activados a base de MM de diferentes sustratos como suero lácteo en la elaboración de estos preparados.

Evaluar el efecto del uso de diferentes fuentes de azúcares fermentables en las propiedades físicas, químicas y activas de los activados a base de MM.

Evaluar la sobrevivencia de otros microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* en el proceso de elaboración de activados a base de MM.

Referencias

- Am Missotten, J., Michiels, J., Degroote, J. y Smet, S. de (2015). Fermented liquid feed for pigs: An ancient technique for the future. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-6-4>
- Asia Pacific Natural Agriculture Network. (1995). *EM application manual for APNAN countries*. Japón. APNAN. <http://www.agriton.nl/apnanman.html>
- Barre, S. (2003). *Estudio nutricional comparativo de bokashis inoculados con levaduras y con Microorganismos Eficientes (EM) de primera y segunda generación a dos diferentes concentraciones en Zamorano* [Tesis de grado]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/5170>
- BD. (2005). *Patrón de turbidez preparado: McFarland Turbidity Standard No. 0.5*. Becton, Dickinson and Company. [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
- Bertelli, C., Pillonel, T., Torregrossa, A., Prod'hom, G., Fischer, C. J., Greub, G. y Giannoni, E. (2015). *Bifidobacterium longum* bacteremia in preterm infants receiving probiotics. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(6), 924–927. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu946>
- Betancur, J. y Zurita, M. (2020). *Evaluación de la fermentación controlada con inoculación de levaduras (Saccharomyces cerevisiae) y su efecto en la calidad del café (Coffea arabica)* [tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/1cf1773e-2fa6-47f3-b057-d4dd663fbae9/content>
- Camacho, F., Uribe, L., Newcomer, Q., Masters, K. y Kinyua Maureen (2018). Bio-optimización del compost con cultivos de microorganismos de montaña (MM) y lodos digeridos de biodigestor (LDBIO). *UNED Research Journal*, 10(330-341). <https://www.scielo.sa.cr/pdf/cinn/v10n2/1659-4266-cinn-10-02-330.pdf>
- Carbonero, P. (1975). *Bioquímica de las fermentaciones: [contenido de la segunda parte de un curso de bioquímica para alumnos de la especialidad de industrias agrícolas]*. Monografías de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos: Vol. 36. Universidad Politécnica.
- Castro, L. y González, J. (2021). Factores relacionados con la activación líquida de microorganismos de montaña (MM). *Agronomía Costarricense*, 45, 81–92. <https://doi.org/10.15517/RAC.V45I1.45703>
- Castro, L. (2014). *¿Cómo hacer Microorganismos de Montaña (MM)?* Costa Rica. UCR. <https://estaticos.qdq.com/swdata/files/950/950904418/Brochure-MicroCIA-VF-2017web.pdf>
- COMSA S.A de C.V. (2019). *Manual de biotecnologías orgánicas*. Honduras. COMSA S.A de C.V.
- Cóndor, A., González, P. y Lokare, c. (2007). Effective microorganisms: myth or reality? *Rev. Peru. Biol.*, 14, 315–319. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v14n2/a26v14n02>

- Du Toit, W. J. y Lambrechts, M. G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 57–64. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00715-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00715-2)
- Fortín, M. T. (2018). *Plan de desarrollo y programa de inversiones: territorio de Yeguaré*. IICA.
- Gullo, M., La China, S., Falcone, P. M. y Giudici, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6885–6898. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>
- Harris, D., Brashears, M. M., Garmyn, A. J., Brooks, J. C. y Miller, M. F. (2012). Microbiological and organoleptic characteristics of beef trim and ground beef treated with acetic acid, lactic acid, acidified sodium chlorite, or sterile water in a simulated commercial processing environment to reduce *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*. *Meat Science*, 90(3), 783–788. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.11.014>
- HIMEDIA. (2015). *Acetobacter Agar (Mannitol)*. HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M370.pdf
- Laboratorios Britania S. A. (2011). *Tripteína Soya Caldo*. Argentina. Laboratorios Britania s.a. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/613_inserto_es.pdf
- Laboratorios Britania S. A. (2021a). *M.R.S. Agar*. Laboratorios Britania s.a. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6092dd2543f1d.pdf
- Laboratorios Britania S. A. (2021b). *Tripteína Soya Agar*. Argentina. Laboratorios Britania s.a. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e7678b1e3.pdf
- Laboratorios Conda, S. A. (2019). *Agar Bismuto Sulfito (Wilson Blair) USP: Medio altamente selectivo para el aislamiento de Salmonella spp, particularmente Salmonella typhi, a partir de muestras clínicas*. Laboratorios Conda, S. A. [https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=23838#:~:text=Agar%20Bismuto%20Sulfito%20\(Wilson%20Blair\)%20es%20una%20modificaci%C3%B3n%20del%20Wilson,Salmonella%2C%20en%20particular%20Salmonella%20typhi.](https://www.condalab.com/int/es/index.php?controller=attachment&id_attachment=23838#:~:text=Agar%20Bismuto%20Sulfito%20(Wilson%20Blair)%20es%20una%20modificaci%C3%B3n%20del%20Wilson,Salmonella%2C%20en%20particular%20Salmonella%20typhi.)
- Laboratorios Conda, S. A. (2021). *Rose Bengal Agar + Chloramphenicol*. Laboratorios Conda, S. A. <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/116-12359-agar-rosa-de-bengala-cloranfenicol.html>
- Levitski, K. (1999). *Fermentación acética : estudio de las enzimas implicadas en el proceso. Inmovilización en alginato para la mejora de la producción* [, Universidad de Sevilla, Sevilla]. idus.us.es. <https://idus.us.es/handle/11441/66362>
- LMAZ. (2022). *Procedimiento para la determinación de Salmonella*. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano.
- Lound, L. H., Aleu, H. H., Broggi, L., Genaro, M. V., Tesouro, R., Favre, L. C., Plem, S. C. y Tofolón, E. A. (2017). Resistencia térmica de *Salmonella*: Efecto del pH y la actividad del agua. 2250-4559. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/33792>
- Medina-Saavedra, T., Dzul-Cauich, J., Arroyo-Figueroa, G., García-Vieyra, I., Quiñones-Páramo, M. y Mexicano-Santoyo, L. (2021). Microorganismos de montaña y ensilado de maíz como

- probióticos en la engorda de conejos. *Abanico Veterinario*, 11. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322021000100401
- Merino, L. E. (2019). *Empleo de bacterias lácticas y sus metabolitos como estrategia de biocontrol para disminuir la incidencia de cepas de Salmonella spp. formadoras de biopelículas en granjas avícolas* [Tesis doctoral, Universidad Nacional de la Plata, Argentina]. CrossRef. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/85495/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Moreno, J. (2020). *sobrevivencia de Salmonella enterica en sidras artesanales elaboradas con dos variedades de manzana en función de la levadura fermentativa* [Tesis de grado para Maestría en ciencia y tecnología de alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México]. ri-ng.uaq.mx. <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/2622>
- Muck, R. (2010). Microbiología del ensilaje y su control mediante aditivos. *Revista Brasileira De Zootecnia*, 39, 183–191. <https://www.scielo.br/pdf/rbz/v39sspe/21.pdf>
- Plumed-Ferrer, C. y Wright, A. von (2009). Fermented pig liquid feed: Nutritional, safety and regulatory aspects. *Journal of Applied Microbiology*, 106(2), 351–368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03938.x>
- Portell, X., Pot, V., Garnier, P., Otten, W. y Baveye, P. C. (2018). Microscale Heterogeneity of the Spatial Distribution of Organic Matter Can Promote Bacterial Biodiversity in Soils: Insights From Computer Simulations. *Frontiers in Microbiology*, 9, 368481. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01583>
- Restrepo, J. y Hensel, J. (2009). *Manual práctico de agricultura orgánica y panes de piedra*. Colombia. <https://reaxionatural.files.wordpress.com/2011/09/manual-practico-de-agricultura-organica-y-panes-de-piedra.pdf>
- Salfinger, Y. y Tortorello, M. L. (2015). *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods* (5ª ed.). American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/MBEF.0222>
- Simal-Lozano, J. (1990). *Identificación y cuantificación por HPLC de los ácidos orgánicos mayoritarios en frutas*. España. Universidad de Santiago de Compostela. <https://www.researchgate.net/publication/235433422>
- Supanitsky, A. (2022). *Estudio sobre formación de biofilms en bacterias del suelo* [Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Argentina]. RIS. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n7248_supanitsky.pdf
- Unión Europea (2011). *Reglamento (UE) No 142/2011 de la comisión de 25 de febrero de 2011 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano, y la Directiva 97/78/CE del Consejo en cuanto a determinadas muestras y unidades exentas de los controles veterinarios en la frontera en virtud de la misma*. (142/2011). España. Diario Oficial de la Unión Europea. <https://www.boe.es/doue/2011/054/L00001-00254.pdf>
- Velásquez, C. y García, A. (2014). *Validación del tratamiento térmico durante la elaboración de quesillo para el control de Salmonella enterica y Listeria monocytogenes*. Honduras. Escuela Agrícola

Panamericana

Zamorano.

<https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/08f82106-e34a-45c7-8870-25c34ea05c48/content>

Anexos

Anexo A

Fase de activación solida de MM 30 DDA.



Anexo B

Fase de activación líquida de MM.



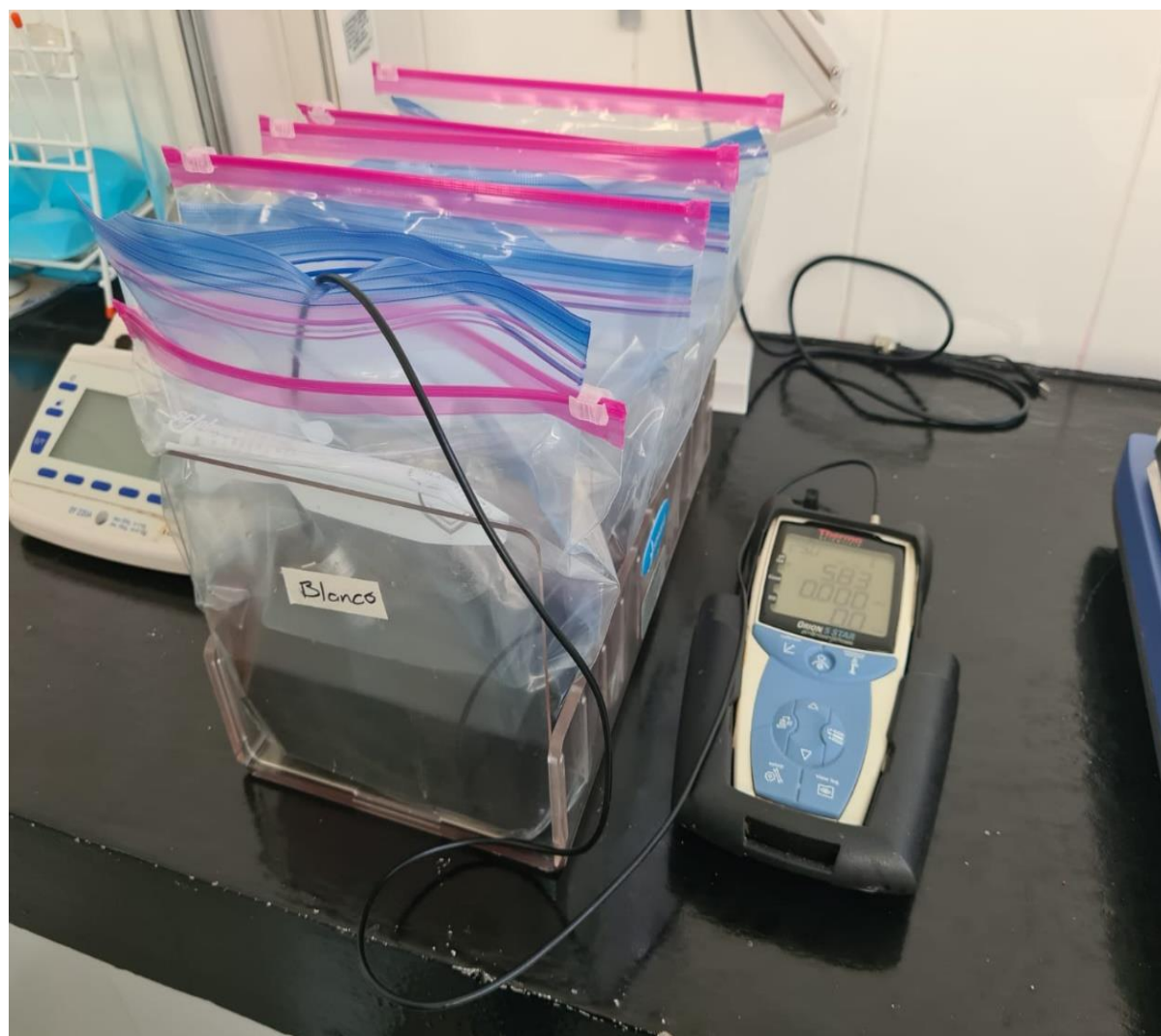
Anexo C

Montaje de activados líquidos a base de MM.



Anexo D

Medición diaria de parámetros de fermentación.



Anexo E

Destilación de ácidos orgánicos en activados líquidos a base de MM.



Anexo F

Condiciones de pH y temperatura (°C) de los activados de MM.

Activado	DDA	pH	D.E. pH	C.V pH	°C	D.E. °C	C.V °C
Activado sólido	1	5.41	0.19	3.56	22.02	2.06	9.35
	2	5.67	0.24	4.26	22.12	0.40	1.82
	3	5.65	0.22	3.82	22.88	0.59	2.59
	4	5.60	0.17	3.01	23.68	0.59	2.51
	5	5.52	0.12	2.20	23.64	1.10	4.66
	6	5.54	0.05	0.85	24.40	0.72	2.96
	7	5.38	0.25	4.68	22.74	0.51	2.26
	8	5.49	0.18	3.22	22.70	0.41	1.79
	9	5.62	0.15	2.61	24.10	1.59	6.61
	10	5.46	0.17	3.15	24.56	0.62	2.54
	11	5.44	0.14	2.52	25.56	0.77	3.00
	12	5.32	0.24	4.47	24.94	2.09	8.38
	13	5.41	0.48	8.89	22.64	0.69	3.04
	14	5.40	0.54	10.00	21.72	0.97	4.46
	15	5.34	0.42	7.91	23.78	0.58	2.44
	16	5.32	0.37	7.04	23.24	0.74	3.20
	17	5.54	0.67	12.03	24.54	1.36	5.55
	18	5.76	0.53	9.23	23.82	0.53	2.21
	19	6.36	0.11	1.68	23.52	0.86	3.64
	20	6.20	0.40	6.50	23.60	0.94	3.97
	21	6.43	0.46	7.08	22.24	0.70	3.16
	22	6.46	0.36	5.65	24.68	0.94	3.83
	23	6.46	0.38	5.91	23.76	0.68	2.88
	24	6.56	0.34	5.18	23.16	0.36	1.57
	25	6.70	0.12	1.86	24.06	0.34	1.40
	26	6.65	0.14	2.06	23.30	1.92	8.25
	27	6.48	0.24	3.66	23.60	1.09	4.63
	28	6.43	0.30	4.62	23.10	0.61	2.65
	29	6.69	0.07	0.99	23.28	1.04	4.45
1° activado líquido.	30	6.57	0.15	2.21	23.92	0.50	2.08
	31	5.34	0.17	3.22	23.08	1.89	8.19
	32	4.16	0.22	5.41	22.84	1.01	4.44
	33	3.97	0.09	2.18	23.50	1.19	5.04
	34	3.88	0.07	1.69	23.08	0.52	2.26
	35	4.03	0.24	6.05	23.00	0.83	3.61
	36	4.12	0.33	8.01	24.26	0.59	2.45
	37	4.33	0.37	8.58	23.80	0.77	3.25
	38	4.41	0.34	7.74	23.76	0.13	0.56
	39	4.52	0.37	8.10	23.82	0.75	3.13
	40	4.48	0.32	7.03	23.56	1.02	4.31
	41	4.45	0.30	6.80	23.00	1.37	5.98

Activado	DDA	pH	D.E. pH	C.V pH	°C	D.E. °C	C.V °C
2° activado líquido.	42	4.44	0.20	4.57	23.42	0.53	2.25
	43	5.26	0.10	1.84	23.36	0.11	0.49
	44	4.05	0.14	3.47	24.26	0.38	1.59
	45	3.75	0.22	5.84	23.22	0.75	3.24
	46	3.63	0.24	6.71	24.10	0.76	3.17
	47	3.56	0.24	6.76	23.24	1.34	5.76
	48	3.51	0.22	6.16	23.28	1.99	8.56
	49	3.49	0.22	6.32	23.90	0.64	2.70
	50	3.50	0.21	5.89	24.02	0.64	2.66
	51	3.49	0.19	5.57	23.76	0.70	2.94
3° activado líquido.	52	3.52	0.24	6.95	24.22	0.50	2.07
	53	3.57	0.30	8.34	24.08	0.89	3.68
	54	3.67	0.41	11.25	23.52	1.20	5.11
	55	3.55	0.21	5.94	24.06	0.48	1.98
	56	3.55	0.23	6.36	24.14	0.79	3.26
	57	3.48	0.19	5.43	24.34	1.00	4.11
	58	3.53	0.25	6.95	23.66	0.94	3.99
	59	3.59	0.28	7.90	24.50	0.25	1.04
	60	3.69	0.31	8.34	24.20	0.66	2.71
	61	3.83	0.33	8.53	24.68	1.01	4.10
4° activado líquido.	62	3.84	0.36	9.28	23.58	0.73	3.08
	63	3.92	0.26	6.69	23.94	0.82	3.41
	64	3.96	0.20	5.12	24.20	1.02	4.20
	65	4.07	0.25	6.24	24.90	0.66	2.65
	66	4.15	0.16	3.90	24.66	0.27	1.10
	67	4.41	0.16	3.70	24.34	0.84	3.44
	68	4.22	0.11	2.72	24.20	0.66	2.74
	69	3.88	0.29	7.52	24.28	0.55	2.26
	70	3.83	0.29	7.58	24.88	0.66	2.67
	71	3.80	0.31	8.03	24.54	0.11	0.46
5° activado líquido.	72	3.73	0.25	6.64	23.86	0.77	3.23
	73	3.72	0.18	4.96	23.80	0.48	2.04
	74	3.75	0.19	5.14	24.44	0.73	2.97
	75	3.79	0.15	4.00	24.10	0.60	2.51
	76	3.82	0.15	4.02	23.52	0.91	3.88
	77	3.91	0.06	1.64	24.30	0.56	2.29
	78	3.96	0.04	0.94	24.28	0.24	0.98
	79	4.81	0.13	2.68	24.28	0.41	1.71
	80	4.28	0.16	3.79	24.94	0.48	1.91
	81	4.09	0.10	2.36	24.54	1.00	4.08
	82	4.02	0.06	1.61	23.52	0.35	1.49
	83	3.97	0.04	0.98	24.36	0.30	1.22
	84	3.96	0.04	0.92	24.64	0.30	1.20
	85	3.95	0.15	3.89	25.08	0.26	1.03
	86	3.99	0.15	3.76	24.60	1.20	4.88

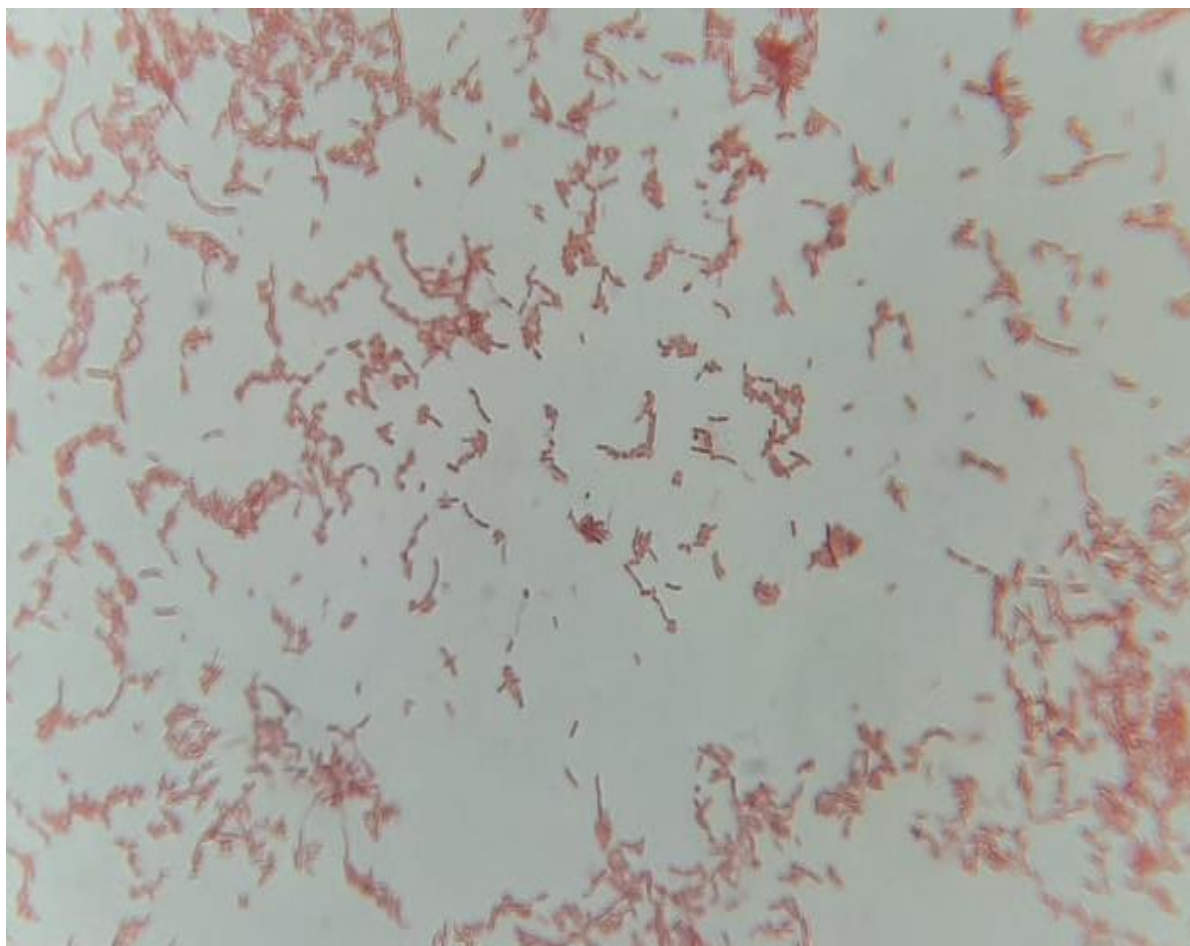
Activado	DDA	pH	D.E. pH	C.V pH	°C	D.E. °C	C.V °C
	87	4.03	0.19	4.73	23.60	0.25	1.08
	88	4.08	0.11	2.64	22.78	0.93	4.09
	89	4.12	0.11	2.67	23.84	0.58	2.42
	90	4.10	0.09	2.28	24.28	0.47	1.94

Nota. Cada medición de pH y temperatura (°C) representa la media de cuatro repeticiones. DDA: días de activación. pH: promedio de pH.

°C: promedio de temperaturas en grados Celsius. D.E.: desviación estándar. C.V.: coeficiente de variación en porcentaje.

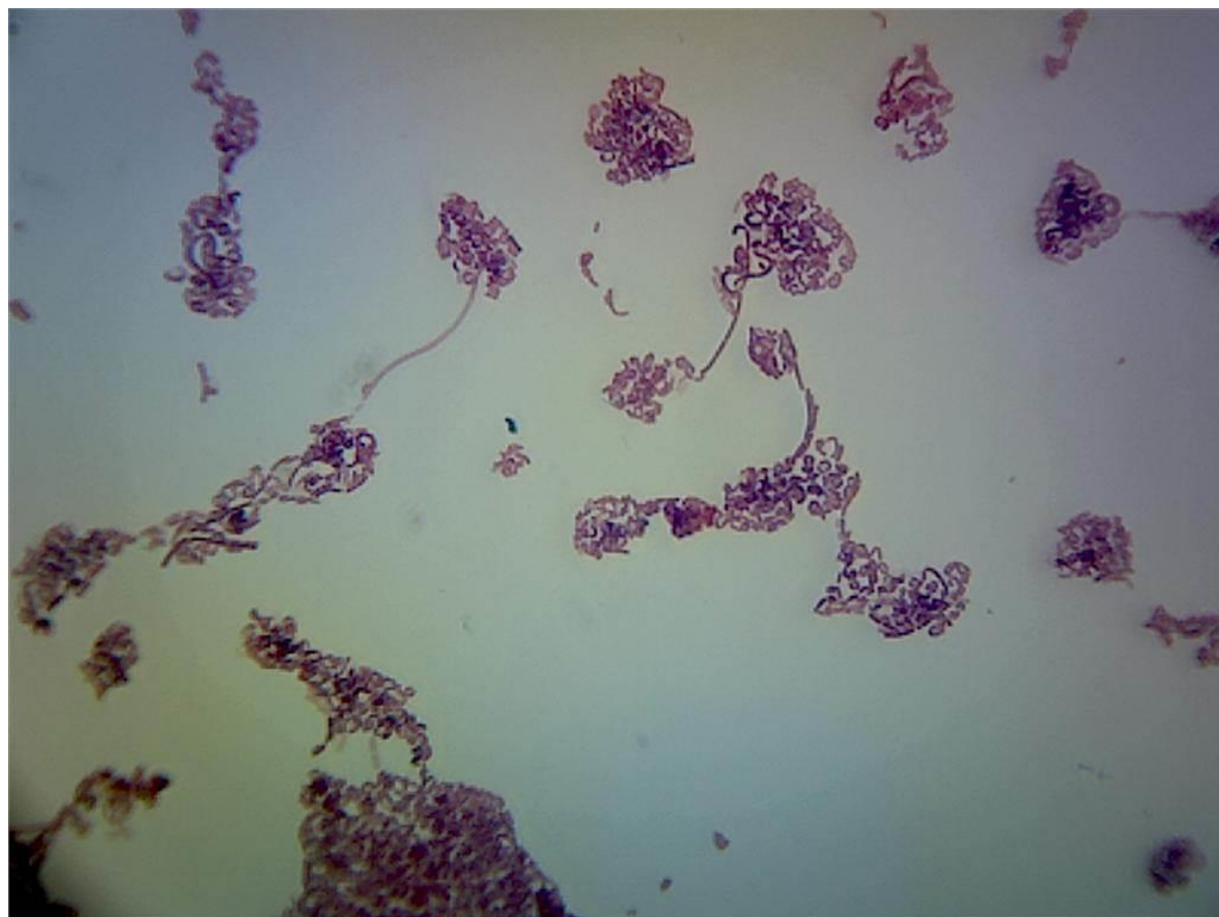
Anexo G

Morfología microscópica y tinción Gram de BAA en activados a base de MM.



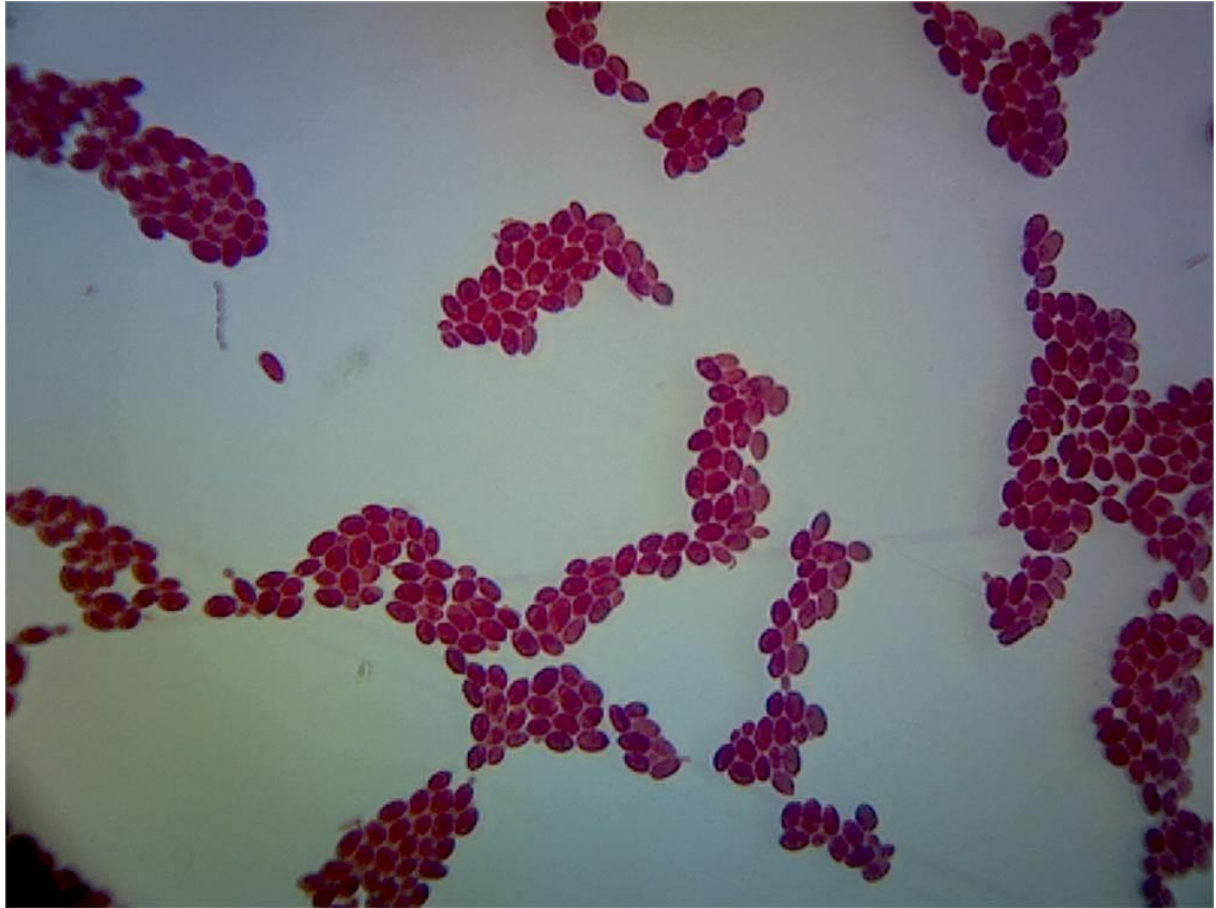
Anexo H

Morfología microscópica y tinción Gram de BAL en activados a base de MM.



Anexo I

Morfología microscópica y tinción Gram de levaduras en activados a base de MM.



Anexo J

Contenido de ácido acético y ácido propiónico por etapa de activación en activados líquidos a base de MM.

Activación	Descripción	Ácido acético mg/ml $\pm$ D. E	Ácido propiónico mg/ml $\pm$ D. E
MM Líquido 1 (6 DDA)	36 ^{to} DDA	1.06 $\pm$ 0.23 ^C	0.04 $\pm$ 0.03 ^D
MM Líquido 1 (12 DDA)	42 ^{do} DDA	2.35 $\pm$ 0.53 ^A	0.15 $\pm$ 0.03 ^A
MM Líquido 2 (6 DDA)	48 ^{vo} DDA	1.01 $\pm$ 0.23 ^C	0.05 $\pm$ 0.02 ^D
MM Líquido 2 (12 DDA)	54 ^{to} DDA	2.07 $\pm$ 0.42 ^{AB}	0.13 $\pm$ 0.03 ^A
MM Líquido 3 (6 DDA)	60 ^{mo} DDA	1.00 $\pm$ 0.33 ^C	0.06 $\pm$ 0.03 ^{CD}
MM Líquido 3 (12 DDA)	66 ^{to} DDA	2.09 $\pm$ 0.42 ^{AB}	0.11 $\pm$ 0.03 ^{ABC}
MM Líquido 4 (6 DDA)	72 ^{do} DDA	0.96 $\pm$ 0.24 ^C	0.05 $\pm$ 0.03 ^D
MM Líquido 4 (12 DDA)	78 ^{vo} DDA	1.68 $\pm$ 0.30 ^B	0.12 $\pm$ 0.03 ^{AB}
MM Líquido 5 (6 DDA)	84 ^{to} DDA	0.95 $\pm$ 0.23 ^C	0.06 $\pm$ 0.04 ^{BCD}
MM Líquido 5 (12 DDA)	90 ^{mo} DDA	1.64 $\pm$ 0.24 ^B	0.12 $\pm$ 0.03 ^A
CV (%)		20.68	37.95
R ²		0.90	0.79
P		<0.0001	0.0003

Nota. Cada medición de concentración de ácidos orgánicos en mg/mL representa la media de cuatro repeticiones en cinco fases de activación líquida. MM: microorganismos de montaña. DDA: días de activación. P: probabilidad C.V.: coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: desviación estándar. R: ajuste del modelo. A-D: letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre concentraciones a determinado día de activación.

Anexo K

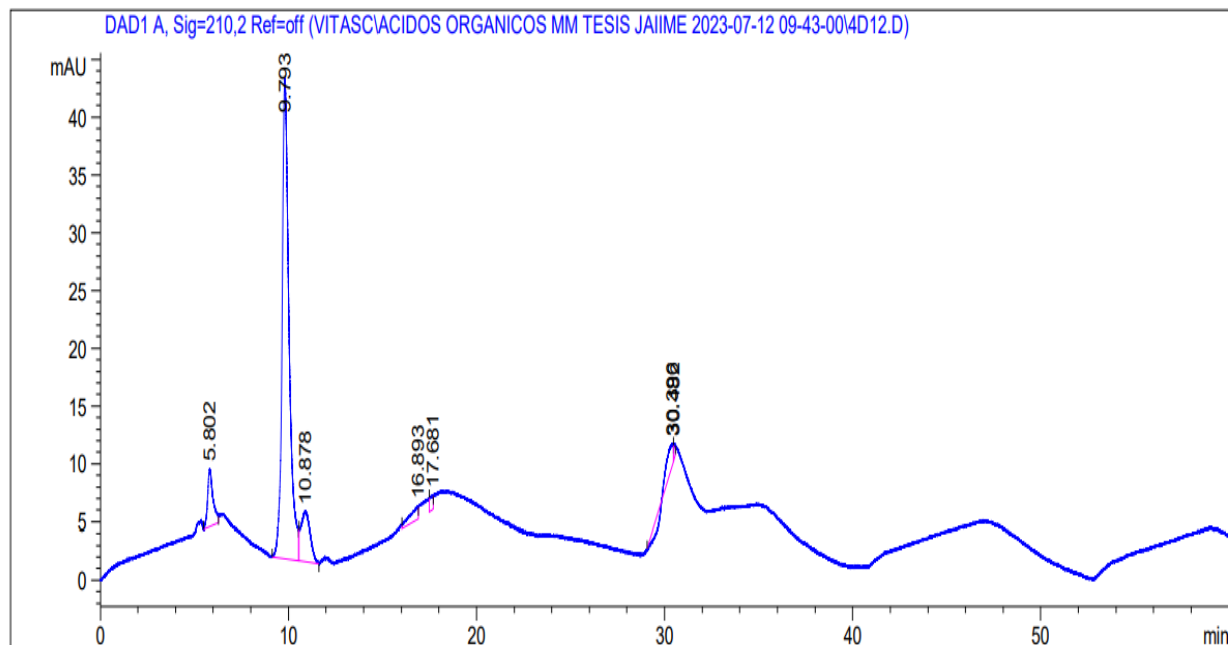
Contenido de etanol expresado en %volumen por etapa de activación en activados líquidos a base de MM.

Activación	Descripción	Volumen de etanol (%) $\pm D.E$
MM Líquido 1 (6 DDA)	36 ^{to} DDA	0.56 $\pm$ 0.15 ^A
MM Líquido 1 (12 DDA)	42 ^{do} DDA	0.08 $\pm$ 0.04 ^{BC}
MM Líquido 2 (6 DDA)	48 ^{vo} DDA	0.50 $\pm$ 0.09 ^A
MM Líquido 2 (12 DDA)	54 ^{to} DDA	0.08 $\pm$ 0.03 ^{BC}
MM Líquido 3 (6 DDA)	60 ^{mo} DDA	0.45 $\pm$ 0.16 ^A
MM Líquido 3 (12 DDA)	66 ^{to} DDA	0.08 $\pm$ 0.05 ^{BC}
MM Líquido 4 (6 DDA)	72 ^{do} DDA	0.22 $\pm$ 0.09 ^B
MM Líquido 4 (12 DDA)	78 ^{vo} DDA	0.08 $\pm$ 0.03 ^{BC}
MM Líquido 5 (6 DDA)	84 ^{to} DDA	0.19 $\pm$ 0.07 ^{BC}
MM Líquido 5 (12 DDA)	90 ^{mo} DDA	0.05 $\pm$ 0.03 ^C
CV (%)		37.82
R ²		0.93
P		<0.0001

Nota. Cada medición de porcentaje de volumen de etanol representa la media de cuatro repeticiones. MM: microorganismos de montaña. DDA: días de activación. P: probabilidad C.V.: coeficiente de variación en porcentaje. D.E.: desviación estándar. R: ajuste del modelo. A-G: letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre porcentaje de volumen a determinado día de activación.

Anexo L

Cromatograma para determinación de ácidos orgánicos en activados líquidos a base de MM.



Anexo M

Cromatograma para determinación de etanol en activados líquidos a base de MM.

