

Efecto inhibitorio del filtrado de un cultivo de *Lactobacillus* sp en la supervivencia de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* en mayonesa casera

Inhibitory effect of a growing filtering *Lactobacillus* sp on survival of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus* and mayonnaise in home

Kellyn Myluska Gómez Castro¹,
Pedro Alvarado Salinas²

Resumen

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar el efecto inhibitorio del filtrado de un cultivo de *Lactobacillus* sp en la supervivencia de *Salmonella enteritidis*, *t* y *Staphylococcus aureus* en mayonesa casera. Para lo cual se utilizó el método de recuento en placa y se determinó la supervivencia (UFC/ml) de cada cultivo bacteriano frente a la adición del filtrado del cultivo de *Lactobacillus* sp. Se trabajaron tres ensayos problema donde se adicionó a la mayonesa el cultivo bacteriano más el filtrado, y en otros tres que fueron los ensayos control se adicionaron solo los inóculos bacterianos para comparar el crecimiento de cada cultivo bacteriano sin la adición del filtrado.

Los resultados muestran que el filtrado de *Lactobacillus* sp inhibe el crecimiento de *Salmonella enteritidis* pues su crecimiento es menor comparado con el crecimiento de la cepa sin el filtrado en la mayonesa casera conservada a T° ambiente durante 72 horas, lo mismo ocurre con *Staphylococcus aureus*. Esto confirma el efecto antimicrobiano que tiene los metabolitos producidos por *Lactobacillus* sp y que están presentes en el filtrado

Palabras clave: *Lactobacillus*, filtrado, inhibición

Abstract

In this Work determine the inhibitory effect of filtrate of a culture of *Lactobacillus* sp in the survival of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus* in homemade mayonnaise. For which the method was used in plate count and survival (UFC / ml) of each bacterial culture was determined against the addition of the culture filtrate of *Lactobacillus* sp. Three trials where problem mayonnaise bacterial culture was added over the filtrate worked and in three other tests that were was added controlling bacterial inocula only to compare the growth of each bacterial culture without the addition of the filtrate.

The results show that *Lactobacillus* sp filtering .inhibits the growth of *Salmonella enteritidis* growth is less as compared to the growth of the strain without the filter in homemade mayonnaise stored at ambient T ° for 72 hours , so it is with *Staphylococcus aureus*. This confirms the antimicrobial effect of metabolites of *Lactobacillus* sp.

Keywords: *Lactobacillus*, filtering, inhibition

1. Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología. Departamento de Ciencias. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Privada Antenor Orrego.

2. Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Escuela de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

1. INTRODUCCIÓN

La biopreservación es un método de conservación que busca alargar la vida útil de los alimentos usando bacterias ácido lácticas (BAL) y sus metabolitos¹. Las metodologías de biopreservación más comúnmente utilizadas en alimentos son la aplicación de cepas productoras de sustancias antagonistas denominadas cepas biopreservantes, la utilización de preparaciones como extracto crudo de bacteriocinas, licor fermentado o concentrados obtenidos mediante el crecimiento de cepas biopreservantes en medios de cultivo específico y la adición de sustancias antagonistas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL.^{2, 3}

La conservación de los alimentos y la prevención de la ocurrencia de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) en los individuos, han motivado que el mundo industrial y el científico se interesen por conocer con mayor detalle el modo de acción de las bacterias ácido lácticas especialmente las probióticos y de algunos de sus metabolitos sobre los microorganismos patógenos³. Actualmente la industria de alimentos está utilizando los extractos purificados de bacterias ácido lácticas y probióticas para controlar bacterias patógenas, estas sustancias han sido llamadas bacteriocinas y se han considerados como sustancias GRAS (Generally Recognized As Safe), y confieren al consumidor función nutraceútica; no sólo por su función nutricional sino protectante^{4,5}.

Los modos de inhibición del crecimiento bacteriano no deseado por parte de los microorganismos que empleamos como conservadores varían desde competitividad por los nutrientes a la producción de metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias: peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, ácidos, antibióticos^{6,7}.

El uso de los probióticos como parte de los alimentos o en la fermentación de los mismos, es una área en franco desarrollo en la industria de alimentos lo que origina un marcado interés por las bacterias ácido lácticas y sus metabolitos^{8, 9}.

El concepto de conservadores biológicos se aplica a las células microbianas enteras o sus metabolitos que se aplican como conservadores. En la mayoría de los casos, los microorganismos que se utilizan son bacterias lácticas (en productos lácteos fermentados, productos cárnicos, pescado); pseudomonas para verduras frescas; levaduras y mohos en quesos^{10, 11}.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han estado presentes en la alimentación del hombre desde hace siglos ya que se encuentran en productos de leches fermentadas como yogurt, jocoque, quesos

madurados, productos cárnicos y hasta en algunas hortalizas. Metchnikoff hace más de un siglo comprobó el efecto benéfico en la salud por el consumo de leches fermentadas^{12, 13}.

Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, desde hace décadas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos⁴.

Las BAL son usadas en la biopreservación como cultivos bioprotectores y se han destacado por ser microorganismos que mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos contrarrestan el crecimiento de bacterias no deseadas, ayudando a preservar el alimento.

En el grupo de bacterias ácido lácticas destaca el género *Lactobacillus*, ya sea de metabolismo homofermentativo o heterofermentativo, y comprende cerca de 50 especies. Se caracterizan por ser bacilos gram positivos, no esporulados, sin motilidad, de metabolismo fermentativo, anaerobio facultativo, no reducen el nitrato, catalasa y oxidasa negativa y de requerimientos nutricionales complejos. Dentro de los metabolitos producidos por las BAL se encuentran las bacteriocinas que son proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados en el ribosoma de las BAL. La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. Estos péptidos atacan la membrana celular de otras bacterias evitando su reproducción¹⁴.

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios¹⁵.

El uso de las BAL y los metabolitos producidas por estas como las bacteriocinas, en forma de extractos crudos o purificados, ofrecen un potencial en la conservación de alimentos, siendo una alternativa en la industria de alimentos que podría ayudar a reducir la adición de preservantes químicos y disminuir la intensidad del tratamiento térmico, resultando en alimentos preservados naturalmente, con mejores propiedades nutricionales y organolépticas¹⁶.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprove-

chada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y listerias, respectivamente¹⁷.

Además de los roles mencionados anteriormente, las BAL también incrementan la higiene y seguridad de los alimentos como consecuencia de la inhibición por competición con bacterias patógenas.

La mayonesa, una de las salsas más consumidas en el mundo, emplea yemas de huevo crudas en su elaboración y es por esa razón por la que existe cierto riesgo de contraer salmonelosis si no se tienen las debidas precauciones. Las intoxicaciones alimentarias producidas por la mayonesa casera suelen provenir del empleo de huevos contaminados y del empleo de poca cantidad de ácidos orgánicos en su elaboración, bien sea vinagre (ácido acético) o zumo de limón (ácido cítrico), con el objeto de disminuir el pH de la mezcla por debajo de 3,3 y que la bacteria *Salmonella enteritidis* no prospere. La acidez es un punto crítico en la microbiología de la mayonesa y es uno de los puntos de medida acerca de su calidad sanitaria y supervivencia como alimento consumible. La mayoría de los casos de salmonelosis se producen por mayonesas caseras; en raras ocasiones un producto elaborado ha mostrado científicamente contaminación¹⁸.

De todos los microorganismos patógenos responsables de toxiinfecciones alimentarias que habitualmente se referencian en la literatura médica, *Salmonella* es, con toda seguridad, el que ocupa un lugar más destacado. *Salmonella* es una bacteria no demasiado resistente a las condiciones ambientales, en especial a la luz solar intensa, la desecación, concentraciones elevadas de sal o altas temperaturas. Sin embargo, es la responsable de casi la mitad de los casos de infecciones de origen alimentario que se diagnostican en los hospitales españoles. Esta misma situación se describe en el resto de los países de nuestro entorno^{19, 20}.

La incidencia de salmonelosis ha ido disminuyendo de forma constante en Europa desde mediados de 1990. En 2007, se reportaron aproximadamente 152.000 casos de salmonelosis humana. Un patrón similar se ha visto en los EE.UU., pero la incidencia se ha mantenido constante en aproximadamente 15 casos por 100.000 personas desde 2001. Una de las razones de la disminución de casos a finales de 1990 fue un mejor control de *S. enteritidis* en la producción de huevos²⁰.

Los brotes de salmonelosis transmitida por los alimentos siguen siendo comunes y se han asociado con una variedad muy amplia de alimentos, incluyendo productos lácteos, huevos, zumo de fruta, productos frescos, hierbas y especias, dulces de chocolate, cereales, carnes y salazones y el helado. Por ejemplo, un brote reciente en los EE.UU. fue causado por *S. typhimurium* en mantequilla de maní y pasta de maní; afectó a cerca de 700 personas a nivel nacional²¹.

Salmonella no es resistente al calor y no crecen a temperaturas bajas, pero aún así son difíciles y no están muertos por congelación. También pueden sobrevivir bien en los alimentos ácidos y resistir la deshidratación. Esto significa que, si bien no es capaz de multiplicarse en muchos alimentos procesados, si la contaminación está presente, puede ser difícil de erradicar.

El producto que mayoritariamente está implicado en la salmonelosis, la enfermedad causada por *Salmonella*, son las salsas tipo mayonesa elaboradas con huevo fresco. El huevo puede llevar *Salmonella* en su cáscara, ya que las gallinas, al igual que otros animales o el ser humano, pueden ser portadoras. En este caso, el microorganismo puede llegar a la superficie de la cáscara por contaminación desde la materia fecal de los animales. Cuando la cáscara está contaminada, la bacteria puede pasar al producto tras cascar el huevo y extender la contaminación a cualquier producto que se elabore con él²².

Algunas enfermedades transmitidas por los alimentos, si bien son conocidas, se consideran emergentes porque están ocurriendo con mayor frecuencia y han ocasionado brotes epidémicos en varios países. Entre ellas se destacan la *Salmonella enteritidis*. Durante el periodo de 1995-1999 en 21 países de América Latina y el Caribe fueron reportados 4 234 brotes de ETA que afectaron a 142 639 personas de las cuales 240 fallecieron. Costa Rica reportó un total de 110 afectados. Con relación al agente etiológico, el 55% de los brotes fue como consecuencia de un agente microbiano, de este 55%, el 33.2% se dio por infecciones por *Salmonella sp.* El alimento asociado al brote fue identificado en 3 226 casos (76.2%), constatándose que el pescado fue el alimento más frecuentemente involucrado (27.8%). 23

Staphylococcus aureus es el representante del género *Staphylococcus* con mayor potencial patógeno, es un coco gram positivo y suele provocar intoxicaciones alimentarias en periodos de incubación cortos, típicamente de 2 a 4 horas. Es una bacteria considerada omnipresente, encontrándose en las mucosas y piel de la mayoría de animales de sangre caliente; en el humano se encuentra en la cavidad nasal, de donde pasan a la piel y lesiones de ésta, principalmente en los brazos, las

manos y la cara, pudiéndose encontrar, asimismo en la garganta y en el tracto intestinal, pasando de estas localizaciones al aire, polvo, ropa, utensilios y equipos, y de allí, a los alimentos.²⁴

Diversos alimentos han sido la causa de intoxicación alimentaria estafilocócica, destacando en términos de frecuencia la carne de mamíferos y de aves cocinada, el queso, productos de pastelería rellenos de crema, leche, leche en polvo y ensaladas a base de papa, huevo, etc. Para este caso, por ejemplo, se menciona la intoxicación alimentaria causada por *S. aureus* en un restaurant institucional en Brasil, donde 56 personas, entre una hora y media a doce horas después de haber ingerido los alimentos, presentaron síntomas como vómitos, diarrea, dolor abdominal, fiebre y dolor de cabeza después de haber ingerido sándwich de pollo, jugo de naranja y pudín de leche; los análisis posteriores de estos alimentos determinaron la presencia de *S. aureus* en una cantidad de 2×10^8 UFC/g.²⁵

La mayonesa es uno de los alimentos más implicados en intoxicaciones alimentarias, pues, es el complemento de muchos platos. La U.S Food and Drug Administration según el ICMSF, define a la mayonesa como un alimento emulsificado, semi-sólido preparado con aceite, vinagre, zumo de limón y/o zumo de lima y yema de huevo. Debido a las sustancias nutritivas que presenta (carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas) proporcionados por el huevo y aceite, la mayonesa es susceptible de sufrir contaminación y el posterior desarrollo microbiano. Además, el desarrollo se ve favorecida por las condiciones ambientales favorables que se presentan en la temporada de verano (temperaturas altas, luz), de modo que si es mantenido a temperatura de conservación inapropiada se convierte en el más peligroso producto alimenticio capaz de producir intoxicación alimentaria. En Chile en el año 2000 falleció un joven de 16 años, sin antecedentes patológicos, involucrado en un brote por *Salmonella enteritidis* como consecuencia de consumo de mayonesa casera y falleció por una septicemia por *S enteritidis*.

Las bacterias y levaduras que prosperan en la mayonesa deben soportar pH de 4. Se ha demostrado incluso una mejora en la vida media de la mayonesa si se inoculaban bifidobacterias durante su procesamiento. El ataque por moho en la mayonesa es superficial y ocurre tan solo en presencia de suficiente oxígeno. Las condiciones de acidez del producto por debajo de un pH de 4,4 hacen que no puedan sobrevivir la mayoría de los tipos de bacterias. Es por esta razón por la que las salsas de mayonesa comerciales suelen tener un "punto de acidez". No obstante hay estudios donde *Escherichiacoli* 0157:H7 ha mostrado ser resistente a estas condiciones. Existen casos de shigelosis debidos a proliferación de la bacteria

Shigella.²⁶

Es de gran importancia utilizar aditivos naturales en los productos alimentarios, que para este efecto denominaremos "biopreservantes", que además de realizar un efecto antagónico frente a la *Salmonella*, enriquezcan nuestra flora intestinal ayudando en los procesos digestivos.²⁷

Lord en el 2002 realizó la evaluación preliminar de la capacidad antagónica del *Lactobacillus acidophilus* contra *Salmonella enteritidis* en pescado. Comprobó que la actividad inhibitoria sólo se da a concentraciones altas de *Lactobacillus acidophilus* (10^7 UFC/ml).

En la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, se han aislado cepas nativas de *Lactobacillus* con efecto probiótico. Sin embargo, las propiedades y caracterización del extracto producido por estas bacterias, aún no ha sido analizado como sustancia bactericidas.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto inhibitorio del filtrado de un cultivo de *Lactobacillus* en la supervivencia de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en mayonesa casera.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del inóculo bacteriano: A partir del cultivo de *Salmonella enteritidis* y *Salmonella sp.* y previa observación microscópica para verificar la pureza del cultivo, se inoculó una asada en Agar Mac Conkey e incubó a 37° C por 24 horas. Transcurrido el tiempo mencionado se hizo una suspensión del cultivo en 10ml de solución salina fisiológica estéril (SSFE) donde se obtiene, por comparación con el tubo N° 1 del nefelómetro de Mac Farland, una concentración de 3×10^8 microorganismos por mililitro.

Para el cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se sembró en Agar Manitol Salado y se incubó a 37° C por 24 horas. Se hizo la suspensión y comparación con el Tubo N° 1 de Mac. Farland.

Obtención del filtrado del cultivo de *Lactobacillus*

Reactivación del cultivo de *Lactobacillus*: El cultivo liofilizado de *Lactobacillus* se reactivó en Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) a pH 5.5, y se incubó a 37° C por 24 horas en atmosfera de microaerobiosis. Se hizo la observación microscópica para verificar la pureza del cultivo.

Filtración del cultivo de *Lactobacillus*: Se hizo una resiembra en caldo rogosa a pH=5.5 y se incubó a 37°C por 24 horas. A partir del cultivo de *Lactobacillus* en caldo, se centrifugó, se separó

el sobrenadante y se realizó la filtración del sobrenadante por el método de filtración de membrana en poros de 0.45µm.

Preparación de la mayonesa casera (MC) e inoculación del filtrado y de la suspensión bacteriana:

Se prepararon dentro de una cámara de flujo laminar, aproximadamente 200g de MC, para lo cual se agregaron 2 huevos, 1 limón, 2g de sal común y aproximadamente 100mL de aceite vegetal. Los cuales se repartieron en 7 frascos con 50ml del preparado. Luego, a tres de ellos se le adiciono 1mL del filtrado de *Lactobacillus sp* y 1ml de la suspensión bacteriana de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella sp* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, respectivamente. En otros tres frascos se inoculó 1ml de las suspensiones bacterianas de *Salmonella enteritidis*, *Salmonella sp* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente, y en el frasco restante quedó la mayonesa que sirvió como para verificar la ausencia de microorganismos

Determinación de la población bacteriana sobreviviente

Se determinó la población bacteriana sobreviviente mediante la técnica de recuento en placa en medio Agar Mac Conkey para *Salmonella enteritidis*, *Salmonella sp.* y en Agar Manitol Salado para *Staphylococcus aureu* ATCC 25923, .Previas diluciones se sembró la muestra de mayonesa a las 0,24,48 y 72 horas de haber inoculado el filtrado y la suspensión bacteriana.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados Prueba de Mann-Whitney, una prueba aplicada a muestras independientes.

3. RESULTADOS

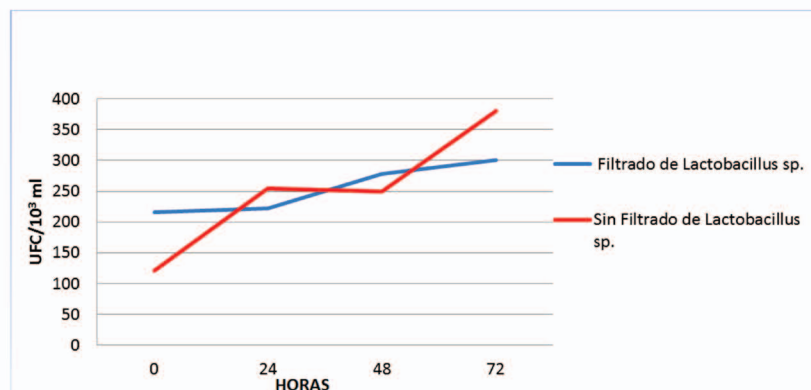


Fig. N°1. Crecimiento de *Salmonella sp.* con y sin filtrado del cultivo de *Lactobacillus sp.* en mayonesa casera incubada a T°ambiente durante 72 horas, pH:5.5
P>0.05

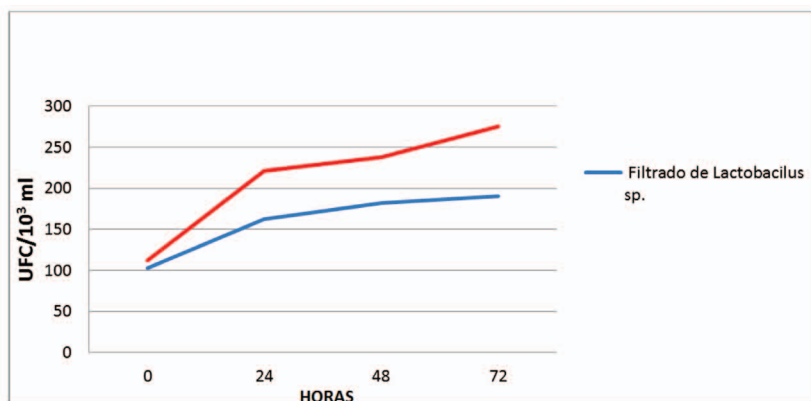


Fig. N°2. Crecimiento de *Salmonella enteritidis* con y sin filtrado del cultivo de *Lactobacillus sp.* en mayonesa casera incubada a T°ambiente durante 72 horas, pH:5.5
P<0.05

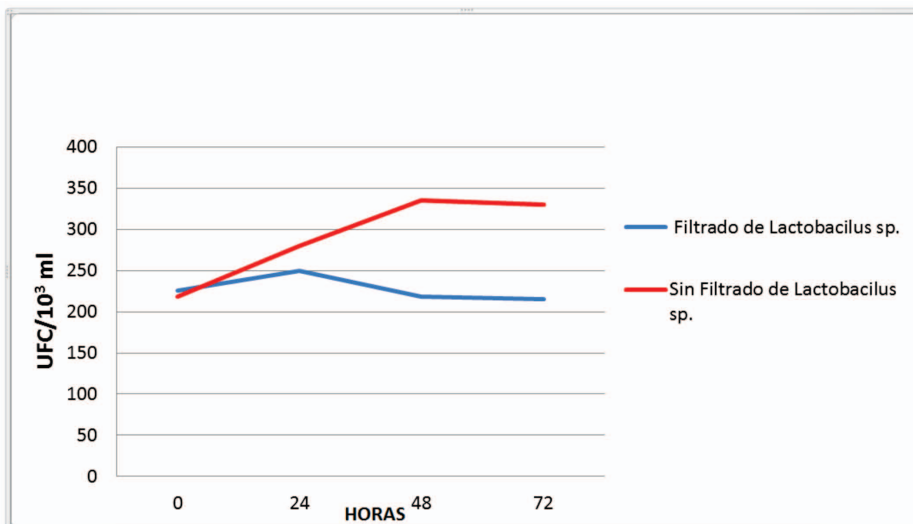


Fig. N°3. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 con y sin filtrado del cultivo de *Lactobacillus sp.*, en mayonesa casera incubada a T°ambiente durante 72 horas, pH:5.5
 P<0.05

4. DISCUSIÓN

El amplio uso de las bacterias ácido lácticas en la preservación de alimentos se debe a que producen ácidos orgánicos y una gran variedad de sustancias antimicrobianas como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), diacetil y bacteriocinas.

Según Fricourt *et al.* (1994), las bacterias ácido lácticas sintetizan agentes antibacteriales, que varían en el espectro de actividad.

En la Fig. 1 se reporta el crecimiento microbiano del cultivo de *Salmonella sp.* con y sin el filtrado de *Lactobacillus sp.*, en mayonesa casera incubada a T°ambiente durante 72 horas, al realizar el análisis estadístico no se encontró significancia estadística (P>0.05). Esto se debería a que *Salmonella sp.* era una cepa nativa intrahospitalaria habiendo adquirido genes de resistencia a los metabolitos producidos por *Lactobacillus sp.*

En la Fig. 2 se reporta el crecimiento microbiano de *Salmonella enteritidis* con y sin el filtrado de *Lactobacillus sp.* en mayonesa casera incubada a T°ambiente durante 72 horas, al realizar el análisis estadístico se encontró significancia estadística confirmando el efecto inhibitorio del filtrado sobre el crecimiento de este patógeno.

En la Fig. 3 se reporta el crecimiento microbiano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con y sin el filtrado de *Lactobacillus sp.* en mayonesa casera incubada a T°ambiente durante 72 horas, notando una inhibición del crecimiento cuando se enfrenta al patógeno con el filtrado de *Lactobacillus sp.*

De acuerdo a Schillinger y Lücke (1989) el factor decisivo en la inhibición de *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* es el rápido crecimiento de *Lactobacillus* y la rápida caída del pH que le acompaña.

Según Isolauri *et al.*, 2001, las bacterias ácido lácticas, producen sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, diacetilo y bacteriocinas, quienes reducen el número de células patógenas viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas.

Estas ventajas han hecho que las bacteriocinas sean consideradas como compuestos importantes en la prevención de toxiinfecciones alimentarias, donde patógenos como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* son actualmente una preocupación para la salud pública tanto a nivel nacional como mundial.

Según Casaus y Hernández, 2000, debido a las características fisiológicas y bioquímicas de

las BAL, su uso en la conservación de los alimentos, permitirá disminuir el empleo de preservativos químicos adicionados a estos. Las ventajas constatadas han hecho que los *Lactobacillus* sean considerados como bacterias nutraceúticas, por su valor nutricional y farmacéutico.

Sin embargo, no se encontraron muchos estudios de inhibición in vitro, donde se reten sobrenadantes obtenidos a partir de diferentes cócteles bacterianos con cepas patógenas aisladas de diversos orígenes. Con este estudio se demostró el gran potencial de *Lactobacillus* sp. como productor de sustancias bacteriocin-like inhibitory substances (BILS) dentro del contexto de biocontrol y cómo dicha producción está ligada a la presencia o a la ausencia de otros microorganismos en el medio. Investigaciones futuras deberán dirigirse a caracterizar el filtrado de *Lactobacillus* sp. para ser considerado como "biopreservante" en cualquier tipo de alimento.

5. CONCLUSIONES

- El filtrado de *Lactobacillus* sp. tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de cepas de *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 inoculadas en mayonesa casera incubada a temperatura ambiente y transcurrido un tiempo de 72 horas.
- El efecto inhibitorio del filtrado dependerá de la cepa patógena a la que se enfrenta y los metabolitos que produce cada especie de *Lactobacillus* sp.

6. AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología. Departamento de Ciencias. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Privada Antenor Orrego

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campos JA. Cultivos probióticos y protectores, propiedades funcionales (Nutraceúticas) de valor agregado en los derivados lácteos. Lácteos y cárnicos mexicanos. Jun/Jul 26-37. 2002.
2. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 70:331-345. 1996.
3. Daeschel, M. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43:164-167. EEUU. 1991.
4. Garriga, M; Aymerich, T; Costa, S; Monfort, J; Hugas, M. Las altas presiones en combinación con bacteriocinas como nueva tecnología de conservación en productos cárnicos. Eurocarne. 87:59-63. 2000.
5. Martinez, R y col. Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2a growth and haemolytic activity. Brazilian Journal of Microbiology. Vol.36 N°1 São Paulo. 2005.
6. Hugas, M; Pages, F; Garriga, M; Monfort, J. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. Food Microbiology. 15: 639-650. 1998.
7. Monfort, J. M; Hugas, M; Pagés, F; Garriga, M. Comparación de diferentes lactobacilos productores de bacteriocina sobre el crecimiento de *Listeria* en salchichones. Eurocarne. 48: 51-55. 1996.
8. Schillinger, U.. Lactic acid bacteria as protective culture in meta products. Fleischwirtsch. 70: 1296-1299. Alemania. 1990.
9. Gonzalez y col. Bacteriocina en Probióticos. Facultad de Salud Pública y Nutrición (Universidad Autónoma de Nuevo León). Revista de Salud Pública y Nutrición (RESPYN). Vol 4 No.2 Abril-Junio 2003 [En línea] <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>
10. Fellows P. Tecnología del Procesado de Alimentos. Edit. Acribia. España 1994.
11. CINTAS, L. M.; CASAUS, P. y HERNÁNDEZ, P. E. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (I y II). En: Alimentación, Equipos y Tecnología. Vol. 19, No.7 (Sep., 2000); p. 109-119.
12. FARNWORTH, E. R. Probiotics and prebiotics. En: Handbook of nutraceutical and functional foods. Vol. 25 (2001); p.407-422.
13. SALAZAR, A. B. Aislamiento de cepas nativas de microorganismos probióticos. Medellín. 2003. 77 p. Tesis (Magister en Biotecnología). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
14. RODRÍGUEZ, Juan Manuel; MARTÍNEZ, María I. and KOK. Pediocin PA-1 to wide spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol. 42, no. 2 (mar. 2002); p. 91-121.
15. ABDEL-BAR, N.; HARRIS, N. D and RILL, R. L. Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. En: Journal of Food Science. Vol. 52 (1987);

- p. 411-415.
16. GUARNER, F. and MALAGELADA, J. R. Ecología intestinal: modulación mediante probióticos. En: ORTEGA, R. M. et al. Alimentos funcionales probióticos. Madrid: Médica Panamericana., 2002. Cap. 4.
 17. Mateos JA. Aspectos Básicos de la Tecnología de las Leches Fermentadas. En Alimentos Funcionales. Probióticos. [RM Ortega, A Marcos, J Aranceta, JA Mateos, AM Requejo, L. Serra.] Ed. Médica Panamericana. Cap 6. 2002.
 18. Smith D, Stratton JE. Comprendiendo las BPM para salsas y aderezos. Universidad de Nebraska. Lincoln. 2007.
 19. Arroyo, G; Arroyo, J. Detection of *Salmonella* serotypes in edible organ meats from markets in Madrid, Spain. Food Microbiol.12 (3):13-20. 1995.
 20. Parrilla M y col. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México. México.1993.
 21. Morán, N. Resumen de XVII Reunión Nacional de Microbiología, higiene y toxicología de alimentos. En: Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. (II. Guadalajara, México) p. 1-15. 2000
 22. Prado JV y col. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Revista médica de Chile 2002; 130 (5).
 23. Adams M, Moss M. Microbiología de los alimentos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza. España. 1997.
 24. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración 2da ed. Edit. Acribia S.A. Zaragoza. España. 2000.
 25. Hernández HMM, Roig SAX, Rodríguez J. La incidencia de enfermedades de origen alimentario en España. Universidad Autónoma de Barcelona 2003.
 26. ICMSF. Ecología microbiana de los alimentos. Productos alimenticios. Vol. II. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1985
 27. ICMSF. Microbiología de los Alimentos: Características de los patógenos microbianos. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1998.