

EVALUACIÓN HIGIÉNICO-SANITARIA Y ACCIÓN ANTAGÓNICA DE CEPAS DE LACTOBACILOS COMERCIALES FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS (*Escherichia coli*) PRESENTES EN EL QUESO DE CAPA DEL MUNICIPIO DE MOMPOX

Higienic-Sanitary Evaluation and Antagonistic Action of Strains of Commercial Lactobacillus in Front to the Pathogen Microorganism (*Escherichia coli*) Present in the Cheese of Layer of the Municipality of Mompox

Marlene Durán Lengua, Piedad Montero Castillo*, Wilfrido Flórez Díaz, Vicenta Franco de la Hoz y Rusbel Coneo Rodríguez

Grupo de Investigación Nutrición, Salud y Calidad Alimentaria NUSCA, Programa Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia. *pmargaritamontero@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad higiénica del queso de capa del municipio de Mompóx en el departamento de Bolívar, Colombia y la capacidad bactericida de *Lactobacillus* spp aislados de un producto comercial (yogurt). Se tomaron 16 muestras de 200 g en cuatro sitios de fabricación del queso de capa, entre abril y noviembre del 2006; fueron empacadas en bolsas estériles y trasladadas en nevera de icopor con hielo hasta el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Cartagena, allí se evaluó la carga microbiana de mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y *Salmonella*. Este estudio arrojó un promedio de mesófilos aerobios $1,5 \times 10^8$, de coliformes totales $2,5 \times 10^3$; se confirmó la presencia de *E. coli* y la ausencia de *Salmonella*, así como de cepas ácido lácticas en las muestras estudiadas. En general, los recuentos microbiológicos sobrepasan los valores establecidos por la legislación colombiana. Por otro lado, la evaluación de actividad antagonista de *Lactobacillus* comerciales fue demostrada frente a las cepas de *E. coli* aisladas.

Palabras clave: Antagonismo, bacteriocinas, queso, probióticos.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the hygienic quality of the cheese layer in the Mompox Municipality in the Department of Bolivar, Colombia, and the bactericidal capacity of the *Lactobacillus* spp isolated from a commercial product (yogurt). Sixteen cheese layer samples of 200g each were taken from four manufacturing sites between April and November of 2006, the samples were packed in sterile bags and transported with ice in polystyrene to the laboratory of food Microbiology at the University of Cartagena, the university assessed the microbial of aerobic mesophiles total coliforms, fecal coliforms, *E. coli* and *salmonella*. This study threw an average of aerobic mesophiles 1.5×10^8 , of total coliforms 2.5×10^3 ; confirmed the presence of *E. coli* and the absence of *Salmonella*, as well as strains of lactic acid in the samples studied. In general, microbial counts exceed the levels established by Colombian legislation. Furthermore, assessment of antagonistic activity of commercial Lactobacillus was demonstrated against isolated strains of *E. coli*.

Key words: Antagonism, bacteriocins, cheese, probiotics.

INTRODUCCIÓN

El queso es un excelente medio para el crecimiento de microorganismos debido a su alto contenido en agua, su pH y la gran variedad de nutrientes que éste posee [7]. El único in-

grediente para la producción de quesos es la leche, la cual, debido a su procesamiento, va adquiriendo una microbiota entre la que se incluyen microorganismos patógenos como *E.coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes* en quesos blancos elaborados con leche cruda [15].

Las bacterias patógenas que tradicionalmente han preocupado en mayor medida a los microbiólogos de alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Clostridium botulinum*. Sin embargo, en los últimos años, diversos microorganismos han ganado una gran importancia como agentes causantes de toxiinfecciones alimentarias. Entre estos microorganismos denominados patógenos "emergentes" se incluyen *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT) y *Campylobacter jejuni* [5, 11, 22]. Así mismo, como consecuencia del abuso de antibióticos en medicina y animales de abasto, se está observando un aumento considerable en la aparición de patógenos alimentarios multiresistentes a antibióticos [20].

Las bacterias ácido lácticas presentan en la actualidad un inmenso potencial biotecnológico, dada su presencia en multitud de procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano, como son los derivados lácteos, vegetales, cárnicos, panadería y bebidas alcohólicas; también es frecuente su uso en la obtención de ensilados para consumo animal [6]. Estas bacterias no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos, sino que generan en los mismos, ambientes poco favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos debido a su marcada capacidad antagonista [11].

Además de este importante papel en procesos de bioconservación, se ha podido comprobar que, algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son beneficiosas para la salud, tanto humana como animal (probióticos) [6]. Ambos efectos beneficiosos, ocasionados por su capacidad antagonista, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas [4]. Inhibiendo microorganismos patógenos y mejorando la salud del consumidor [6].

Las bacteriocinas reconocidas como beneficiosas producidas por las bacterias ácido lácticas han despertado una gran atención como algo novedoso para el control de patógenos en productos alimenticios. Las bacteriocinas son compuestos proteínicos antimicrobianos que inhiben cepas sensibles y son producidas, tanto por bacterias Gram positivas como Gram negativas [19].

Las bacterias ácido lácticas ejercen una fuerte actividad antagonista contra muchos microorganismos, incluyendo ali-

mentos con una carga de microorganismos patógenos. Además, muchas cepas pueden contribuir a la conservación de alimentos fermentados a través de la producción de bacteriocinas [14].

Investigaciones sobre bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas se han expandido durante las últimas décadas, hasta incluir el uso de bacteriocinas o de organismos productores como preservativos de origen natural, con el fin de disminuir cada vez más el uso de preservantes y aditivos químicos en los alimentos, debido a efectos adversos que puedan causar en la salud del consumidor [21]. En esta investigación fue evaluada la calidad higiénico-sanitaria de los quesos de capa del municipio de Mompóx y la acción bactericida de *Lactobacillus* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron tomadas 16 muestras de 200 g de queso de capa en cuatro sitios de fabricación artesanal del municipio de Mompóx-Bolívar (Colombia), entre los meses de abril y noviembre del año 2006, estas muestras fueron empacadas en bolsas estériles y trasladadas en cava de anime con hielo hasta el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Cartagena, el muestreo se realizó por triplicado.

Recuento de mesófilos aerobios

Fue realizado siguiendo las técnicas del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA utilizando agar para recuento de colonias Difco, y realizando diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Los resultados fueron reportados como unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) [16].

Determinación de coliformes totales y *E. coli* [10]

Para el recuento de *coliformes* se utilizó el método del número más probable (NMP) con recuento en tubos múltiples en caldo bilis verde brillante. Se homogeneizaron 50 g de cada muestra en 450 mL de agua peptonada al 0,1 % pH 7,2 durante un minuto en una licuadora doméstica marca Oster 4655-041, México, de tres velocidades; lo que constituyó la dilución 10^{-1} . A partir de ésta se realizaron diluciones decimales consecutivas hasta una concentración 10^{-5} en agua de peptona al 0,1%.

Para la prueba presuntiva se inocularon las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en caldo bilis verde brillante (Merck). Estas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, en una incubadora marca thermolyne, type 42000, EUA. Como prueba confirmatoria de la presencia de coliformes fecales se usó el caldo bilis verde brillante (Merck) incubados a 45°C por 24 horas y para la confirmación de *E. coli* se usaron placas de agar Levine eosina azul de metileno (EMB). La identificación se realizó mediante la prueba de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer

y citrato (Difco), además de la prueba de fermentación en agar hierro triple azúcar y la tinción de Gram. Los resultados se reportaron como número más probable por gramo (NMP/g).

Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de un producto comercial y del queso [10]

Para el aislamiento a partir del queso, fueron pesados y homogenizados 25 g de la muestra en agua peptonada. A partir de ésta, se sembró en placas de petri con agar rogosa (MRS). Estas se incubaron en anaerobiosis por 48 horas a 37°C. Para la identificación del género *Lactobacillus* se usaron las pruebas de fermentación de glucosa y lactosa, así como las tinciones de Gram y la prueba de catalasa. El aislamiento a partir de un producto comercial (yogurt) se realizó en agar rogosa MRS siguiendo el procedimiento descrito para el aislamiento a partir del queso [5]. Después del aislamiento se realizaron pruebas confirmativas: coloración de Gram y la catalasa. Para determinar la presencia de bacterias pertenecientes al género *Lactococcus*, en el queso de capa, fue utilizado el agar M17, las placas sembradas se incubaron por 24 horas a 37°C en una incubadora marca thermolyne, type 42000, EUA.

Determinación de bacteriocinas activas en queso

Cinco gramos de queso fueron homogeneizados con 10 mL de HCl 0,02 N estéril a 50°C. Fueron centrifugados en un equipo marca Jovan inc, modelo b3-11, EUA a 12.000 g durante 20 minutos a 4°C. Luego se neutralizó el sobrenadante hasta pH 6 con NaOH 1 N y se congeló en un equipo marca Super Nórdico, modelo 12000 Bogotá-Colombia, a -20°C por 24 horas [1].

Para determinar la actividad bactericida se empleó el ensayo de difusión en pozos con algunas modificaciones [9], para lo cual se tomaron placas de petri, se adicionaron de 10 a 12 mL de agar MRS, después se procedió a hacer 5 pocitos utilizando un molde con cinco torrecitas de acero inoxidable.

En cada pocito se adicionó de 10 a 100 µL del extracto y se selló con una pequeña capa de agar, posteriormente se sembró la cepa indicadora, *E. coli* ATCC 25922 6×10^{-8} bacterias/mL, se tomó 15 µL y se mezcló con 12 mL de agar Infusión cerebro corazón semisólido (0,8%) (Merck) se agitó y se adicionó sobre la caja de agar MRS que contenía los extractos, formándose una doble capa, y se incubó a 37°C/48h. La actividad bactericida de los extractos se detectó por una zona clara de inhibición alrededor del pozo (halos de inhibición), se consideró como actividad inhibitoria la formación de un halo mayor de 2 mm según Gutierrez y Acosta [8].

Espectro de actividad antagónica [18]

Se utilizó la técnica de difusión en pocitos sobre placas con agar rogosa MRS (15 mL) fluido a 45°C, luego se depositó

un molde de acero inoxidable con 5 cilindros de 6 mm de diámetro, utilizada para hacer hoyuelos en el agar. La placa se dejó a temperatura ambiente hasta que se solidificó el medio e inmediatamente se retiró el molde, quedando una placa de agar con 5 pocitos listos para ser inoculados. En los pocitos fueron depositados cantidades de 6×10^6 ; $1,5 \times 10^7$; 3×10^7 y 6×10^7 unidades de *Lactobacilos* comerciales a ensayar, además de una capa de agar después del inóculo de las muestras, con el fin de sellar los pocitos. Estos fueron incubados en anaerobiosis a la temperatura de 37°C durante doce horas. Pasado este tiempo de incubación se inoculó el microorganismo aislado del queso de capa (*E. coli*) 15 µL, a una concentración de 6×10^8 según escala 2 de McFarland [12, 13], en un tubo con 12 mL de agar infusión cerebro corazón fundido a 45°C, se homogenizó, se adicionó sobre la placa de agar rogosa quedando una capa doble, después de solidificada, nuevamente se incubó 37°C por 24 horas, y se midió el halo de inhibición del crecimiento del microorganismo problema alrededor de cada pocillo.

Análisis estadístico

Los resultados son presentados como la media \pm el error estándar. Se utilizó análisis de varianza para detectar diferencias en el número más probable de las muestras tomadas a diferentes épocas del año, al igual que los diámetros de los halos de inhibición formados por *E. coli*, con diferentes cantidades de *Lactobacillus* spp inoculados. La significancia estadística establecida a $P < 0,05$ fue realizada utilizando un análisis de varianza, seguido por un test de Tukey. [23]. Los datos obtenidos fueron procesados utilizando el programa estadístico INSTAT-3 y EXCEL [24].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los recuentos de mesófilos aerobios arrojaron en promedio $1,5 \times 10^8$ UFC/g lo que indica que sobrepasó los valores establecidos por la norma técnica Colombiana FIG. 1.

El recuento de coliformes totales (NMP) fue de $2,5 \times 10^3$, lo que mostró un alto índice de coliformes en comparación con los niveles permitidos por la norma colombiana [17], esto indicó que las muestras tuvieron un procesamiento higiénico-sanitario inadecuado, FIG. 2.

Una vez sembrados los coliformes positivos en agar EMB y realizadas las pruebas bioquímicas (indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato) para confirmar la presencia de *E. coli*, se procedió a verificar si eran cepas de alta patogenicidad (*E. coli* O157: H7) sembrándolas en agar MacConkey sorbitol, confirmándose la ausencia de estas cepas.

La presencia de *E. coli*, considerado un microorganismo indicador de contaminación fecal, pone de manifiesto el tratamiento inadecuado en el proceso de fabricación e higiene de este producto [22].

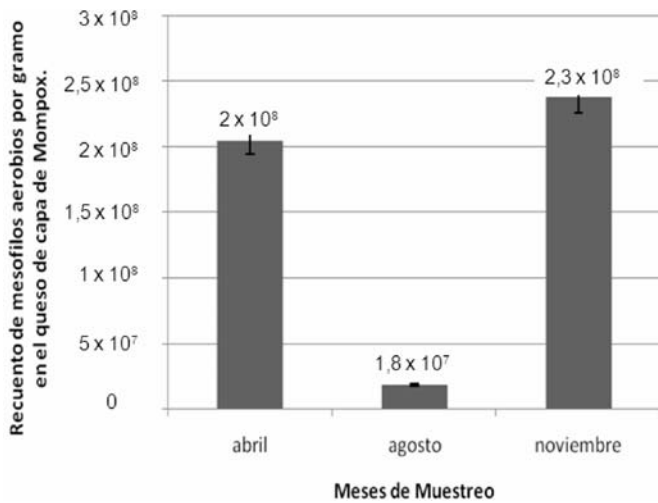


FIGURA 1. PROMEDIOS DE MESÓFILOS AEROBIOS DEL MUESTREO EN TRES DIFERENTES MESES DEL AÑO / AEROBIC MESOPHILIC AVERAGE OF THE SAMPLING IN THREE DIFFERENT MONTHS OF YEAR.

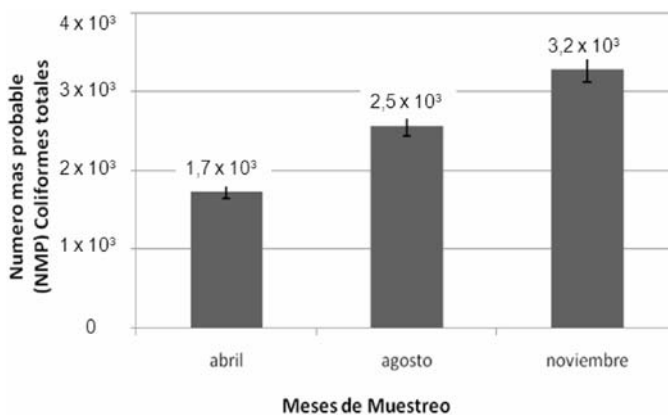


FIGURA 2. PROMEDIOS DEL NÚMERO MÁS PROBABLE PARA COLIFORMES TOTALES DEL MUESTREO EN TRES DIFERENTES ÉPOCAS DEL AÑO / MOST PROBABLE NUMBER AVERAGES OF TOTAL COLIFORM OF THE SAMPLING IN THREE DIFFERENT MONTHS OF YEAR.

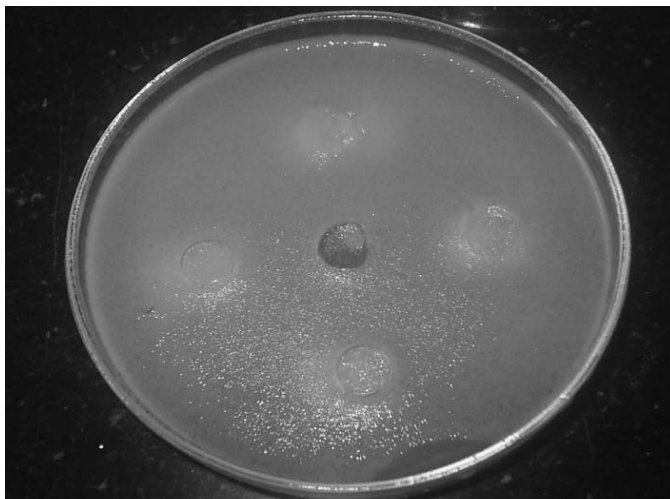


FIGURA 3. DETERMINACIÓN DE BACTERIOCINAS ACTIVAS EN EL QUESO / DETERMINATION OF ACTIVE BACTERIOCINS IN CHEESE.

Los cultivos probióticos fueron obtenidos de yogurt comercial que contenían *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. A partir del aislamiento en agar rogosa, la determinación de catalasa, tinción de Gram se confirmó que los microorganismos allí presentes pertenecían al género *Lactobacillus*.

La determinación de bacteriocinas activas en el queso resultó negativa, esto se debe a la naturaleza proteica de estas sustancias, las cuales son inactivadas total o parcialmente por enzimas proteolíticas [3] FIG. 3; igualmente resultó negativo el crecimiento de *Lactococcus* y *Lactobacillus* a partir de las muestras de queso en agar Rogosa y M 17, respectivamente.

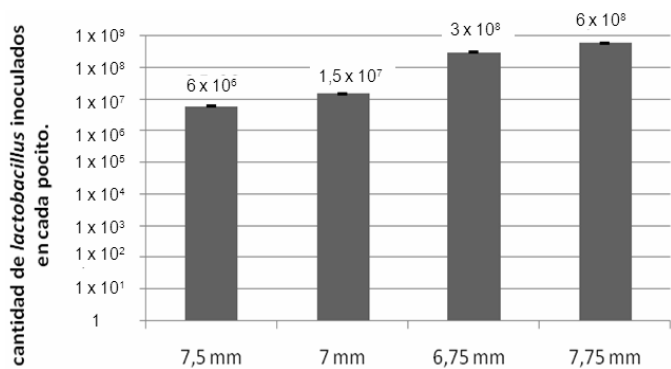
Después de realizados los ensayos de doble difusión con las cepas de *E. coli*, se encontró que los *Lactobacillus* aislados de productos comerciales, inhibieron el crecimiento de estas bacterias (TABLA 1 y FIG. 4), los halos de inhibición presentaron un promedio de 7,2 mm. Este hecho se consideró como actividad antagonista positiva [8].

La producción de ácidos orgánicos, compuestos carboxílicos y bacteriocinas son alternativas planteadas que explican la acción de los probióticos. Los Lactobacilos, también generan proteasas que pudieran actuar como bactericidas, hecho demostrado por Barrantes y col. [2].

**TABLA 1
ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA EN EL QUESO DE CAPA A DIFERENTES CONCENTRACIONES SEGÚN LA ESCALA DE MCFARLAND DE LACTOBACILOS COMERCIALES / ANTAGONISTIC ACTIVITY SPECTRUM IN THE LAYER CHEESE AT DIFFERENT CONCENTRATIONS ACCORDING TO THE MCFARLAND SCALE OF COMMERCIAL LACTOBACILLI**

Unidades de Lactobacillus acidófilos comercial	Concentración de <i>E. coli</i> (escala de Mcfarland)	Diámetro de inhibición
6×10^6	6×10^8 UFC/mL	5,0 mm
		7,0 mm
		8,0 mm
		10,0 mm
$1,5 \times 10^7$	6×10^8 UFC/mL	4,0 mm
		5,0 mm
		9,0 mm
		10,0 mm
3×10^7	6×10^8 UFC/mL	3,0 mm
		10,0 mm
		5,0 mm
6×10^7	6×10^8 UFC/mL	9,0 mm
		8,0 mm
		9,0 mm

UFC/mL: unidades formadoras de colonias por mililitros.
mm: milímetro.



Diámetro de los halos inhibición de *E. coli* frente a *Lactobacillus* spp.

FIGURA 4. ESPECTRO DE ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMERCIALES FRENTE A *Escherichia coli*, AISLADAS DEL QUESO CAPA / ANTAGONIST ACTIVITY SPECTRUM OF COMMERCIAL LACTIC ACID BACTERIAS IN FRONT TO *Escherichia Coli*, ISOLATED FROM LAYER CHEESE.

CONCLUSIONES

Los ensayos realizados mostraron que estos quesos estaban contaminados con *Escherichia coli*, un indicador de contaminación fecal, además demuestra una manipulación higiénica deficiente durante la elaboración del producto. Como se ha visto, el potencial de las bacterias productoras de bacteriocinas es muy alto y es además un campo en el que la investigación básica debe continuar desarrollando. Los resultados del espectro inhibitorio demuestran la sensibilidad de microorganismos patógenos (*Escherichia coli*), frente a *Lactobacilos*. Las bacteriocinas ejercen su poder antimicrobiano ante microorganismos relacionados o presentes en su ambiente, disminuyendo la presencia de causantes del deterioro y/o de patógenos en los alimentos.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al programa Ingeniería de Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Cartagena, Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ARQUÉS, J. Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnologías Agrarias (INIA). Tesis Doctoral. Madrid. 52 pp. 2003.

[2] BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionales

a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 **Archiv. Latinoam. de Nutr.** 54(3): 293-297. 2004.

- [3] BROMBERG, R.; MORENO, I.; LOPES, C.; DELBONI, R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Rev. Braz. J. of Microb.** XXV:137-144.2004.
- [4] DAVIDSON, M. P.; HOOVER, D.G. Antimicrobial components from Lactic Acid Bacteria. **Lactic Acid Bacteria.** Salminen, S.; Von Wright, A. (Eds), Marcel Dekker Inc; New York. 127 pp. 1993.
- [5] DOWELL, V.R.; HAWKINS, T.M. Anaerobic bacteria. CDC laboratory manual. **Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology.** Atlanta Center for Disease Control. 96-98 pp.1981.
- [6] ESTRADA, A.; GUTIÉRREZ, L.; MONTOYA, O. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. Contra *salmonella* spp. y *Escherichia coli*. **Rev. FCA.** LVII: 2601-2609.2005.
- [7] GALLEGOS, J.; ARRIETA, G.; MÁTTAR, S.; POUTOU, R.; TRESPALACIOS, A.; CARRASCAL, A. Frecuencia de *Listeria* spp. en quesos colombianos costeños. **Rev. Científ. MVZ.** 2: 996-1012. 2007.
- [8] GUTIÉRREZ, L.; ACOSTA, E. Determinación del potencial bactericida *In vitro* de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli*. **Rev. Lasallista de Invest.** 5(2): 68-73. 2008.
- [9] IRIGOYEN, A. Caracterización del queso elaborado con diferentes tipos de cuajo., Universidad Pública de Navarra, Pamplona-Iruña Tesis Doctoral. 86-124 pp. 1999.
- [10] DELGADO, C.; MAURTUA, D. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. **Rev. Panam. Sal. Publ.** XXIV: 157-163. 2003.
- [11] LÓPEZ, B.; DOMINGO, D. Antibioticoterapia con probióticos. **Rev. Esp. Quimioterap.** XX: 170-181. 2007.
- [12] LENNETTE, E.; BALOWS, A.; HAUSLEY, W.; TRUANT, T. *E. coli*. In: **Manual of clinical Microbiology.** 3rd Ed. American Society for Microbiology. Washington, US. 263-270 pp. 1980.
- [13] LI, R.; NIX, D.; SCHENTAG, J. New turbidimetric assay for quantification of viable bacteria densities. **Antimicrobial Agents and Chemoth.** 2: 371-374. 1993.
- [14] LUCA, L.; VARCAMONTI, M.; NACLERIO, G.; DE FELICE, M. Purification and partial characterization of bacteriocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Microbial Cell Fact.** 1(1): 1-5. 2002.

- [15] MARQUEZ, J.; GARCÍA, C. Microflora patógena del queso blanco "telita" elaborado en cuatro estados de Venezuela. **Rev. An. Venez. Nutr.** XX: 17-21. 2007.
- [16] MINISTERIO DE SALUD DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA. Recuento de microorganismos aerobios Mesófilos. **Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano.** Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y Alimentos (INVIMA). Bogotá. 110-111 pp. 1998.
- [17] MINISTERIO DE SALUD DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA. Resolución 01804. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA). Bogotá. 9 pp. 1989.
- [18] TAGG, J.R.; MACGIVEN, A.R. Assay Sistem for Bacteriocins. **Appl. Microbiol.** 21:943. 1971.
- [19] TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40: 722-756. 1976
- [20] THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; SKINNER, J.A.; GRAHAM, A. Antimicrobial drug resistance in non-typhoidal salmonellas from humans in England and Wales in 1999: decreased in multiple resistance in *Salmonella enterica* serotypes *typhimurium*, Virchow, and Hadar. **Microbiol. Drug.** 6(1): 319-325. 2000.
- [21] VÁSQUEZ, M.; SUÁREZ, H.; ZAPATA, S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. **Rev. Cientif. Nutr.** XXXVI: 64-71. 1999.
- [22] WILKINSON, K. The biosecurity of on-farm mortality composting. **J. Appl. Microbiol.** 102(3): 609-618. 2007.
- [23] ARQUÉS, J.; RODRIGUEZ, E.; MÉDINA, M. Antimicrobial activity of nisin, reuterin, and the Lactoperoxidase System on *Listeria monocitogenes* and *Staphylococcus aureus* in Cuajada a semisolid Dairy Product Manufactured in Spain. **J. Dairy Sci.** 91(1): 70-75. 2007.
- [24] GAITAN, R.; DURAN, M.; FRANCO, L.; Acción Antiinflamatoria preliminar de los Extractos de las Esponjas Marinas *Xestospongia rosariensis* y *X. proxima* utilizando los Modelos Edema Plantar Inducido por Carragenina y Polimorfonuclear Neutrofilo. **Actual Biol.** 27(1): 11-15. 2006.