



EVALUACION IN VITRO MEDIANTE PRUEBAS DE DIFUSION EN AGAR, DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACIDOS PROPIÓNICO Y BUTÍRICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella enteritidis* Y *Listeria monocytogenes*.

Danny Armando Piscioti Ortega*; Enrique Alfonso Cabeza Herrera*; **Rodolfo Andrés Cabeza Herrera*.**

*Programa de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Pamplona, Norte De Santander. Colombia.

Resumen

Salmonella enteritidis y ***Listeria monocytogenes*** son bacterias que se encuentran distribuidas en la naturaleza, pudiendo contaminar varios tipos de alimentos frescos o procesados, son muy adaptables a diferentes condiciones fisicoquímicas, pero también demuestran una elevada patogenicidad para el hombre, por lo que se considera de importancia desde el punto de vista de salud pública y de inocuidad alimentaria; en el campo de la tecnología de los alimentos, se hace imprescindible estudiar su comportamiento y los diferentes métodos que puedan alterar los mecanismos de crecimiento bacteriano, que puedan ser aplicables, siempre y cuando, su uso demuestre eficiencia e inocuidad. En el desarrollo de esta investigación, se pretendió, establecer “in vitro”, por el método de difusión en disco la capacidad inhibitoria de dos sustancias usadas comúnmente como lo son los ácidos Propiónico y Butírico, este trabajo se desarrollo en los laboratorios del GIMBIO grupo de Investigación de Microbiología de la Universidad de Pamplona, donde se obtuvo como resultado que se requiere una CMI de 10mg/ml, para generar un halo inhibitorio sobre ambos microorganismos de prueba, sin importar el ácido empleado, de igual manera de acuerdo al Análisis de Varianza, se determinó que el diámetro del halo, depende directamente de la concentración del ácido empleado ($p < 0,01$), los cuales se comportan de manera similar sin importar el microorganismo, pero, que para ***L. monocytogenes*** se observa una mayor sensibilidad, la cual, es estadísticamente significativa cuando los ácidos se encuentran en concentraciones mayores al 50%. A partir de estos resultados se demuestra que es posible implementar el uso de estos ácidos representando una alternativa útil para el control de bacterias patógenas en alimentos, pero, debido a sus fuertes propiedades sensoriales, estos se limitarían solo a ser empleados en alimentos cárnicos o lácteos de tipo madurado o fermentado.

Palabras clave. Ácidos Grasos de Cadena Corta, Inhibición, Difusión en Agar.



EVALUATION IN VITRO BY AGAR DIFFUSION TEST, THE INHIBITORY EFFECT OF THE ACIDS OF PROPIONIC AND BUTYRIC ACIDS ON THE GROWTH OF *Salmonella enteritidis* AND *Listeria monocytogenes*.

Abstract

Salmonella enteritidis and ***Listeria monocytogenes*** are bacteria that are distributed in nature, can contaminate many kinds of fresh and processed foods, and are very adaptable to different conditions, also demonstrate high pathogenicity in humans. That is why the study of these bacteria is considered important with regard to the fields of public health and food safety; in the field of food technology, it is essential to study their behavior and the different methods that can alter the mechanisms of bacterial growth, that may be applicable, when their use demonstrates efficiency and safety. This research, we wanted to establish "in vitro" by the disk diffusion method, the inhibitory capacity of two substances commonly used as preservatives, which are the propionic and butyric acids.

This work was carried out at the laboratories of GIMBIO Microbiology Research Group at the University of Pamplona, where it was found that a minimum inhibitory concentration MIC of 10mg/ml is required to generate a zone of inhibition on both test microorganisms, regardless of the acid used. According to analysis of variance ANOVA, it was determined that the diameter of the halo, depends directly on the concentration of acid used ($p < 0.01$), behave similarly regardless of the microorganism, but, for *L. monocytogenes*, an increased sensitivity is observed when an increase in the area of inhibition is generated which is statistically significant when the acids are present in concentrations greater than 50%

From these results, it can be demonstrated that it is possible to implement the use of these acids as a useful alternative for the control of pathogenic bacteria in food. However, because of their strong sensory properties, these would be limited only to be used in aged or fermented type meat or dairy products.

Keywords: Short Chain Fatty Acids, Inhibition, agar diffusion

*Para citar este artículo: Pisciotti Ortega DA; Cabeza Herrera EA; Cabeza Herrera RA. Evaluación in vitro mediante pruebas de difusión en agar, del efecto inhibitorio de los ácidos propiónico y butírico sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* Y *Listeria monocytogenes*. Bistua.2014.12(1):82-92

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas: Pisciotti Ortega DA.. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Programa de Microbiología. Universidad de Pamplona, Norte De Santander. Colombia. email: dapior@outlook.com

Recibido: Octubre 20 de 2013 Aceptado: Mayo 05 de 2014

INTRODUCCION.

Las infecciones e intoxicaciones bacterianas son un tema de real importancia de salud pública, puesto que microorganismos como: ***Escherichia coli***, ***Salmonella*** spp. ***Vibrio cholerae***, ***Listeria monocytogenes***, poseen una incidencia alta respecto a la morbilidad y mortalidad al entrar al contacto con humanos (Pardo, L. et, al 2002; Crespo, M. et, al. 1999; O.P.S. 1998; Weiss, J. et, al. 1975)

El género ***Salmonella*** spp está constituido por bacilos cortos gram negativos, estrechamente relacionados morfológica y fisiológicamente con los otros géneros de la familia Enterobacteriaceae a la que pertenecen (Trepát, M. 2002; Miller, S. et, al 2001). Actualmente este grupo alberga 2700 serovariedades todas móviles con flagelos peritricos, con la excepción de la serovariedad gallinarum-Pollorum, (Brunia, A. 2008; Trepát, M. 2002). Crece en un amplio rango de temperatura (7°-48° C), pH (4 - 8), y con actividades de agua (aw) por debajo de 0.933. (Vadillo, S. et, al. 2002). Causa un amplio número de manifestaciones clínicas en los seres humanos como son fiebres entéricas, gastroenteritis, bacteriemia, infecciones localizadas, y estado de portador crónico (Pegues, D. Et, al. 1999; Acha, P. et, al. 2001). El género ***Listeria*** spp, está compuesto por cocobacilos gram positivos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, no capsulados, catalasa positiva, móviles entre 10 y 25°C (Callejo, R. et, al. 2008; Farber, J. et, al. 1991), aunque no es esporulado, posee altas capacidades de supervivencia en diferentes condiciones,

lo que lo caracteriza como un microorganismo resistente, dentro de estas propiedades se puede encontrar su crecimiento a pH bajos (entre 2 y 4) su halotolerancia y su capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2 - 4 °C), se puede encontrar en el suelo y hace parte de la microbiota fecal de muchos mamíferos, de allí puede contaminar alimentos crudos, leches, pescado, pavo y carnes frescas y procesadas de pollo o res, pudiendo representar un riesgo para la salud desde el punto de vista alimentario (Crespo, M. et, al. 1999; Rocourt, J. et, al. 1997; Weiss, J. et, al. 1975)

Los ácidos grasos volátiles libres de cadena corta (AGCC), ácidos carboxílicos de 2 a 5, productos intermedios de la degradación anaerobia de materia orgánica, y corresponden al producto de la etapa acidogénica y a su vez son sustrato de la etapa acetogénica (Lambert, R. et, al.1999) son constituyentes naturales de los tejidos animales y vegetales. (Partanen y Mroz. 1999)

Los AGCC, pueden ser clasificados como aditivos alimentarios reguladores de la acidez o conservantes (Batstone, D. et, al. 2002) donde su importancia permitirá reemplazar el uso de antibióticos en alimentos (Dibner J.J., et, al. 2002; Skrivanova, E. et, al. 2006). Existen múltiples efectos asociados a los ácidos grasos de cadena corta, pero, solo aquellos de bajo peso molecular son bactericidas (Vasquez, S. et, al. 2009; Sanz, Y. et, al. 2004; Lambert, R. et, al. 1999) dicho resultado se debe gracias a que estas sustancias poseen una

naturaleza lipofílica lo que les permite difundirse fácilmente al interior de la bacteria, (Mateos, G. et, al. 2007) una vez dentro de la célula, de acuerdo a lo descrito por Russel en 1992, los efectos tóxicos se generan por la acumulación de aniones polares en el citoplasma, dato que fue corroborado por Lambert y Stratford en 1999, donde responsabilizan como principal elemento responsable del proceso a los aniones (A-) y protones (H+) generados por la disociación del ácido produciendo una acidificación del citoplasma, derivando así en una respuesta celular quien mediante un gasto energético trata de equilibrar el pH y la concentración intracitoplasmática que a un efecto letal.

La experimentación "in vitro" (en laboratorio) permite conocer esta capacidad ya que no se puede predecir la susceptibilidad que poseen las bacterias a los agentes antimicrobianos, es necesario desarrollar y estudiar las pruebas de sensibilidad individual de cada patógeno, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado, el más activo contra el patógeno, con las características apropiadas tales como la concentración, el diluyente y el periodo de aplicación. (Taroco, R. et, al. 2006; Rodríguez, J. et, al. 2001). El método de difusión en agar suele ser el preferido en varios procesos de experimentación por su sencillez y rapidez en la aplicación y lectura de resultados, implementado por Alexander Flemming, este concepto se ha aplicado por más de 70 años, aunque se reconoce a los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck como los responsables del método que se emplea hoy en día bajo la adaptación de la NCCLS y la determinación de las variables influyentes

y de referencia (Martin, C. et, al. 2007; Coyle, M. 2005; Bauer, A. et, al. 1966). La prueba de difusión en agar, al ser una prueba de tipo cualitativo solo se puede determinar la característica de la bacteria en relación al diámetro de inhibición (Sensible, Intermedio y resistente), este valor aunque puede ser relacionado con la CMI es menos exacto ya que el requerimiento de la prueba limita el número de ensayos por tal motivo los datos se pueden ajustar en función de la actividad de otras sustancias antibióticas reportadas por la la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS document M02-A11 2012, M100-S22 2012, M07-A9. 2012) Es de analizar que cada sustancia con efectos antibacterianos tiene su propio halo de inhibición específico y este es determinado por el tamaño de la molécula, su polaridad y su concentración, por tal motivo no es posible afirmar en las pruebas para una cepa determinada que un grupo bacteriano sea más sensible a un compuesto A que a uno B solo porque el primero tenga un halo de inhibición mayor. (Ferraro, M. et, al. 2000; Herrera, C. 1999)

MATERIALES Y MÉTODOS.

REACTIVOS. Para el desarrollo del proyecto se emplearon los siguientes productos de diferentes casas comerciales. ACIDO PROPIONICO FLUKA (Sigma-Aldrich) pureza >99.5%, ACIDO BUTIRICO FLUKA (Sigma-Aldrich) pureza >98.0

CEPAS BACTERIANAS. Las cepas bacterianas de estudio, correspondieron a ***Salmonella enteritidis ATCC 7644*** VAR. **Enteritidis** y

Listeria monocytogenes ATCC 13076, cultivos de cuarta generación, facilitados por el Cepario de Microbiología de los Laboratorios de la Universidad de Pamplona.

PRUEBAS DE DIFUSION EN AGAR

Para esta prueba que se realizó por triplicado, se generaron distintas concentraciones (porcentajes) de los ácidos de prueba, diluidos en agua destilada estéril (100%, 85%, 70%, 65%, 50%, 35%, 20%, 5%, 1% y control 0%). Para el método de difusión se utilizaron placas de Petri de 10 cm de diámetro, con 20 ml de agar Mueller-Hinton (Difco), mantenidas y atemperadas a 37°C; A partir de un cultivo del microorganismo mantenido a 35 °C por 24 horas en agar tripticasa de soya (TSA Merck), se preparó un inóculo de turbidez patrón mcfarland 0,5. La superficie del medio de cultivo se hisopo en varias direcciones y se dejó secar durante 15 minutos en incubadora, a 36 ± 2 °C. Posteriormente se acomodaron, por cada caja inoculada, cuatro discos de papel Whatman N° 1 estéril, de 5 mm de diámetro cargado cada uno con 0.1 ml de cada solución de los ácidos, disponiendo estos de manera aleatoria sobre el medio de cultivo, en patrones que quedarán distanciados a 3 cm del borde de la caja y separados entre ellos con una distancia de 4 cm. Los medios de cultivo se incubaron en aerobiosis a 37 ± 2 °C por veinticuatro horas y se leyeron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros, para analizar finalmente los promedios de los mismos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la respuesta bacteriana se planteó un diseño experimental factorial, de dos bacterias, con dos ácidos de prueba a diez concentraciones diferentes por tres repeticiones, dicho análisis se sustentó con un análisis de varianza ANOVA y una prueba de DHS de Tukey para establecer el efecto de la concentración. Empleando la h_0 "los diámetros del halo para las bacterias se comportan de manera similar (son iguales), independientemente del ácido y la concentración utilizada".

RESULTADOS Y ANALISIS.

Los datos recolectados de los halos de inhibición para el ácido Propiónico se promediaron y se compararon para cada microorganismo como se muestra en la tabla 1. Se puede apreciar que **Listeria monocytogenes** presenta mayores valores de inhibición (halos con casi el doble de diámetro) en las pruebas sin importar el tipo de ácido.

Tabla 1. Asociación de los resultados obtenidos de la prueba de difusión empleando los dos organismos de prueba.

ACIDO PROPIONICO						
Disco	Concentración		<i>Salmonella enteritidis</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	%	gr/ml	PROM. mm	Desv. Estdr.	PROM. mm	Desv. Estdr.
1	100	1	18.7	0,5773	31	1,7320
2	85	0,85	16.7	0,5773	27.3	0,5773
3	70	0,7	14.7	0,5773	23.7	1,5275
4	65	0,65	13.7	7,8102	21.7	0,5773
5	50	0,5	11.7	0,5773	18	2,0000
6	35	0,35	9.3	2,5166	14	1,7320
7	20	0,2	7.3	0,5773	10.7	0,5773
8	5	0,05	5.7	0,5773	7.1	4,0414
9	1	0,01	5.1	2,8867	5.1	2,8867
10	0	0	5	0,0	5	0,0
ACIDO BUTIRICO						
Disco	Concentración		<i>Salmonella</i>		<i>Listeria</i>	

	<i>enteritidis</i>				<i>monocytogenes</i>	
	%	gr/ml	PROM.	Desv.	PROM.	Desv.
		mm	Estdr.	mm	Estdr.	
1	100	0,964	19.7	1,15470	32.3	3,05505
2	85	0,819	17.3	1,15470	28.7	2,51661
3	70	0,675	14.7	0,57735	24.3	4,72581
4	65	0,627	13.7	0,57735	22.7	1,15470
5	50	0,482	11.7	0,57735	19	1
6	35	0,337	9.7	1,52752	14.7	2,0816
7	20	0,193	7.3	0,57735	11	1
8	5	0,048	5.3	0,26457	7.3	0,57735
9	1	0,01	5	0	5.2	0,05773
10	0	0	5	0	5	0

A partir de los resultados obtenidos, se establece que la mínima cantidad que se requiere para lograr la inhibición de *Salmonella enteritidis* es de 0.01gr/ml de ácido Propiónico y 0.048gr/ml de ácido Butírico, mientras que para *Listeria monocytogenes* es de 0.01 gr/ml para cualquier ácido, dato que corresponde a la CMI, pero, de acuerdo a la baja sensibilidad de la prueba, se entiende que este es el valor más bajo detectable, lo que correspondería al límite mínimo de detección puesto que al 1% de cualquier ácido la formación del halo y su identificación es casi despreciable o imperceptible.

En cualquiera de los dos casos, se ve un comportamiento similar donde *Salmonella enteritidis* presenta menores halos de inhibición que *Listeria monocytogenes*, lo que podría suponer una ligera susceptibilidad de este último a los ácidos grasos de cadena corta evaluados, de igual manera, podría establecerse que el desarrollo de esta prueba y sus resultados supone datos muy generales ya que solo estima la reacción por contacto (difusión) donde para ambos ácidos bajas concentraciones no generan halos mayores pues la capacidad para difundirse en una

superficie sólida es menor, además, la conformación de la prueba no permite establecer con claridad y especificidad la reacción a bajas concentraciones puesto que depende muchas veces de la subjetividad del analista en cuanto a la medición y lectura del diámetro se refiere.

Tabla 2. ANOVA para el diseño factorial “ácido – concentración” en *Salmonella enteritidis*

Variable dependiente: DIAMETRO DEL HALO					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1449,74 ^a	19	76,302	100,6	0,00
Intersección	7072,03	1	7072,03	9329,8	0,00
ACIDO	0,323	1	0,323	0,426	0,51
CONCENTRACION	1447,19	9	160,799	212,1	0,00
ACIDO * CONCENTRACION	2,234	9	0,248	0,327	0,96
Error	30,320	40	0,758		
Total	8552,10	60			
Total corregida	1480,06	59			

a. R cuadrado = 0,980 (R cuadrado corregida = 0,970)

La variabilidad en el modelo de acuerdo al Análisis de varianza “ANOVA” (tabla 2) para *Salmonella enteritidis*, se explica en un 98% por los efectos: Ácido, Concentración y su interacción. No existen diferencias entre las medias para diámetro del halo en la bacteria con respecto a los ácidos utilizados ($p = 0,518$); es decir, el diámetro del halo es similar independientemente del tipo de ácido utilizado. No existen diferencias entre las medias para diámetro del halo en la bacteria con respecto a la interacción ácido*concentración ($p = 0,96$)

Puede establecerse también, que la concentración del ácido incide significativamente en el diámetro del halo de la bacteria analizada ($p < 0,01$); donde, a mayor concentración del ácido, mayor es el diámetro del halo de inhibición. La

88

diferencia para el diámetro del halo, empieza a ser significativo después de una concentración del ácido superior o igual al 20%.

Respecto a las Diferencias Honestamente Significativas (DHS), la prueba de Tukey (Tabla 3), para *Salmonella enteritidis*, se demuestra que a una concentración superior ó igual al 85%, el ácido Butírico logra un mayor diámetro del halo inhibitorio, que el ácido Propiónico, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Tabla 3. Prueba DHS de Tukey para la concentración de los ácidos de prueba sobre *Salmonella enteritidis*

DIAMETRO DEL HALO		Subconjunto							
DHS de Tukey ^{a,b}	CONC.	N	1	2	3	4	5	6	7
	0%	6	5,00						
	1%	6	5,05						
	5%	6	5,48						
	20%	6		7,33					
	35%	6			9,50				
	50%	6				11,6			
	65%	6					13,7		
	70%	6						14,6	
	85%	6							17,0
	100%	6							19,1
	Sig.		0,99	1,00	1,00	1,00	0,65	1,00	1,00

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b. Alfa = 0,05.

Para los resultados de la prueba de acuerdo al Análisis de varianza “ANOVA” empleando a *Listeria monocytogenes* (Tabla 4), la variabilidad en el modelo se explica en un 97,7% por los efectos: Ácido, Concentración y su interacción. Se establece que no existen diferencias entre las medias para diámetro de los halo con respecto al ácido utilizado ($p = 0,138$); es decir, el diámetro del halo inhibitorio es

similar sin importar si el ácido es Propiónico o Butírico.

Tabla 4. ANOVA para el diseño factorial “ácido – concentración” en *Listeria monocytogenes*.

Variable dependiente: DIAMETRO DEL HALO					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5040,04 ^a	19	265,26	89,36	0,00
Intersección	16706,69	1	16706,6	5627,9	0,00
ACIDO	6,801	1	6,801	2,291	0,13
CONCETRACION	5030,09	9	558,89	188,2	0,00
ACIDO*CONCETRACION	3,15	9	0,351	0,118	0,99
Error	118,74	40	2,969		
Total	21865,48	60			
Total corregida	5158,78	59			

a. R cuadrado = 0,977 (R cuadrado corregida = 0,966)

De igual manera, se establece, que no existen diferencias entre las medias para diámetro del halo respecto a la interacción ácido*concentración ($p = 0,99$), por otro lado, podría establecerse al igual que las pruebas con *Salmonella enteritidis*, que la concentración del ácido utilizado, es el factor que más incide significativamente en el diámetro del halo de la bacteria analizada ($p < 0,01$).

Tabla 5. Prueba DHS de Tukey para la concentración de los ácidos de prueba sobre *Listeria monocytogenes*

DIAMETRO DEL HALO		Subconjunto							
DHS de Tukey ^{a,b}	CONC.	N	1	2	3	4	5	6	7
	0%	6	5,0						
	1%	6	5,15						
	5%	6	7,21						
	20%	6		10,83					
	35%	6			14,33				
	50%	6				18,5			
	65%	6					22,1		
	70%	6						24,0	
	85%	6							28,0
	100%	6							31,6
	Sig.		0,45	1,00	1,00	1,00	0,70	1,00	1,00

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

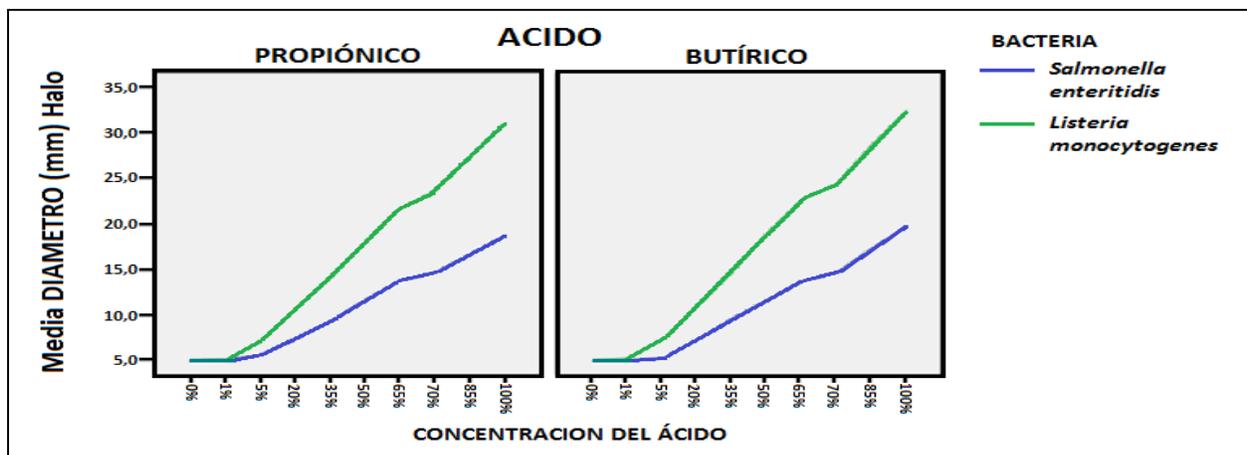
b. Alfa = 0,05.

Respecto a las Diferencias Honestamente Significativas (DHS), la prueba de Tukey (Tabla 5), para *Listeria monocytogenes*, la diferencia para el promedio del diámetro del halo empieza a ser significativa después de una concentración del ácido superior o igual al 20% para cualquiera de los dos ácidos, lo que permite suponer que se comportan de manera similar.

Como se aprecia en la figura 1, a partir de una concentración superior ó igual al 5%, se observa un mayor diámetro de

inhibición para *Listeria monocytogenes* empleando cualquiera de los dos ácidos, lo que supondría una mayor sensibilidad de este microorganismo frente a ácidos orgánicos, ahora bien, comparando ambos ácidos estos presentan mayores diferencias en el efecto inhibitorio cuando se encuentran en concentraciones iguales o superiores a 50% donde de nuevo corroborando la susceptibilidad hacia para *Listeria monocytogenes* este resultado es mayor cuando se emplea ácido Butírico; No obstante, esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Figura 1. Comparación de los Promedios de los halos inhibitorios respecto a los ácidos utilizados.



CONCLUSIONES.

La menor concentración obtenida en la prueba capaz de disminuir el crecimiento tanto de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* fue de 1% (10mg/ml) tanto para el ácido Propiónico como para el ácido Butírico.

Al comparar el promedio de los diámetros de halo entre bacterias, según tipo de ácido utilizado y concentración del mismo,

se logró determinar que el diámetro del halo es significativamente mayor en *Listeria monocytogenes* cuando se utiliza ácido Propiónico a una concentración superior ó igual al 5% ($p < 0,05$) y cuando se utiliza ácido butírico a una concentración superior ó igual al 1% ($p < 0,05$).

Como es de esperarse, para el caso de los ácidos orgánicos, la concentración del ácido influye directamente sobre el



90

diámetro del halo ($p < 0,01$), sin importar el ácido o el microorganismo de prueba.

De acuerdo a lo propuesto por varios autores, la razón principal del porque los ácidos orgánicos son más activos frente a procesos inhibitorios en comparación a ácidos inorgánicos, así posean menor coeficiente de disociación, es que, los primeros, son más lipofílicos por lo que difunden más fácilmente a través de la membrana, actividad que es mayor cuando se trabaja a temperaturas cercanas a 37° centígrados.

Para efectos de establecer el uso adecuado de los ácidos Propiónico y Butírico en la industria alimentaria, consideramos que se deben realizar otro grupo de pruebas con matrices alimentarias, pero que debido a las fuertes propiedades sensoriales de estos ácidos, se recomienda ser empleados en alimentos de tipo cárnico o láctico madurado o fermentado, puesto que sus propiedades volátiles podrían influir negativamente en otro tipo de alimentos.

BIBLIOGRAFIA.

Acha, PN, Szyfres B. (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3aed. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud (OPS); p. 240-246.

Batstone, D.J.; Keller, J.; Angelidaki, I.; Kalyuzhnyi, S.V.; Pavlostathis, S.G.; Rozzi, A.; Sanders, W.T.M.; Siegest, H. and V.A. Vavilin. (2002). "Anaerobic Digestion Model No 1". IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic

Digestion Processes. Scientific and Technical Report N° 13. IWA Publishing. United Kingdom.

Brunia, A. Foodborne Microbial Pathogens. (2008). Ed Springer. USA pp 201-216.

Callejo, R. et al. 2008. Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. *Rev. argent. microbiol.* Vol.40, n.2, pp. 89-92. ISSN 1851-7617.

Crespo M, Vélez J, Castañeda C, Hoyos F, López M, Salazar J. (1999). Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Revista Colombia Médica.* Universidad del Valle. Vol. 30 N° 2.

Dibner, J. J. and P. Buttin. (2002). Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J. Appl. Poult. Res.* 11: 453-463.

Farber J M, and P I Peterkin. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 55:476-511.

Ferraro, M. Jorgensen J National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Performance Standards for Antimicrobial Disks Susceptibility Tests. Approved Standard- Seventh Edition. Vol 20, N° 1 M2-A7 NCCLS.

Herrera, Marco. Luis. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera versión impresa* ISSN 1017-8546 *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)* v.34.



- Lambert R.J. M. Stratford. (1999). Weak acid preservatives : modeling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 86, 157-164.
- Mateos, Gonzalo; Medel, Pedro. (2007). Acidificantes en nutrición porcina La página del cerdo [Disponible en: www.3tres3.com/nutricion/acidificantes-en-nutricion-porcina_1789/][Fecha de consulta Octubre 2011]
- Miller, Samuel. Ohl, Michael. (2001). Salmonella: A Model for Bacterial Pathogenesis. *Annual Review of Medicine* Vol. 52: 259-274. DOI: 10.1146/annurev.med.52.1.259
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS (2008). M23-A3. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters; approved guideline – Third edition
- National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. (2012). M100-S22. Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing; Twenty-second informational supplement.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS (2012). M07-A9. Methods for dilution Antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow Aerobically; Approved standard – Ninth edition.
- Organización Panamericana de la Salud O.P.S. (1998). Prevención y Diagnóstico de enfermedades. Informe Anual del Director. O.P.S. Washington D.C.,: 65-79p.
- Pardo L, Molina D, Catañeda S. (2002). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en derivados lácteos analizados en el laboratorio de salud pública de la Secretaria Distrital de Salud de Bogotá en el 2001 y 2002.
- Partanen, K.H. and Z. Mroz. (1999). Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.*, 12: 117.
- Pegues D, A, et al. (1999). Nontyphoidal salmonellosis. En *Tropical Infectious Diseases Principles, Pathogens, & Practice*, Churchill Livingstone, Philadelphia, 296-308.
- Rocourt, J. et al. (1997). *Listeria monocytogenes*. En *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers* Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, ASM Press, Washington DC, 337-352
- Rodríguez, José y otros. (2001). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. [Disponible en:www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap12.htm]
- Sanz, Y. Collado, M. Haros, M, Dalmau J. (2004). Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC). Burjassot. Valencia. *Acta Pediatrica Española*, Vol. 62, N.o 11
- Skrivanova, E; Marounek, M; Benda, V; Brezina, P. (2006). Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids



and monolaurin. *veterinarni medicina*, 51, (3): 81–88 original paper 81

Taroco, R. Seija, V. Vignoli. R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de bacteriología y virología médica.

Trepat, M. (2002). Incidencia y comportamiento de Salmonella y Listeria en pechugas de pavos curadas. Tesis doctoral. Médico Veterinario. Universidad autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Vadillo S; Piriz, S y Mateos, E. (2002). Manual de Microbiología Veterinaria (pp. 327-338). Madrid: Editorial McGraw Hill

Vásquez, M. Sandra. Suárez, Héctor. Zapata, B. (2009). Artículos de actualización utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Rev Chil Nutr Vol. 36, N°1, Marzo 2009

Weiss, Seiger H. (1975) Incidence of Listeria monocytogenes in Nature. Appl Microbiology. American Society for Microbiology. U.S.A. July 1975; 30: 29-32.