

EFFECTO PROTECTOR DE UN ANTIMICROBIANO NATURAL FRENTE A *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* EN SALCHICHA Y MORTADELA

Andrea ZAPATA A.*¹, Kenneth Roy CABRERA², Carlos Eduardo MEJÌA³, Uriel SEPÚLVEDA⁴, Diego A. RESTREPO M.⁴

¹ Departamento de Innovación y Desarrollo. Tecnas S.A. Cra. 50G N° 12 Sur 24. Itagüí-Colombia.

² Escuela de Geociencias. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. A.A. 1779. Medellín, Colombia.

³ Escuela de Microbiología. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

⁴ Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. A.A. 1779. Medellín, Colombia.

*Corresponding Author: azapata@tecnas.com.co

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) y *E. coli* (ATCC 25922) en salchicha y mortadela formuladas con un Antimicrobiano natural a partir de extracto de romero (0,3% y 0,65%), se diseñó una prueba de desafío microbiano para cada microorganismo durante la vida útil comercial de los productos (6 semanas); conformándose cuatro tratamientos representados por las dos concentraciones del Antimicrobiano Natural, Lactato de Sodio (2.5%) y un control sin adición de antimicrobiano. Las salchichas fueron inoculadas con *E. coli* ($1 \times 10^{2-3}$ UFC/g), mientras que las mortadelas fueron inoculadas por separado con *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* ($1 \times 10^{2-3}$ UFC/g); posteriormente todos los productos fueron empacados al vacío y almacenados a temperatura de refrigeración (4-5°C).

Semanalmente, se determinó el recuento de estas bacterias y se realizaron pruebas microbiológicas de rutina y detección de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. en los productos que no habían sido inoculados. De acuerdo con las estimaciones obtenidas a partir de modelos matemáticos, el Antimicrobiano natural a las dosis estudiadas (0.3 y 0.65%) reduce más del 50% la población de *E. coli* y *L. monocytogenes* a partir de la segunda semana, y se inhibe el 100% de la población únicamente a la dosis más alta de Antimicrobiano natural para la segunda y tercera semana; respectivamente. En el caso de *S. Typhimurium* ninguno de los antimicrobianos estudiados logró inhibir completamente al microorganismo, el 100% de la inhibición se observó al final del estudio en los productos que contenían 0,65% de Antimicrobiano natural ó 2,5% Lactato de Sodio.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con los reportes del *Centers for Disease Control and Prevention, CDC*, hasta el 2010, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*, se encontraban en la lista de las 5 bacterias más comúnmente asociadas a infecciones alimentarias, tanto en los países desarrollados como los que se encuentran en vía de desarrollo. Junto a *Campylobacter jejuni* y *Vibrio*, estas bacterias son las causantes de la mayoría de los casos confirmados de infecciones alimentarias en EEUU (www.cdc.gov, 2011).

Por sus características intrínsecas, los productos y derivados cárnicos se encuentran entre los alimentos con mayor riesgo de ocasionar una infección causada por estas bacterias. Los productores además de adoptar adecuadas prácticas de manufactura y un correcto plan de desinfección en sus plantas, deben asegurar también la inocuidad durante el almacenamiento y distribución de sus productos. Una de las prácticas más empleadas para lograr este objetivo, es la adición de agentes antimicrobianos como el Lactato de Sodio, en las fórmulas cárnicas.

El lactato de sodio comúnmente se emplea en concentraciones entre el 1-3% (Brewer *et al.*, 1991; Lamkey *et al.*, 1991; Papadopoulos *et al.*, 1991; Bradford *et al.*, 1993; Brewer *et al.*, 1995) en productos y derivados cárnicos para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, microorganismos mesófilos y *Clostridium sporogenes* (Houtsma P.C., de Wit J.C. y Rombouts F.M., 1993; Miller y Acuff., 1994; Nychas G.J.E., Drosinos E.H. y

Board R.G., 1998). El efecto bacteriostático de las sales del ácido láctico se debe al aumento de la fase de latencia de los microorganismos. Sin embargo, pese a la efectividad antimicrobiana del Lactato de Sodio, las concentraciones en las que se observan los mejores resultados suelen ser muy elevadas comparadas con otros aditivos, y su aporte de sodio es por consiguiente, muy alto.

Particularmente en los últimos años, ha habido un creciente interés por el uso de antimicrobianos naturales (Tajkarimi M., Ibrahim S. y Cliver D., 2010; Ntzimani A., Giatrakou V. y Savvaidis I., 2010) entre los que se destacan los aceites esenciales de especias ricos en fenoles de reconocida actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009, Zheng *et al.*, 2009; Rattanachaiakunsopon P. y Phumkhachorn P., 2010; Hussain *et al.*, 2010) como carvacrol, eugenol y timol (Rodríguez A., *et al.*, 2007; Zhang H *et al.* 2009; Zheng Z. *et al.*, 2009; Pongsak y Phumkhachorn P., 2010).

Se ha sugerido que los extractos o aceites esenciales de las plantas que pertenecen a la familia de las *Lamiaceae*, como el romero (*Rosmarinus officinalis*) pueden reemplazar en su totalidad a los aditivos artificiales que se emplean comúnmente para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y alteradores de los alimentos. Los aceites esenciales derivados de especias y plantas tienen actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en niveles entre 0,2 y 10 µl/ml (Knobloch *et al.*, 1989; Burt, 2004), gracias a que alteran la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular y afectan negativamente los sistemas enzimáticos y el material genético (Lanciotti *et al.*, 2004; Skocibusic M., Bezic N. y Dunkic V., 2006; Burt *et al.*, 2007; Proestos *et al.*, 2008).

El Romero (*Rosmarinus officinalis L.*), se utiliza exitosamente en la industria de los alimentos por su actividad antioxidante, y como agente antimicrobiano se ha estudiado su acción frente a *Campylobacter* sp. (Klančnik *et al.*, 2009), Bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* O157:H7 y *Aeromonas hydrophila*; además de Gram positivas como *Listeria monocytogenes* (Kim J., Wei C.I y M.R. Marshall, 1995; Ouattara *et al.*, 1997; Daferera D.J., Ziogas B.N. y Polissiou M.G., 2000; Davidson P.M. y Naidu A.S., 2000; Angioni *et al.*, 2004; Gachkar *et al.*, 2007; Gutierrez J., Barry-Ryan C. y Bourke P, 2008; Gutierrez *et al.*, 2008; Lopes-Lutz *et al.*, 2008). El extracto de romero muestra una fuerte actividad antimicrobiana en carne de cerdo fresca y en rodajas de jamón envasado al

vacío y con atmósferas modificadas, frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Lactobacillus sake* (Zhang *et al.*, 2009).

Se ha demostrado *in vitro* que el extracto de romero, independiente de su naturaleza lipofílica o hidrofílica inhibe *L. monocytogenes* y una gran variedad de bacterias acidolácticas (Bubonja-Sonje M., Giacometti J. y Abram M., 2011).

Con el objetivo de evaluar el efecto inhibitor de *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) y *E. coli* (ATCC 25922) en salchichas y mortadelas formuladas con un Antimicrobiano natural a partir de extracto de romero, se diseñó una prueba de desafío. El seguimiento microbiológico para obtener el recuento de cada microorganismo se realizó semanalmente durante la vida útil comercial del producto.

1. Materiales y Métodos

Se elaboraron salchichas y mortadelas mediante metodología tradicional, según se presenta en Figura 1. Estos productos fueron inoculados por separado con *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*. Semanalmente se realizó un seguimiento microbiológico que sirvió para comparar la eficacia de los diferentes antimicrobianos.

1.1. Cepas bacterianas

La cepa de *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028) empleadas en este estudio se almacenaron, cultivaron y analizaron siguiendo las indicaciones del proveedor (Laboratorios Annar, Bogotá).

1.2. Formulación y elaboración de los productos

Para la elaboración de las salchichas se empleó carne bovina, Pasta /piel Pollo y pasta de pollo (Tyson[®], México) comprada a un proveedor local. Los demás ingredientes los proporcionó Tecnas S.A., Itagüí, Colombia. Estos son: Sabor natural Pollo (mezcla de especias y extractos), Almidón de papa (Aris[®], México), Sal (Refisal[®], Colombia), Proteína

Vegetal Hidrolizada (Levapan[®], Bogotá, Colombia), proteína aislada y texturizada de soya (Solae, LLC, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), Eritorbato de Sodio (C₆H₇NaO₆, Jepsen & Jessen G.m.b.H. & Co.), Tripolifosfato de Sodio (Na₅P₃O₁₀, Haifa Chemicals, Haifa, Israel) grado alimenticio, Nitrito de Sodio (6% nitrito de sodio, NaNO₂, 94% NaCl), Colorante Natural para Embutidos (Color Ful[®], Tecnas, Colombia), la oleoresina de romero (Kalsec[®], Estados Unidos) con el que se prepara el Antimicrobiano natural y el Lactato de Sodio (Galactic[®], Estados Unidos). La concentración de los principales componentes de la fórmula se muestra en la Tabla 1. Todas las fórmulas se balancearon garantizando el mismo % de humedad y % de sal para todos los tratamientos.

Mediante un estudio previo, usando el método de dilución en caldo se determinó la Concentración Mínima inhibitoria (CMI) en la cual el Lactato de Sodio y el Antimicrobiano natural compuesto principalmente por extracto de romero, inhibe todas las cepas de interés. En este estudio, se evaluó la efectividad de un Antimicrobiano natural a dos concentraciones (0,3% y 0,65%) y se comparó frente al control sin ningún tipo de agente microbiano en salchicha inoculada con *E. coli*, y mortadelas inoculadas por separado con *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, empacadas al vacío y almacenadas a temperatura de refrigeración (4-5°C). Semanalmente, se determinó el recuento de estas bacterias y se realizaron pruebas microbiológicas de rutina y detección de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. en los productos que no habían sido inoculados.

Tabla 1. Composición de los principales ingredientes de la salchicha y mortadela

INGREDIENTE	COMPOSICIÓN (%)
Res	12
Pasta de pollo	46
Tocino de cerdo/piel de pollo	13
Agua/Hielo	14.6(aprox.)
Almidón de papa	5.8
Proteína de Soya	3.0
Sal	1.1
Proteína Vegetal Hidrolizada	0,5
Polifosfato de sodio	0.4
Eritorbato de sodio	0.05
Nitrito de sodio	0.02

Para reducir el tamaño del material cárnico se empleó un molino de discos M22 R2 (C.I. Talsa, Medellín, Colombia). El material cárnico fue dividido en 4 porciones iguales, y se mantuvieron durante 24 horas en refrigeración (4°C) para su uso posterior. Transcurrido este tiempo, todos los ingredientes fueron adicionados a un Cutter Cruells de 15 L de capacidad (C.I. Talsa, Medellín, Colombia) en el orden que se muestra en la figura 1. La pasta fue posteriormente embutida usando una Embutidora Hidráulica Mainca EM-30 (C.I. Talsa, Medellín, Colombia), en funda de Amicel (Película Coextruida de 70 micras, Poliamida/Adhesivo/Capa sellante, PEBD) proporcionada por la empresa Alico S.A. (Medellín, Colombia). La masa así embutida fue fraccionada usando una Amarradora Manual (C.I. Talsa, Medellín, Colombia), y luego se llevó a cocción en un horno automático C.I. Talsa r100 1 carro (salchicha) o tanque de cocción a gas C.I. Talsa t240g - 09401085 (mortadela) hasta que el producto alcanzó una temperatura interna de 72°C. Después del tratamiento térmico, las salchichas y las mortadelas se dejaron en refrigeración, y al siguiente día se realizó el fraccionamiento y la inoculación del producto.

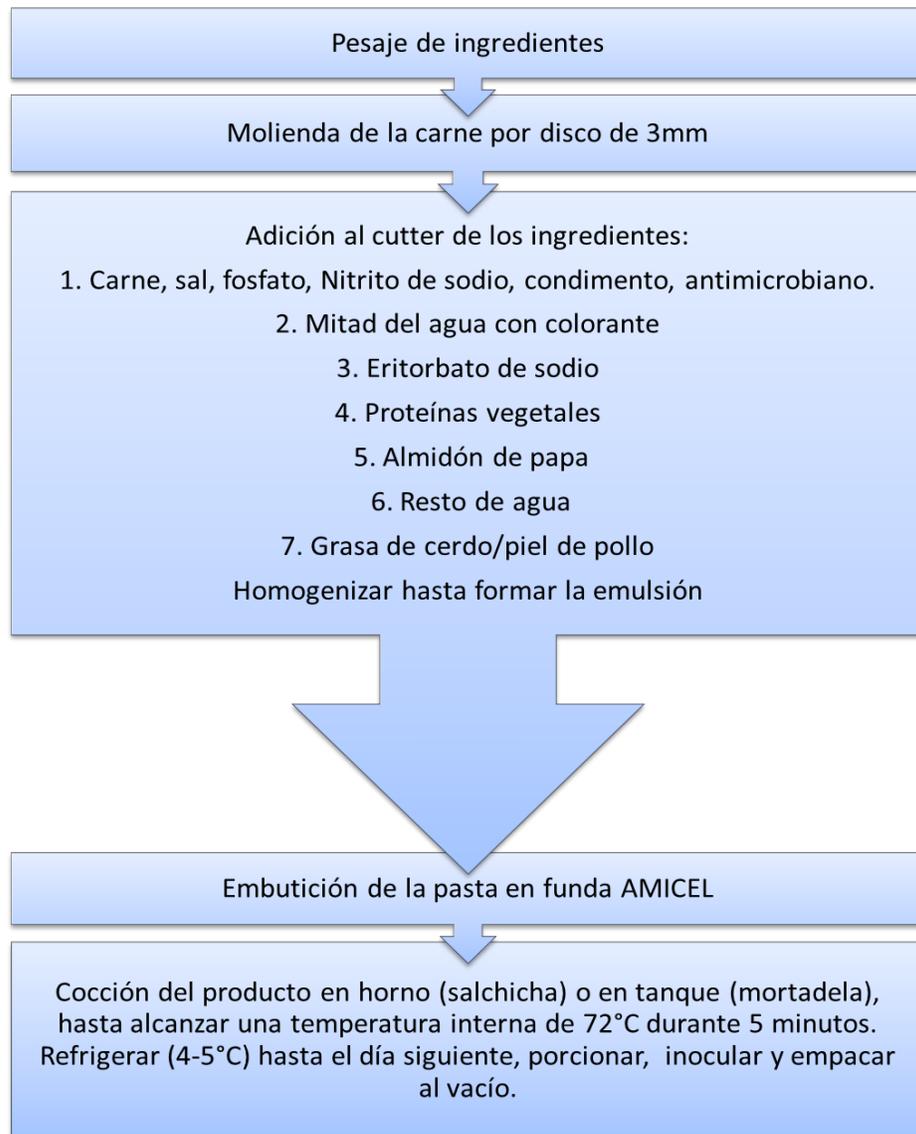


Figura 1. Elaboración de salchicha y mortadela.

1.3. Inoculación de los productos

Partiendo de un inóculo que se encuentra en medio BHI (*Brain Heart Infusion*) con una concentración inicial de 10^8 ufc/ml, se realizan diluciones seriadas hasta tener una concentración aproximada de 10^2 - 10^3 ufc/ml de cada cepa de referencia. La inoculación de los microorganismos (por separado) a cada paquete, se realizó por inyección de 1 ml de inóculo que contenía entre 10^2 - 10^3 UFC de *E. coli* y por aspersion para *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*, simulando las condiciones en las que ocurre la re-contaminación con *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* en la superficie de los productos después del tratamiento térmico (Genigeoris, C.A., Dutulescu, D. y Garayzabal, J.F, 1989; Johnson, J.L., Doyle, M.P. y Cassens, R.G., 1990; Wenger *et al.*, 1990; Sheridan *et al.*, 1994; Carrasco E., Morales-Rueda A. y García-Gimeno R.M., 2012) y la presencia de *E. coli* debido a malas prácticas higiénicas durante la elaboración de productos.

Una vez fueron inoculadas los productos, los paquetes se empacaron al vacío en una bolsa flexible de Poliamida/Polietileno (Alico S.A., Medellín, Colombia) usando la empacadora *Cunet Plus Vac 20* (C.I. Talsa, Medellín, Colombia). El producto se mantuvo en refrigeración (4- 5°C) en una Cava *LaSelle* de 500L durante el tiempo que dura el estudio, retirando cada muestra 1-2 horas antes de ser analizadas.

1.4. Análisis microbiológico

Para las unidades sin inocular los análisis microbiológicos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas NTC 4519 (ICONTEC, 2009) para aerobios mesófilos, NTC 4516 (ICONTEC, 2009) para recuento de coliformes, y al Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológica de Alimentos para Consumo (*Staphylococcus aureus*, y *Salmonella* spp.). El recuento de *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* se realizó de acuerdo con la normas ISO 11290-2: 01/07/1998 e ISO 6579:2003; respectivamente.

El recuento de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* y *E. coli* de los productos inoculados, se realizó semanalmente. Cada vez se emplearon 25 g de muestra inoculada con *S. Typhimurium* homogeneizada en 225 mL de agua peptona tamponada, los cuales se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 - 24 horas. Para el enriquecimiento selectivo se transfirió 1 mL de la muestra anterior en 10mL de caldo Rappaport Vassiliadis y 10 mL de caldo Selenito cisteína, los cuales se incubaron a $44^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y $36^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 18 - 24

horas, respectivamente. El aislamiento en medio selectivo y diferencial se realizó a partir de cada uno de los cultivos obtenidos del enriquecimiento selectivo, los cuales se sembraron en superficie sobre el Agar SS (*Agar Salmonella Shigella*), luego de incubar las placas a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 – 48 horas.

El recuento en placa de *E. coli* se consiguió en un agar cromogénico Chromocult® sobre el cual se sembró en superficie 0,1 mL de las diluciones correspondientes. Las cajas de Petri se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / 24 horas para coliformes totales y para determinación de *E. coli* se incubaron a $44^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 18 – 20 horas. En el caso de *L. monocytogenes*, luego del proceso de recuperación del microorganismo en caldo Fraser siguiendo las indicaciones del proveedor, el recuento en placa se realizó por inoculación de 0,1 mL de la muestra en un medio selectivo diferencial ALOA incubando las placas a $36^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 horas.

Después del periodo de incubación de los microorganismos en las placas, se cuentan las colonias características en cada caja y se calculan el número de Unidades Formadoras de colonias (UFC) por gramo.

1.5. Análisis fisicoquímico

Los valores de pH y actividad acuosa (A_w) de las salchichas y mortadelas cocidas sin inocular fueron medidos semanalmente por medio de un pH metrohandylab pH11/14 (Schott Group, Mainz, Germany) y un equipo Aqua Lab Water Activity Meter 4TE (Aqua Lab Inc., Pullman, WA 99163 – USA), respectivamente, según las instrucciones del fabricante.

En ambos casos, se tomaron los promedios de 6 mediciones realizadas a 3 muestras de cada tratamiento, las cuales fueron primero maceradas hasta obtener una pasta homogénea.

1.6. Análisis estadístico

Los recuentos de cada microorganismo para las 3 réplicas del estudio, fueron transformados a logaritmo y reportados en términos de Log UFC/g. Cuando no se observó crecimiento en la placa, se utilizó el valor de 1 para el cálculo de su logaritmo. Los análisis se realizaron utilizando el Software estadístico R Core Team® (2012), a través del cual se obtuvo el modelo matemático de efectos mixtos (medidas longitudinales o repetidas en el tiempo) para cada microorganismo y tratamiento antimicrobiano (Littell *et al* 2006). El modelo con el mejor ajuste de los datos se determinó de acuerdo con el criterio de Akaike (AIC) (Posada y Rosero, 2007).

1.7. Porcentaje de inhibición de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*

El cálculo del porcentaje de inhibición de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* (Tabla 3) con cada uno de los antimicrobianos, se obtuvo comparando el crecimiento del microorganismo sin ninguna sustancia antimicrobiana (Control) y el obtenido en el mismo tiempo con el antimicrobiano en cuestión, así:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ control} - \text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ antimicrobiano})}{(\text{Log} \frac{\text{UFC}}{\text{g}} \text{ control})} \times 100\%$$

2. RESULTADOS

2.1. Análisis microbiológico y fisicoquímico

En todas las muestras no-inoculadas, la investigación de *E. coli*, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. arrojó resultados negativos (ausencia del patógeno). Con estos resultados se comprobó que los recuentos de los patógenos en las salchichas y mortadela inoculadas se debían únicamente a la inoculación. Los valores promedio para el pH y Aw de ambos productos permaneció invariable durante el estudio, con valores dentro del rango 5,9-6,2 y alrededor de 0,977; respectivamente. El promedio del pH y el Aw al inicio del estudio fue similar en todos los tratamientos (Tabla 2).

Al inicio del estudio el recuento de microorganismos aerobios mesófilos de los productos eran muy similares entre sí (2.5-4.0 log UFC/g), pero en la mitad de la vida útil (semana

3), el promedio de los productos elaborados con adición de Lactato de Sodio 2,5% y los que no llevaban ningún antimicrobiano (Control), superaron el límite máximo permitido para estos productos (> 5.0 log UFC/g) puesto que alcanzaron recuentos superiores a 12 log UFC/g, mientras que los productos con el Antimicrobiano Natural en cualquiera de la dosis estudiada mantuvo el promedio de los recuentos de microorganismos aerobios por debajo de 5 log UFC/g hasta la tercera semana.

Tabla 2. Evaluación del pH, Aw y microorganismos aerobios mesófilos en los productos no-inoculados

Producto/ Tratamiento Antimicrobiano	pH _i	Aw _i	Log* (UFC/g) _i	Log* UFC/g semana 3	Log*(UFC/g) _f
Salchicha					
Control (Sin antimicrobiano)	5,80±0,05 ^a	0,986±0,01 ^b	3,6 ±1,0	7,75±0,75	>12,0
Antimicrobiano Natural (0,3%)	5,95±0,01 ^a	0,980±0,02 ^b	3,5±0,7	4,0±0,5	9,0±0,5
Antimicrobiano Natural (0,65%)	6,05±0,02 ^a	0,978±0,06 ^b	3,7±0,9	6,05±0,02 ^a	8,05±0,55
Lactato de Sodio (2,5%)	5,88±0,06 ^a	0,980±0,02 ^b	3,5±1,1	3,75±0,55	>12,0
Mortadela					
Control (Sin antimicrobiano)	5,86±0,04 ^a	0,978±0,05 ^b	3,5 ±0,8	7,95±0,45	>12,0
Antimicrobiano Natural (0,3%)	5,95±0,06 ^a	0,980±0,01 ^b	3,7±0,9	4,15±0,45	9,3±0,4
Antimicrobiano Natural (0,65%)	5,95±0,02 ^a	0,979±0,01 ^b	3,4±1,0	3,9±0,5	7,4±0,9
Lactato de Sodio (2,5%)	5,85±0,07 ^a	0,979±0,02 ^b	3,6±1,2	8,35±0,85	>12,0

* Promedio de Log UFC/g±desviación estándar. (N=3, n=3). Los subíndice *i* y *f* indican el valor inicial y final de cada parámetro, respectivamente. Letras iguales en cada columna para los valores de pH y Aw en cada producto, indican que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

2.2. Crecimiento de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*

Los modelos que mejor se ajustan a los datos de Log UFC/g para *E. coli* y *S. Typhimurium* tienen forma cúbica, mientras que para *L. monocytogenes* se observó un mejor ajuste con ecuaciones de tipo cuadrático (Figura 3). En estos modelos, el tiempo (T) en semanas y los tratamientos son los efectos fijos que ayudan a estimar el recuento de cada microorganismo. Los coeficientes de cada ecuación (β_0 , β_1 , β_2 y β_3) se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Modelos matemáticos para el crecimiento de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*

Microorganismo	Tratamiento	Coeficientes			
		β_0	β_1	β_2	β_3
<i>E. coli</i> <i>Log UFC/g</i> = $\beta_0+\beta_1T+\beta_2T^2+\beta_3T^3$	Antimicrobiano Natural (0,3%)	1,143	-0,469	0,026	0,004
	Antimicrobiano Natural (0,65%)	0,934	-0,238	-0,577	-0,021
	Lactato de Sodio (2,5%)	0,934	-0,6831	0,176	-0,015
	Control (sin antimicrobiano)	0,958	0,175	-0,164	0,018
<i>L. monocytogenes</i> <i>Log UFC/g</i> = $\beta_0+\beta_1T+\beta_2T^2$	Antimicrobiano Natural (0,3%)	1,399	-0,578	0,053	-
	Antimicrobiano Natural (0,65%)	1,422	-0,578	0,053	-
	Lactato de Sodio (2,5%)	1,541	-0,578	0,053	-
	Control (sin antimicrobiano)	2,160	-0,578	0,053	-
<i>S. Typhimurium</i> <i>Log UFC/g</i> = $\beta_0+\beta_1T+\beta_2T^2+\beta_3T^3$	Antimicrobiano Natural (0,3%)	1,734	-0,229	-0,091	0,022
	Antimicrobiano Natural (0,65%)	1,754	0,646	-0,297	0,022
	Lactato de Sodio (2,5%)	1,662	1,225	-0,395	0,022
	Control (sin antimicrobiano)	1,610	1,803	-0,43	0,022

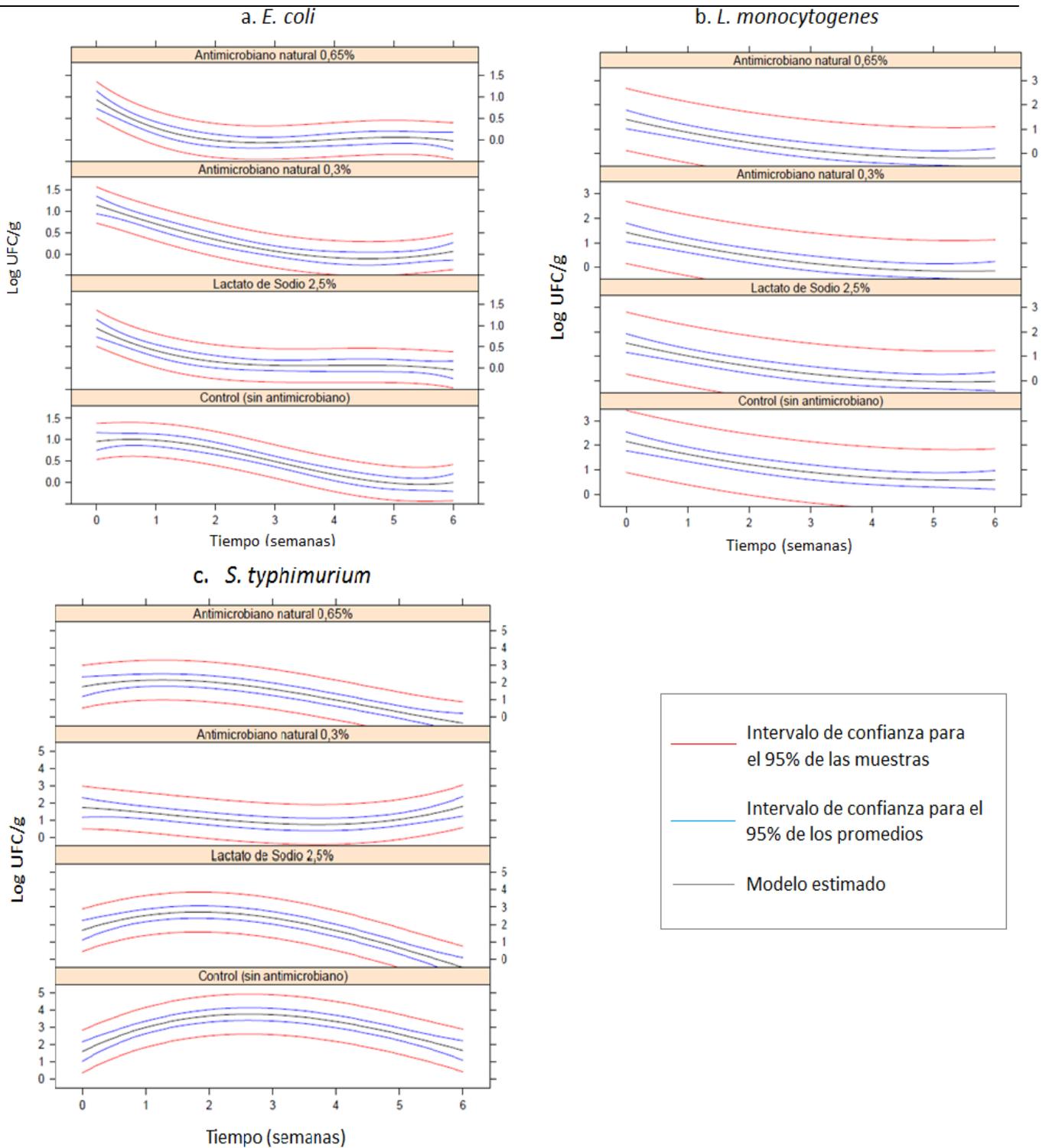


Figura 2. Crecimiento de **a. *E. coli***; **b. *L. monocytogenes*** y **c. *S. Typhimurium***

2.3. Porcentaje de inhibición de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*

En la Tabla 4 se muestran los resultados del porcentaje de inhibición para *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* para los diferentes tratamientos.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*

Microorganismo	Tratamiento	% Inhibición**					
		Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
<i>E. coli</i>	Antimicrobiano Natural (0,3%)	35,0 ^a	70,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	<i>na</i>	<i>na</i>
	Antimicrobiano Natural (0,65%)	72,0 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	<i>na</i>	<i>na</i>
	Lactato de Sodio (2,5%)	60,0 ^c	33,3 ^a	88,9 ^a	100,0 ^a	<i>na</i>	<i>na</i>
<i>L. monocytogenes</i>	Antimicrobiano Natural (0,3%)	41,2 ^a	66,7 ^a	90,0 ^a	86,7 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
	Antimicrobiano Natural (0,65%)	47,1 ^a	58,3 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
	Lactato de Sodio(2,5%)	41,2 ^a	41,7 ^a	80,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
<i>S. Typhimurium</i>	Antimicrobiano Natural (0,3%)	85,0 ^a	71,6 ^a	76,0 ^a	75,8 ^a	59,6 ^a	-9,1 ^b
	Antimicrobiano Natural (0,65%)	31,7 ^a	45,9 ^a	58,7 ^b	69,7 ^a	88,5 ^a	100,0 ^a
	Lactato de Sodio(2,5%)	13,3 ^a	52,7 ^a	34,7 ^b	47,0 ^b	73,1 ^a	100,0 ^a

**Respecto al control (sin antimicrobiano). Letras iguales indican diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los promedios del Log UFC/g (N=3, n=3) de los tratamientos para cada semana, correspondientes al 95% de las muestras.

na: el recuento del microorganismo es cero también en el control.

3. Discusión

Aunque las bacterias Gram negativas son generalmente más resistentes a los antimicrobianos de origen vegetal e incluso puede que no se observe ningún efecto, en comparación con las bacterias Gram positivas (Rameshkumar, K. B., George, V., y Shiburaj, S., 2007) y (Stefanello *et al.*, 2008), para *E. coli* se observó inhibición mayor al 50% respecto al control sin antimicrobiano desde la primera semana en los productos con 2,5% de Lactato de Sodio y 0,65% de Antimicrobiano Natural, y se redujo su población hasta en un 100% a partir de la segunda semana para la concentración más alta del Antimicrobiano Natural, y en la tercera semana para los productos con 2.5% de Lactato de Sodio. La mayor sensibilidad de *E. coli* en comparación a *L. monocytogenes*, también se observó en otro estudio realizado sobre biofilms de cepas de *E. coli* O157: H7 y *L. monocytogenes* frente a carvacrol encapsulado (Pérez-Conesa *et al.*, 2011). Durante la fermentación y el almacenamiento a 4 - 30°C de salchichas maduradas y semi-maduradas, también se ha observado mayor reducción de la población de *E. coli* que de *L. monocytogenes* (Porto-Fett *et al.*; 2008, 2009).

Los modelos matemáticos cuadráticos sirvieron para estimar el crecimiento *E. coli* y *S. Typhimurium*; mientras que un modelo cúbico fue más útil para describir el comportamiento de *L. monocytogenes* en todos los tratamientos debido a la forma cóncava de la curva. El empleo de Antimicrobiano natural con extracto de romero en las dos concentraciones estudiadas logró en la segunda semana una reducción mayor al 50% de *L. monocytogenes*, mientras que para este mismo periodo, el Lactato de Sodio solo logró reducir el 41,7% de la población del microorganismo. A partir de la tercera semana, la inhibición de este patógeno fue mayor al 80% respecto al control sin antimicrobiano. Debido a la limitada acción antimicrobiana del Lactato de Sodio frente a patógenos como *L. monocytogenes*, se han realizado numerosos estudios que han mostrado un efecto sinérgico entre el lactato (1,5%- 3,0%) y el Diacetato de Sodio (0,125% a 0,25%) sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos (Bedie *et al*, 2001; Mbandi y Shelef, 2002; Samelis *et al*, 2002; Barmpalia *et al.*, 2004; Samelis *et al*, 2005; A.C. Porto-Fett *et al.* 2010) y en productos de carne y aves de corral (Tompkin, 2002;Thompson *et al.*, 2008).

Es posible que la baja eficacia de los antimicrobianos estudiados sobre el crecimiento de *S. Typhimurium* se deba a una alta tasa de recuperación de las células que se encontraban con daño sub-letal (De Boer, 1998) en el medio de enriquecimiento empleado. En general, se esperaba un mayor efecto inhibitorio de ambos antimicrobianos sobre los microorganismos estudiados, basado en los valores de CMI que se obtuvieron en este estudio (datos no mostrados); lo cual valida lo reportado por Gutierrez *et al.*, 2008a; quienes sugieren que si bien se ha demostrado *in vitro* que los extractos de plantas son útiles para la reducción de patógenos asociados con productos cárnicos, el bajo efecto antimicrobiano contra estos agentes patógenos en los productos, es menor debido al efecto antagónico producido por la grasa. Del mismo modo, Mbandi y Shelef, 2002; reportaron la inhibición de *Salmonella Typhimurium* serotipo *enteritidis* mediante la adición de Lactato de Sodio (2,5%) y Diacetato de Sodio (0,2%) en carne bajo condiciones aeróbicas a 5 y 10° C. Los mismos investigadores probaron que la combinación de lactato de sodio con Diacetato de Sodio, incluso ayuda a controlar el crecimiento de los microorganismos aerobios en el producto y, por tanto prolonga su vida útil después de que se abran los paquetes.

Para los valores promedios de pH y A_w de las mortadelas y salchichas que no fueron inoculados no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos durante la vida útil de los productos. Sin embargo, se observó un aumento en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos en los productos sin ningún antimicrobiano (control) y Lactato de Sodio a partir de la tercera semana.

En este estudio se observó una reducción en el crecimiento de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* en las muestras del tratamiento control (sin antimicrobiano), lo que podría explicarse por el efecto "Jameson" (Stephens *et al.*, 1997) en el que se suprime el crecimiento de la población que se encuentra en menor proporción respecto de otras poblaciones. En este caso, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos en los productos sin antimicrobiano y sin inóculos tan alto (>12 logaritmos) que podría inhibir el crecimiento de los patógenos en las concentraciones usadas en este estudio.

4. Conclusiones

En una salchicha empacada al vacío, refrigerada (4-5°C) e inoculada por inyección con una concentración inicial de *L. monocytogenes* de 100-1000 UFC/g; solo el Antimicrobiano natural compuesto principalmente de extracto de romero a una dosis de 0,65% inhibió por completo el crecimiento de este patógeno, hasta la tercera semana. En el caso de *S. Typhimurium* ninguno de los antimicrobianos estudiados logró inhibir completamente al microorganismos, únicamente se observó el 100% de la inhibición al final del estudio en los productos que contenían la mayor concentración de antimicrobianos (0,65% de Antimicrobiano natural y 2,5% Lactato de Sodio). Por otro lado en salchicha, fue posible observar el efecto inhibitorio completo de *E. coli* con 0,65% del Antimicrobiano natural a partir de la segunda semana. En general los derivados cárnicos cuya fórmula contiene algún antimicrobiano inhiben el crecimiento de los microorganismos estudiados, pero su eficacia es mayor frente a *E. coli* y *L. monocytogenes*, y muy limitada frente a *S. Typhimurium*.

Recomendaciones

En vista del reducido número de estudios en matrices cárnicas donde se evalúe el efecto sensorial de la adición de extractos vegetales con un alto contenido de timol, carvacrol, linalol, 1, 8-cineol, α -pineno o α -terpineol; se recomienda, realizar previamente pruebas de aceptación del producto con la adición del extracto en cuestión y la dosis en la cual se produce la inhibición de los microorganismos de interés.

Agradecimientos

Se agradece a la empresa Tecnas S.A. (Itagüí, Colombia) por el apoyo técnico y financiero brindado para el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

Angioni, A., A. Barra, E. Cereti, D. Barile, D.J. Coisson y Arlorio, M. 2004. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(11), 3530–3535.

Bampalia, I.M., I. Geornaras, K.E. Belk, J.A. Scanga, P.A. Kendall, G.C. Smith y J.N. Sofos. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters with Antimicrobials in the Formulation and by Dipping in Organic Acid Solutions. *Journal of Food Protection* 67 (11), 2456-2464(9).

Bedie, G.K., J. Samelis, J.N. Sofos, K.E. Belk, J.A. Scanga y G.C. Smith. 2001. Antimicrobials in the Formulation to Control *Listeria monocytogenes* Postprocessing Contamination on Frankfurters Stored at 4 °C in Vacuum Packages. *Journal of Food Protection* 64(12), 1949-1955(7).

Bradford, D.D., D.L. Huffman, W.R. Egbert y W.R. Jones. 1993. Low-fat fresh pork sausage patty stability in refrigerated storage with potassium lactate. *Journal of Food Science* 58 (1), 488–491.

Brewer, M.S., F. McKeith, S.E. Martin, A.W. Dallmier y J. Meyer. 1991. Sodium lactate effects on shelf-life, sensory, and physical characteristics of fresh pork sausage. *Journal of Food Science* 56 (1), 1176–1178.

Brewer, M.S., B.K. Rostogi, L. Argoudelis y G.K. Sprouls 1995. Sodium lactate/sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. *Journal of Food Science* 60 (1), 58–62.

Bubonja-Sonje, M., Giacometti J. y Abram M. 2011. Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *FoodChemistry*127 (4), 1821-1827.

Burt, S.A., R.V. Der Zee, A.P. Koets, A.M. De Graaff, F. Van Knapen y W. Gaastra 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology* 73(1), 4484–4490.

Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods– A review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (3),223–253.

Carrasco, E., A. Morales-Rueda y R.M. García-Gimeno. 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Review Article Food Research International* 45(2), 545-556.

Centers for Disease Control and Prevention, CDC. National Center for Emerging & Zoonotic Infectious Diseases. Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases. Trends in Foodborne Illness, 1996–2010. July 2011. En línea: www.cdc.gov/foodsafety. Consulta: 12 Diciembre 2012.

Daferera, D.J., B.N. Ziogas y M.G. Polissiou. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48(6), 2576–2581.

Davidson, P.M. y A.S. Naidu. Phytophenols. A.S. Naidu, Editor. *Natural food antimicrobial systems*, CRC Press, Boca Raton, Florida (2000), pp. 265–295.

De Boer, E. 1998. Update on media for isolation of *Enterobacteriaceae* from foods. *International Journal of Food Microbiology* 45, 43-53.

Gachkar, L., D. Yadegari, M.B. Rezaei, M. Taghizadeh, S. Alipoor Astaneh y I. Rasooli. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry* 102 (3),898–904.

Gutierrez, J., C. Barry-Ryan y P. Bourke. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology* 124 (1), 91–97.

Gutierrez, J., G. Rodriguez, C. Barry-Ryan y P. Bourke. 2008. Efficacy of plant essential oils against food borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening. *Journal of Food Protection* 71(9), 1846–1854.

Genigeoris, C.A., D. Dutulescu y J.F. Garayzabal. 1989. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughter house level. *J. Food Protection* 52, 618–624.

Johnson, J.L., M.P. Doyle y R.G. Cassens. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. *J. Food Protection* 53, 81– 91.

Holguin, H. 1998. Manual de Técnicas de análisis para control de calidad microbiológica de alimentos para consumo humano. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. División Laboratorio de Alimentos y Bebidas Alcohólicas. Sección de Microbiología de Alimentos. Santa Fe de Bogotá: Ministerio de Salud.

Houtsma, P.C., J.C. de Wit y F.M. Rombouts. 1993. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *International Journal of Food Microbiology* 20 (1), 247–257.

Hussain, A., F. Anwar, P. Nigam, S. Sarker, J. Moore, J. Rao y A. Mazumdar. 2010. Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT - Food Sci Technol.* 44(4), 1199-1206.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2009. Norma Técnica Colombiana. NTC 4519. Microbiología de los Alimentos para Consumo Humano y Animal. Método Horizontal para el Recuento de Microorganismos. Técnica de Recuento de Colonias a 30 °C. Primera actualización. ICONTEC, Bogotá. p 9.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. 2009. Norma Técnica Colombiana. NTC 4516. Microbiología de Alimentos y Productos de Alimentación Animal. Método Horizontal para la Detección y Enumeración de Coliformes Técnica del Número Más Probable. Primera actualización. ICONTEC, Bogotá. p. 11.

ISO 11290-2: 01/07/1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method.

ISO 6579:2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.

Kim, J., C.I. Wei y M.R. Marshall. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five food borne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 43 (11), 2839–2845.

Klancnik, A., B. Guzej, H. M. Kolar, H. Abramovic y S. Smole Mo zina. 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection* 72 (1), 1744-1752.

Knobloch, K., A. Pauli, B. Iberl, H. Weigand y N. Weis. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *J Essent Oil Res.* 1 (1), 119-28.

Kong, M, X.G. Chen, C.S. Liu, L.J. Yu, Q.X. Ji, Y.P. Xue, D.S. Cha y H.J. Park 2008. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. *Frontiers of Materials Science in China.* 2 (1), 214–220.

Lamkey, J.W., W.F. Leak, W.B. Tuley, D.D. Johnson y R.L. West. 1991. Assessment of sodium lactate addition to fresh pork sausage. *Journal of Food Science.* 56 (1), 220–223.

Lanciotti, R., A. Gianotti, F. Patrignani, N. Belletti, M.E. Guerzoni y F. Gardin. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology* 15 (3–4), 201–208.

Littell, R.C. G.A. Milleken, W.W. Stroup, R.D. Wolfingen y O. Schabenberger. 2006. SAS for Mixed Models. Second Edition. Institute Inc., Cary, EE.UU. p. 814.

Lopes-Lutz, D., D.S. Alviano, C.S. Alviano y P.P. Kolodziejczyk. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69 (8), 1732–1738.

Mbandi, E. y L.A. Shelef. 2002. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *International Journal of Food Microbiology* 76(3), 191–198.

Miller, R.K. y G.R. Acuff. 1994. Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *Journal of Food Science* 59 (1), 15–19.

Ntzimani, A., V. Giatrakou y I. Savvaidis. 2010. Combined natural antimicrobial treatments (EDTA, lysozyme, rosemary and oregano oil) on semi cooked coated chicken meat stored in vacuum packages at 4 °C: Microbiological and sensory evaluation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11 (1), 187-196.

Nychas, G.J.E., E.H. Drosinos y R.G. Board. 1998. Chemical changes in stored meat. A. Davies and R.G. Board, Editors. *The microbiology of meat and poultry*, Blackie Academic and Professional, London. pp. 288–326.

Ouattara, B., R. E. Simard, R. A. Holley, G.J.P. Piette y A Begin. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37 (1), 155–162.

Papadopoulos, L.S, R.K. Miller, G.R. Acuff y H.R Cross. 1991. Effect of sodium lactate on microbial and chemical composition of cooked beef during storage. *Journal Food Science*. 56 (1), 341–347.

Pérez-Conesa, D., J. Cao, L. Chen, L. Mc Landsborough y J. Weiss. 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms by Micelle-Encapsulated Eugenol and Carvacrol. *Journal of Food Protection*. 74 (1), 55-62(8)

Porto-Fett, A.C.S., C.A. Hwang, J.E. Call, V.K. Juneja, S.C. Ingham, B.H. Ingham, J.B. Luchansky. 2008. Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausage. *Food Microbiol*. 25(6):793-801. doi: 10.1016/j.fm.2008.04.012. Epub 2008 May 7.

Porto-Fett, A.C.S., V.K. Juneja, S.C. Ingham, B.H. Ingham y J.B. Luchansky. 2009. Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Typhimurium* during fermentation, drying, and storage of soudjouk-style fermented sausage. *Int J Food Microbiol*. 28;129(3):244-52. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.003. Epub 2008 Dec 7.

Porto-Fett, A.C.S., S.G. Campano, J.L. Smith, A. Oser, B. Shoyer, J.E. Call y J.B. Luchansky. 2010. Control of *Listeria monocytogenes* on commercially-produced frankfurters prepared with and without potassium lactate and sodium diacetate and surface treated with lauric arginate using the Sprayed Lethality in Container (SLIC®) delivery method. *Meat Science* 85(2), 312–318.

Posada, S.L. y R. Rosero. 2007. Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. *Rev. Col. Cienc. Pec.*20:141.

Pongsak, R. y P. Phumkhachorn. 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholerae* in food. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110 (5), 614-619.

Proestos, C., I. Boziaris, S.M. Kapsokefalou y M. Komaitis. 2008. Natural antioxidant constituents from selected aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. *Food Technology and Biotechnology* 46 (1), 151–156.

R Core Team. 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-project.org>.

Rameshkumar, K. B., V. George y S. Shiburaj. 2007. Chemical constituents and antibacterial activity of the leaf oil of *Cinnamomum chemungianum* Mohan et Henry. *Journal of Essential Oil Research*. 19, 98–100.

Rattanachaikunsopon, P. y P. Phumkhachorn. 2010. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against *Vibrio cholera*. *Food. J BiosciBioeng*. 110 (5), 614-619.

Rodríguez, A., R. Batlle y C. Nerín. 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Prog Org Coat*. 60 (1), 33–38.

Samelis, J., G.K. Bedie, J.N. Sofos, K.E. Belk., J.A. Scanga y G.C. Smith. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* with Combined Antimicrobials after Post process Contamination and Extended Storage of Frankfurters at 4°C in Vacuum Packages. *Journal of Food Protection* 65(2), 299-307(9).

Samelis, J., G.K. Bedie., J.N. Sofos, K.E. Belk, J.A. Scanga y G.C. Smith. 2005. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. *LWT - Food Science and Technology* 38(1), 21–28.

Sheridan, J.J., G. Duffy, D.A. McDowell y I.S. Blair. 1994. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and recovery of injured cells from frozen products. *Int. J. Food Microbiol*. 22, 105–113.

Skocibusic, M., N. Bezic y V. Dunkic. 2006. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. Food Chemistry 96 (1), 20–28.

Stefanello, M. E. A., A. C. Cervi, I. Ito, M. J. Salvador, A. Wisniewski, Jr. y E. L. Simionatto. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). Journal of Essential Oil Research, 20(1), 75–78.

Stephens, P. J., J. A. Joynson, K. W. Davies, R. Holbrook, H. M. Lappin-Scott y T. J. Humphrey. 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat injured Salmonella cells. Journal of Applied Microbiology. 83, 445-455.

Tajkarimi, M., S. Ibrahim y D. Cliver. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21(9), 1199-1218.

Thompson, R.L., C.E. Carpenter, S. Martini y J.R. Broadbent. 2008. Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meats Containing Sodium Levulinate, Sodium Lactate, or a Combination of Sodium Lactate and Sodium Diacetate. Journal of Food Science 73(5), 239-244.

Tompkin, R.B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. Journal of Food Protection 65(4), 709-725(17).

Wenger, J.D., B. Swaminathan, P.S. Hayes, S.S. Green, M. Pratt, Pinner, R.W., Schuchat, A. y Broome, C.V. 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks; evaluation of production facility. J. Food Prot. 53, 1015– 1019.

Zhang H, B. Kong, Y. Xiong y X. Sun. 2009. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4°C. Meat Sci. 81(4),686–692.

Zheng Z, J. Tan, H. Liu, X. Zhou, X. Xiang y K. Wang. 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum L.*) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*. 292 (3-4),214–218.