

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA LETAL DE EXTRACTO DE AJO (*ALLIUM SATIVUM*) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* FGB01-UNT EN QUESO FRESCO EN ALMACENAMIENTO REFRIGERADO.

EFFECT OF MINIMUM LETHAL CONCENTRATION GARLIC EXTRACT (*ALLIUM SATIVUM*) ON THE GROWTH OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN CHEESE FGB01-UNT FRESH IN COLD STORAGE.

David Isai Tipacti Requejo¹; Gabriela Barraza Jauregui²

¹Bachiller en Ingeniería Agroindustrial, Universidad César Vallejo, lwiritol@gmail.com

²Docente de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Universidad César Vallejo, gcbarraza11@hotmail.com

Recibido: 2 setiembre 2013 - Aceptado: 4 octubre 2013

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la Concentración Mínima Letal del extracto de ajo (*Allium Sativum*) sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en almacenamiento refrigerado. Para la determinación de la actividad antibacteriana del extracto de ajo, se aplicó la técnica de recuento en placa, utilizando 2 sistemas de inoculación, Sistema 1 "Control", inoculado con *Listeria Monocytogenes* y Sistema 2 "Problema" inoculado con *Listeria monocytogenes* más el extracto de ajo. De 3 ensayos efectivos se obtuvieron como promedio general en el Sistema 1 "Control" recuento en el día (0) $3,46 \times 10^8$ UFC/g, recuento en el día (2) $3,56 \times 10^8$ UFC/g, recuento en el día (4) $2,01 \times 10^7$ UFC/g, recuento en el día (6) $2,07 \times 10^7$ UFC/g y recuento en el día (7) $2,06 \times 10^8$ UFC/g, lo cual confirma la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en almacenamiento refrigerado a 4°C y su posterior incremento. En el Sistema 2 "Problema" se obtuvo: el día (0) $3,53 \times 10^8$ UFC/g, el día (2) $4,7 \times 10^7$ UFC/g, el día (4) $3,43 \times 10^6$ UFC/g, el día (6) $5,42 \times 10^5$ UFC/g y el día (7) $2,19 \times 10^4$ UFC/g obteniendo una disminución considerable de 4 ciclos logarítmicos a través del tiempo. El análisis estadístico ANVA se trabajó con un margen de error del 5% y como resultado se determinó el efecto significativo del extracto de ajo debido a que el resultado estadístico fue $p=0,000 < 0,05$.

Palabras clave: Concentración Mínima letal, Extracto de ajo (*Allium sativum*), *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of the minimum lethal concentration of garlic extract (*Allium sativum*) on the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese in cold storage. For the determination of the antibacterial activity of garlic extract was applied plate count technique using 2 inoculation systems, System 1 "Control", inoculated with *Listeria monocytogenes* and System 2 "Problem" *Listeria monocytogenes* inoculated with the extract more garlic. In three trials were obtained as effective overall average in the System 1 "Control" in the day count (0) 3.46×10^8 UFC / g, count on the day (2) 3.56×10^8 UFC / g, count on the day (4) 2.01×10^7 UFC / g, count on the day (6) 2.07×10^7 UFC / g count on the day (7) 2.06×10^8 UFC / g, confirming the survival of *Listeria monocytogenes* in cold storage at 4 ° C and subsequent increase. In System 2 "Problem" was obtained: on (0) 3.53×10^8 CFU / g, the day (2) $4,7 \times 10^7$ UFC / g, the day (4) 3.43×10^6 UFC / g, the day (6) 5.42×10^5 UFC / g day (7) $2,19 \times 10^4$ UFC / g obtaining a considerable decrease of 4 log units over time. Statistical Analysis ANOVA worked with a margin of error of 5% and as a result, the effect of garlic extract significant because the statistical result was $p = 0.000 < 0.05$

Key words: Low Concentration Lethal extract of garlic (*Allium sativum*), *Listeria monocytogenes*.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos suponen una importante carga para la salud. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos contaminados. Los estados miembros de la Organización Mundial de la Salud seriamente preocupados, adoptaron en el año 2000 una resolución en la cual se reconoce el papel fundamental de la inocuidad alimentaria para la salud pública. La inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo (OMS, 2011). Una de las bacterias patógenas de gran importancia son las pertenecientes al género *Listeria*, que son bacilos gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En cultivos viejos pueden aparecer formando filamentos de 6 – 20 mm de longitud, presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad. Las colonias son pequeñas (de 1-2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, pero pueden crecer a 4°C en pocos días. Son anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas; además hidrolizan la esculina en pocas horas, pero no la úrea ni la gelatina; no producen indol ni sulfuro de hidrógeno (H₂S); sin embargo producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares (Hot, 1999). Se ha sabido por mucho tiempo que la especie *Listeria monocytogenes* es patógena y puede causar una enfermedad amenazante a la vida llamada Listeriosis. Sin embargo, no era reconocido como un patógeno asociado a los alimentos hasta 1980 cuando científicos y autoridades de la salud comenzaron a comprender que el organismo presenta problemas de salud públicos potencialmente serios, ya que puede crecer a temperaturas de refrigeración, y puede conducir la

Listeriosis a grupos compuestos por personas como ancianos, mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos (Pino et al., 2003). Por otro lado es sabido que el queso es la modalidad más antigua de transformación industrial de la leche, proporciona proteínas ricas en aminoácidos esenciales no sintetizables por el organismo; por lo que tiene un significativo valor nutritivo además de ser un alimento muy popular en la dieta diaria de las personas. Los quesos existen actualmente en miles de formas, variedades y tamaños, siendo algunas de ellas muy famosas y desarrolladas por todo el orbe (González et al., 2002). El queso fresco es el más conocido y consumido a nivel local y en nuestro país, debido a múltiples razones, las más importantes; por su sabor y textura blanda (Seglar, 2009). De todos los alimentos, es evidente que los quesos son contaminados con mayor frecuencia, en especial los quesos blandos y los frescos, ya que éstos tienen un pH mayor que la mayoría de los quesos en los estadios tardíos de maduración y, en consecuencia, son más propicios a la contaminación por esta bacteria. Hay estudios que indican que hasta 10% están contaminados con *Listeria monocytogenes* y que la prevalencia de este patógeno varía entre los diferentes tipos de quesos. Complementariamente el extracto de ajo funciona como agente bacteriostático, ya que prolonga la fase estacionaria de los microorganismos. Fase en la que los microorganismos buscan las condiciones que resulten óptimas para su crecimiento. Una forma de aplicación conveniente para los agentes antimicrobianos de origen natural, sería incluir la especie o planta que contiene el principio activo deseado, como ingrediente del producto a desarrollar (Hernández, 2003). El presente estudio determinó la Concentración Mínima Letal de extracto de Ajo (*Allium sativum*) sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en almacenamiento

refrigerado. El cultivo de *Listeria monocytogenes* FGB01-UNT, fue proporcionado por el Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. El queso fresco fue

adquirido en la Tienda Chugur ubicada en la ciudad de Trujillo y el ajo (*Allium sativum*) variedad blanco fue adquirido en el mercado "Hermelinda". Para la obtención de extracto de ajo se siguió el diagrama de flujo que se muestra en la Figura 1.

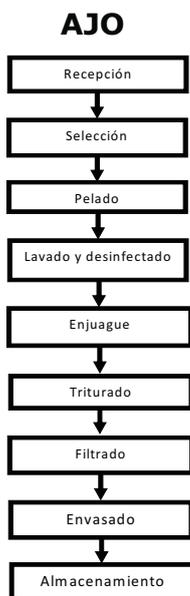


Figura 1: Obtención del extracto de ajo

Para la determinación de la Concentración Mínima Letal para *Listeria monocytogenes*. Se empleó la concentración 0,125g/mL (Hernández, 2003). En el Proceso de reactivación del cultivo de *Listeria monocytogenes* - conservado en congelación - se tomó una azada y se sembró en Caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* FRASER. Se incubó a 37°C por 24 horas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se prepararon 2 sistemas (cada sistema estuvo constituido por 1 recipiente con 300mL de solución salina) de acuerdo al siguiente esquema de ensayo:

Sistema 1: "Control" inoculado con *Listeria monocytogenes* para alcanzar la concentración final 108UFC/mL.

Sistema 2: "Problema" inoculado con *Listeria monocytogenes* a la concentración final 108UFC/mL más el extracto de ajo a una concentración

Luego se sembró en Agar Base *Listeria* Oxford Modificado con suplemento de antibióticos y se incubó a 37°C por 48 horas. Para proceso de Estandarización del inóculo de *Listeria monocytogenes*. Se preparó una suspensión bacteriana en Agua Destilada Estéril (ADE) a una turbidez equivalente al tubo N°1 del nefelómetro de Mac Farland (3x10⁸ UFC/mL).

mínima letal de 0,125 g/mL (Hernández, 2003).

A los 2 sistemas se le agregó 50g de queso fresco (5 unidades de queso fresco por recipiente) y se dejó en reposo durante ½ h, luego se extrajeron los quesos y se colocaron en recipientes estériles, al final se llevaron a refrigeración a 4°C hasta su evaluación.

La población de *Listeria monocytogenes* en ambos sistemas se evaluaron a 5

tiempos (0,2,4,6,7 días de refrigeración) mediante el método de recuento total de unidades formadoras de colonias (UFC/g) en cada uno de los sistemas mencionados. Para el recuento de *Listeria monocytogenes*, de cada recipiente, se pesó 1 gramo de muestra de queso fresco y se realizó diluciones decimales apropiadas, seguidamente se tomó 0,1mL de las dos últimas diluciones y se sembró en placas petri con Agar Base

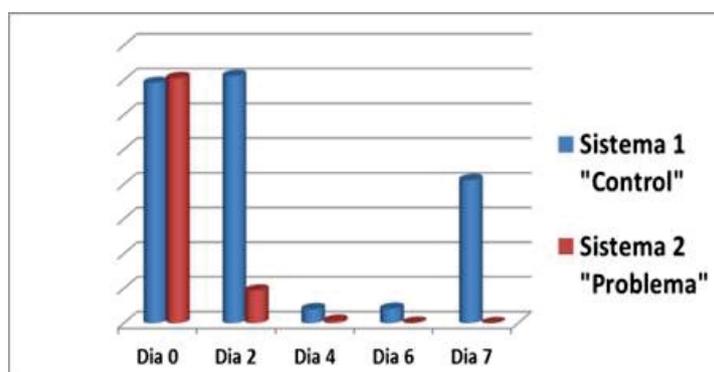
Listeria Oxford con suplemento de antibióticos mediante la técnica de siembra en superficie con asa de Drigalski, y se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. Transcurrido este tiempo se seleccionó, para el recuento, aquellas placas que contuvieron entre 30 y 300 colonias típicas.

III. RESULTADOS

Extracto de ajo con etanol (99,7%) como agente disolvente. Los compuestos presentes en el bulbo de ajo se destacaron por la aliina (sulfoxido de S-Alil-cisteina), que constituyó el principal sustrato para la enzima aliinasa (activada a pH 4-5,8) que una vez liberada de su compartimento intracelular por trituración, se transformó de aliina a alicina (dialiltiosulfonato), responsable del olor característico del ajo, y principal componente de los extractos acuosos y de los homogenizados de ajo. La alicina, cuya vida media a temperatura ambiente es de 2 – 4 días fue la responsable de los efectos antibióticos del extracto de ajo. Respecto al disolvente utilizado el cual fue etanol 99,7% ayudó mucho en la solubilidad del extracto, además neutralizó considerablemente el olor fuerte del extracto de ajo. Para evidenciar la actividad antimicrobiana del etanol 99,7% fue necesario utilizar el método de difusión en agar, el cual se mostró inactivo y no tuvo inhibición en la cepa analizada, mostrando la resistencia de *Listeria monocytogenes* sobre el disolvente.

Actividad antibacteriana

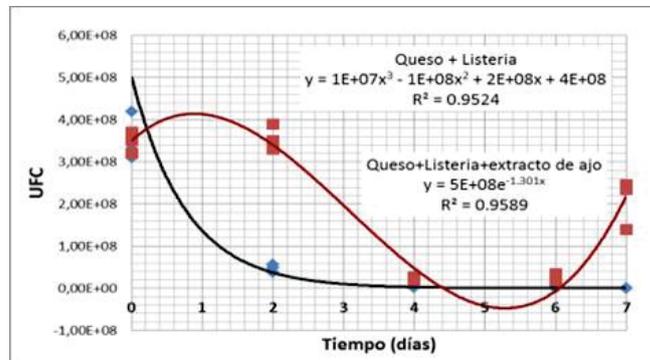
Gráfico 1. Recuento del Sistemas 1 "Control" en agar Oxford con FGB 001 y Sistema 2 "Problema" en agar Oxford con FGB 001 y Extracto de ajo.



Fuente: Elaboración propia

Análisis Tiempo vs UFC

Gráfico 2. Tendencia del efecto de la concentración mínima letal de extracto de Ajo (*Allium sativum*) sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* FGB01-UNT en queso fresco en almacenamiento refrigerado.



Fuente: Elaboración propia

Tabla 1. Resultados del ensayo 1

	Sistema 1 "Control" Queso + <i>Listeria</i>	Sistema 2 "Problema" Queso + <i>Listeria</i> + Extracto ajo
Viernes	$3,7 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$
Domingo	$3,9 \times 10^8$	$5,6 \times 10^7$
Martes	$1,21 \times 10^7$	$2,01 \times 10^6$
Jueves	$1,37 \times 10^7$	$5,8 \times 10^5$
Viernes	$1,39 \times 10^8$	$2,5 \times 10^4$

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Resultados del ensayo 2

	Sistema 1 "Control" Queso + <i>Listeria</i>	Sistema 2 "Problema" Queso + <i>Listeria</i> + Extracto ajo
Viernes	$3,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$
Domingo	$3,3 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$
Martes	$2,59 \times 10^7$	$4,95 \times 10^6$
Jueves	$1,38 \times 10^7$	$6,2 \times 10^5$
Viernes	$2,46 \times 10^8$	$2,7 \times 10^4$

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3. Resultados del ensayo 3

	Sistema 1 "Control" Queso + <i>Listeria</i>	Sistema 2 "Problema" Queso + <i>Listeria</i> + Extracto ajo
Viernes	3,2x10 ⁸	4,2x10 ⁸
Domingo	3,5x10 ⁸	3,7x10 ⁷
Martes	2,25x10 ⁷	3,34x10 ⁶
Jueves	3,48x10 ⁷	4,27x10 ⁵
Viernes	2,34x10 ⁸	1,37x10 ⁴

Fuente: Elaboración propia

Tabla 4. Resultados de los tres ensayos

	Sistema 1 "Control" Queso + <i>Listeria</i> (UFC/g)	Sistema 2 "Problema" Queso + <i>Listeria</i> + Extracto ajo (UFC/g)
Día 0	3,46x10 ⁸	3,53x10 ⁸
Día 2	3,56x10 ⁸	4,7x10 ⁷
Día 4	2,01x10 ⁷	3,43x10 ⁶
Día 6	2,07x10 ⁷	5,42x10 ⁵
Día 7	2,06x10 ⁸	2,19x10 ⁴

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5. Medida estadística descriptiva

Días	Queso + <i>Listeria</i> + Extracto ajo		Queso + <i>Listeria</i>	
	Media	D. Estándar	Media	D. Estándar
0	3.53E+08	5.86E+07	3.47E+08	2.52E+07
2	4.70E+07	9.54E+06	3.57E+08	3.06E+07
4	3.43E+06	1.47E+06	2.02E+07	7.19E+06
6	5.42E+05	1.02E+05	2.08E+07	1.22E+07
7	2.19E+04	7.17E+03	2.06E+08	5.86E+07

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6. Análisis ANVA para los sistemas 1 y 2.

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
Tiempo	4.94E+17	4	1.24E+17	1.42E+02	0.000
Queso	8.95E+16	1	8.95E+16	1.03E+02	0.000
Interacción	1.19E+17	4	2.98E+16	3.42E+01	0.000
Error	1.75E+16	20	8.73E+14		
Total	7.20E+17	29			

Fuente: Elaboración propia

IV. DISCUSIÓN

El gráfico 1 muestra la actividad antibacteriana del extracto de ajo (*Allium sativum*) sobre la cepa bacteriana de *Listeria monocytogenes* FGB 001. En el sistema "Problema" se observa la disminución a través del tiempo de *Listeria monocytogenes*. En el sistema "no se evidencia inhibición a través del tiempo debido a que la bacteria se adecúa al sistema refrigerado (4°C) y empieza a crecer nuevamente. La reducción total de los ciclos logarítmicos en el sistema "Problema" fue de 4 ciclos logarítmicos, lo cual es una reducción considerable como resultado para el estudio.

En el gráfico 2, comparado el UFC a través del tiempo, se observa la reducción considerable en el sistema "problema" debido al efecto del extracto de ajo y su compuesto activo alicina, obteniendo una reducción efectiva a través de la evaluación promedio de los resultados del estudio. El sistema "Control" tuvo una disminución inicial de la población bacteriana debido al ambiente refrigerado y posteriormente su adaptación y crecimiento en el medio refrigerado.

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos por los recuentos por cada ensayo y en la tabla 4 el promedio general de estos resultados, los cuales pertenecen a los sistemas "Control" y "Problema". Luego de analizar los resultados de los 2 Sistemas en el rango de 7 días se logró determinar:

Sistema 1 "Control": se observó en los 2 primeros días una disminución inicial de un ciclo logarítmico debido a que el sistema estaba sometido a refrigeración (4°C), manteniendo la población constante hasta el sexto día cuando la bacteria se adecua por completo al ambiente y empieza nuevamente a incrementar su número de colonias. Estos resultados sugieren que *Listeria monocytogenes* no tiene mayor dificultad para desarrollarse e incrementar su población en un ambiente refrigerado y que la contaminación se produjo efectivamente en el queso fresco.

Sistema 2 "Problema": se observó una disminución de 4 ciclos logarítmicos a

través de los 7 días de evaluación, obteniendo así una reducción considerable de la carga bacteriana gracias al efecto inhibitorio del extracto de ajo. De las 5 muestras se observaron solo colonias del género *Listeria* spp, todas correspondieron a la especie *Listeria monocytogenes* reportando así la efectividad de la inhibición del extracto de ajo sobre este género de bacteria. Hernández (2003) realizó un estudio sobre la actividad inhibitoria y letal del extracto de ajo para *Listeria innocua* y *Escherichia coli*. Se encontró una Concentración Mínima Letal (CML) para *Listeria innocua* de 0,125g ajo/mL agua, no se encontró bibliografía con el efecto inhibitorio sobre queso fresco por eso se optó en citar este estudio por ser referencia para la presente investigación. En relación a la Medida estadística descriptiva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* y Análisis ANVA (comparación del efecto de la concentración mínima letal de extracto de Ajo sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* FGB01-UNT en queso fresco en almacenamiento refrigerado se reportaron los siguientes resultados. Según la tabla 5, la desviación estándar fue similar en ambos sistemas, esto como resultado nos da una predicción afirmativa (con la distancia medida en desviaciones estándar), la medida estadística afirma el resultado de la inhibición del extracto de ajo sobre la *Listeria monocytogenes*.

Según la tabla 6, el análisis ANVA indica que la *Listeria* cambia su patrón de crecimiento con el tiempo ($p=0,000<0,05$), independientemente del tipo de queso fresco. Asimismo existe efecto de la concentración mínima letal del extracto de Ajo ($p=0,000<0,05$), pero el efecto en el tiempo varía de un tipo de queso a otro ($p=0,000<0,05$). Este análisis comprueba la diferencia significativa del tratamiento que presentó el extracto de ajo como agente antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes* en queso fresco refrigerado.

V. CONCLUSIONES

Se obtuvo una reducción de cuatro ciclos logarítmicos de las colonias de *Listeria monocytogenes* en el queso fresco refrigerado.

El agente disolvente etanol 99,7% no mostró actividad frente a las cepa analizada *Listeria monocytogenes*.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALCAZAR A, et al., El Cultivo del Ajo. En: Revista del campo. N° 34. El Espectador. Bogotá, Colombia, 1987. Pág. 6-7.
2. BLOCK, E.; Química del ajo y la cebolla. En: Investigación y Ciencia. 1997.
3. BAILEY et al., Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. México, 2004. Vol. 7 (1) Pág. 164.
4. BOREZEE, E. PELLEGRINI, E. Y BERCHE, P. 2000 OppA of *Listeria monocytogenes*, an Ologopeptide-Binding Protein Required for Bacterial Growth at Low Temperature and Involved in Intracellular Survival, Infection and Immunity, 68: 7068 – 7077.
5. CODEX STAN 283-1978. Norma general del Codex para el queso, 2009. [En línea]. Disponible en: www.codexalimentarius.net/download/standards/175/CXS_283s.pdf[Citado el 26 de Junio del 2011].
6. CRUZ V. Efecto de la alicina sobre el crecimiento y producción de biocapas en *Staphylococcus Epidermis*. [En Línea]. 1998. Disponible en: <http://perso.wanadoo.es/gcvq/Thesis%20index.htm> [Citado el 13 de Junio del 2011].
7. CASTAÑO, H.; GELMY, C.; ZAPATA, J. Y JÍMENEZ, S. 2010. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Rev. Fac. Química Farmacéutica. Volumen 17. Número 2. Págs. 149-154. ISSN 2145-2660.
8. CRISTÓBAL D. et al., Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú. [En línea]. Peru: UPCH, 2003. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v14n3/a02v14n3.pdf> [Citado el 13 de Junio del 2011].
9. GARCÍA P. Efecto inhibitorio de extracto acuoso de ajo sobre el crecimiento in vitro de *Candida Albicans*. [en línea]. Guatemala: Universidad Francisco Marroquín, 2002. Disponible en: <http://www.tesis.ufm.edu.gt/pdf/3389.pdf> [Citado el 23 de Junio del 2011].
10. GONZÁLEZ P. et al., Obtención y caracterización de la oleoresina del ajo (*Allium Sativum*). [En línea]. Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira, 2007. Disponible en: <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisdigitales/texto/66400154C268oc.pdf> [Citado el 13 de Junio del 2011].
11. GONZÁLEZ VILLARREAL MANUEL. Tecnología para la Elaboración de Queso Blanco, Amarillo y Yogurt. 2002. Disponible en: <http://www.argenbio.org/doc/tecnologia/paraelaboraciondequesos.pdf> [Citado el 13 de Julio del 2011].
12. HERNÁNDEZ P. Actividad inhibitoria y letal de los extractos de ajo para *Escherichia Coli* y *Listeria Innocua*. [en línea]. Cholula, Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla, 2003. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/hernandez_p_ld/ [Citado el 25 de Junio del 2011].
13. HALÁSZ A, BARÁTH A, SIMÓN-SARKADI L, HOLZAPFEL W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Sci Technol 2004.
14. JAY J. Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia; 1994.
15. LICATA M. Los quesos. Composición, elaboración y propiedades nutricionales, 1999. [En línea]. Disponible en: <http://www.zonadiet.com/comida/queso.htm>[Citado el 25 de Junio del 2011].
16. LAY U, PEÑA R, REVILLA P, VALDEZ C. Elaboración de un manual de aseguramiento de la calidad para la Empresa INALAC S.A. y un plan HACCP para la línea de queso fresco. [Tesis de licenciatura]. Lima: Universidad Nacional Agraria de La Molina; 1999.

17. Ministerio de Salud. Reglamento sobre vigilancia y control sanitario de los alimentos y bebidas. Lima: Ministerio de Salud; 2008.
18. MERCK, 1994. Manual de Medios de Cultivo. Alemania, 364 pág.
19. MOLINA, N MERCADO, R. Y CARRASCAL. 2006. Efecto del tiempo y temperatura de cocción en hamburguesas y longanizas inoculada artificialmente con *Listeria monocytogenes*. Bistua 201;8(1):31-42
20. MICHANIE. *Listeria monocytogenes* " La bacteria emergente de los 80". 2004. [En línea] Disponible en: http://www.bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Listeria-monocytogenes.pdf [Citado el 09 de Julio del 2011].
21. Manual de la OIE sobre animales terrestres. *Listeria monocytogenes*. 2004. [En Línea] Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogenes.pdf [Citado el 10 de Julio del 2011].
22. OMS. Inocuidad de los alimentos. [en línea]. 2011. Disponible en: http://www.who.int/topics/food_safety/es/ [Citado el 20 de Mayo del 2011].
23. PROMPYME. Elaboración de Queso Fresco. 2003. [En línea] Disponible en: http://infoagro.net/shared/docs/a5/Gtec_nol17.pdf [Citado el 12 de Julio del 2011].
24. Revista de fitoterapia. Sefit – Sociedad Española de fitoterapia. Volumen 7. 2007.
25. SEELIGER, H; R. JONES Y D. GENUS. 1986. *Listeria Pirie*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G. Baltimore, Williams and Wilkins. 2: 1235-1245.
26. SEGLAR, S.A. " MAIA QUESOS " EL SABOR DEL QUESO. 2009. [En Línea] Disponible en: <http://www.maiaquesos.com/index.html> [Citado el 14 de Julio del 2011].
27. SANTOYO D. et al., Alimentos funcionales (Compuestos azufrados). Página de docencia Universidad Autónoma de Madrid - Facultad de Ciencias. Madrid. Curso académico 2004-2005. Documento PDF. Disponible en: http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ssantoyo/funcionales/compuestosazufrados.pdf [Citado el 25 de Junio del 2011].
28. ZUDAIRE M. et al.; Ajo. [En Línea]. Consulta 30 de Mayo/2011. Disponible en: <http://verduras.consumer.es/documentos/hortalizas/ajo/imprimir.php> [Citado el 30 de Mayo del 2011].