



Artículo original

Efecto del probiótico *Bifidobacterium* BLC sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en helado

Effect of the probiotic *Bifidobacterium* BLC on the growth of *Salmonella typhi* in ice cream

Pedro E. Mercado Martínez¹ y Giulliana L. Rubio Reque²

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo (UNT). ²Exalumna de la Escuela AP de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

Salmonella typhi es unabacteria potencialmente patógena para el ser humano y que puede estar contenida en los alimentos. Con esta consideración este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto probiótico de *Bifidobacterium* BLC sobre el crecimiento de *S. typhi* en helado. Se establecieron cuatro sistemas, tres de control y un sistema problema donde se agregaron ambas bacterias en muestras de 100 grs de helado a una concentración final de 3×10^8 UFC/mL. Las muestras fueron incubadas en refrigeración (4°C) y evaluadas a los 0, 5, 10, 15 y 20 días mediante recuento de UFC/gr de las bacterias inoculadas.

*Bifidobacterium*BLC reduce hasta 3 logaritmos la población inicial de *S. typhi* y mantiene su población hasta los 20 días de evaluación. Esto permite concluir que el probiótico se constituye en una alternativa para proteger los alimentos refrigerados de la contaminación con *S. typhi*.

Palabras clave: Probióticos, helado, *Bifidobacterium*, bacterias patógenas, *Salmonella typhi*.

ABSTRACT

Salmonella typhi is a potentially pathogenic bacteria for the humans and it could be contained in the food with this consideration, the study had the objective of evaluate the probiotic effect of *Bifidobacterium* BLC on the growth of *S. typhi* contaminated in ice cream. It was established four systems, three of control and one as a problem system where both bacterias were added 100 grs of samples of ice cream at a final concentration of 3×10^8 UFC/mL. The samples was incubated in refrigeration (4°C) and evaluated at the 0, 5, 10, 15 y 20 days through UFC/gr recount of the inoculated bacterias. It was concluded that *Bifidobacterium* BLC has inhibitory action on the growth of *S. typhi* in ice cream and its viability doesn't affected in this food until the 20 days of evaluation, so represent an alternative to protect the refrigerated food that could be contaminated with *S. typhi*.

Palabras clave: Probiotics, ice cream, *Bifidobacterium*, pathogenic bacterias, *Salmonella typhi*.

INTRODUCCIÓN

El intestino delgado del hombre es una zona de transición entre el estómago y el colon; en él se constituye un verdadero cultivo autorregulable, una transición gradual de la flora Gram-positiva a una población Gram-negativa^{1,2,3,4}; porque no contiene una flora que le sea propia y solamente algunas bacterias puede resultar representativas^{5,6,7}; debido a que su vulnerabilidad es variable, en ciertas circunstancias este equilibrio se afecta por el uso de antibióticos, cambios de alimentación, estrés, edad, la genética, la dieta etc., que aumentan la susceptibilidad a la infección².

El ácido gástrico y el flujo peristáltico normal del intestino delgado limitan las poblaciones bacterianas del tracto gastrointestinal alto que permite diferenciar hasta dos tipos de flora intestinal: la flora residente o autóctona y la pasajera o transitoria; la primera se adhiere a las células epiteliales de la mucosa, son microorganismos fijos que se multiplican con rapidez, que están bien adaptados y son estables e inocuos; así también, la flora pasajera no se fija al epitelio ni se establece en el intestino y está formada por los microorganismos no patógenos procedentes de la porción superior del tubo digestivo, los alimentos y el medio ambiente^{7,8}.

Tener una flora estable y bien equilibrada es una garantía de buena salud ya que evita la colonización y el sobre desarrollo de microorganismos patógenos.; por ello, el desequilibrio de la flora puede prevenirse con la administración de cultivos microbianos vivos denominados probióticos⁹; estos deben reunir algunas características como ser habitante normal del intestino humano, sobrevivir al medio ácido del estómago y efecto de la bilis en el duodeno y producir sustancias antimicrobianas^{10,11}; por lo tanto, son aquellos que, al ser agregados en cantidades adecuadas como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino del huésped^{12,13,14}.

Son múltiples los efectos beneficiosos que han sido atribuidos a la administración de probióticos, se pueden categorizar en nutricionales o beneficiosos terapéuticos; dentro de lo nutricional aumenta la biodisponibilidad de calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo¹⁵; a nivel terapéutico, se puede utilizar para tratamientos de desórdenes intestinales, hipercolesterolemia, supresión de enzimas pro-carcinogénicas e inmunomodulación, participan en la producción de vitaminas, como la vitamina B; favorece el peristaltismo intestinal, entre otros^{16,17}.

La capacidad de las bacterias probióticas para sobrevivir a través del tracto gastrointestinal a pesar de la acidez gástrica y la toxicidad de la bilis; después de sobreponerse estas dos condiciones adversas, son capaces de minimizar la proliferación de agentes patógenos compitiendo por un nicho o espacio físico en las paredes intestinales¹⁸; entre los microorganismos probióticos utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL) que comprenden lactobacilos y bifidobacterias^{2,10}, pero también se utilizan otras cepas bacterianas no patógenas, como *Streptococcus*, *Enterococcus* y microorganismos no bacterianos, como *Saccharomyces boulardii*, que es una levadura no patógena¹¹.

Una forma de actuar de los probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo, es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, que se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas^{19,20}; la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos puros que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que tienen la ventaja de ser proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios²¹.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas; algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina²¹; también se incluyen a las siguientes:

Lactobacillus acidophilus, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis*, *L. cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros²².

Ciertas características propias de la microflora colónica permiten que predominen las bifidobacterias, un tipo de microflora que se caracteriza por producir ácidos grasos de cadena corta y de ácido láctico como producto de la fermentación de los carbohidratos, que disminuyen el pH en el colon creando un medio donde las bacterias potencialmente patógenas no puedan crecer y desarrollarse; de igual forma, producen bacteriocinas, que actúan como antibióticos e inhiben a las bacterias patógenas, estimulan del sistema inmune, especialmente del intestinal y fortalecen la capacidad de sintetizar algunas vitaminas del complejo B⁸.

Las especies del género *Bifidobacterium* son particularmente importantes ya que colonizan selectivamente el tracto intestinal de los recién nacidos en altas concentraciones, y éstas disminuyen con la edad¹⁸, representando hasta el 91% de su flora, y en adultos entre el 3% y el 7%¹³; la presencia de las distintas especies varía con el individuo, la edad y alimentación, siendo estas bacterias, un 91% de la flora predominante en los niños alimentados con leche materna; por el contrario, el intestino de niños alimentados con formulas infantiles está colonizado por una microbiota mas heterogénea (*Enterobacteriaceae*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus*, etc.)^{18,23}.

Se han encontrado bifidobacterias aisladas de heces de niños que producen péptidos antimicrobianos activos frente a *Listeria monocytogenes* y sólo se ha purificado una bacteriocina (Bifidocina B) de *B. bifidum* NCFB 1454, que posee un espectro de inhibición restringido a bacterias Gram-positivas²⁴; sin embargo, recientemente se ha demostrado que algunas cepas del género *Bifidobacterium*, así como sus metabolitos adicionados, en forma de extractos sin purificar, actúan como inhibidores del desarrollo de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en alimentos y bebidas; es decir, actúan como cultivos bioprotectores en alimentos²⁵; por ejemplo, en las leches fermentadas y no fermentadas se comprobó su capacidad para secretar compuestos antimicrobianos al medio de cultivo durante su crecimiento^{26,12}.

Se considera que, *Bifidobacterium* es esencial en el mantenimiento del equilibrio del ecosistema intestinal y el desplazamiento de microorganismos potencialmente perjudiciales; se considera que cepas de este género ejercen efectos beneficiosos en el tratamiento de la diarrea del viajero, las infecciones por rotavirus y la diarrea asociada al uso de antibióticos²⁶; también se han descrito sus efectos antagónicos frente a patógenos de los géneros *Clostridium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Proteus* y *Escherichia*²⁴; y en otros casos se aplican para inhi el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como estafilococos y listerias, respectivamente²¹.

La infección por *Salmonella* es una infección por fases, la puerta de entrada es la vía digestiva, donde el bacilo debe superar la barrera defensiva representada por la acidez gástrica antes de adherirse e invadir las células del epitelio intestinal y penetrar por medio de ciertos genes de virulencia en su interior, donde se multiplica y produce alteraciones histopatológicas^{27,28,29,30,31}; por ello se considera, uno de los patógenos más importantes en el sector alimenticio de significación en salud pública; teniendo como vehículos de transmisión a una variedad de alimentos incluyendo la carne y las aves de corral, leche, helado, queso, los huevos y los productos de huevo, chocolate y las especias³².

La actividad antagónica de *Bifidobacterium* contra *Salmonella* fue examinada in vitro por varios investigadores en diferentes medios, uno de los más recientes fue el 2008, donde se comprobó en yogurt esta actividad antimicrobiana de *Bifidobacterium* hacia *Salmonella spp.*, debido a que todas las cepas demostraron diversos grados de acción antagónica hacia la cepa indicada; siendo el grado más alto de la inhibición (96%) el obtenido con *B. infantis* y *B. longum* (el 92%); esto se basó en la producción de ácidos orgánicos, particularmente ácido láctico, que tiene un efecto inhibitorio contra bacterias Gram-negativas³³.

Debido a que existen diversos trabajos que han evaluado el efecto de cultivos probióticos sobre el crecimiento de bacterias patógenas, obteniéndose resultados diversos pero que identifican claramente la acción antagónica de especies de probióticos sobre microorganismos patógenos; además dada la importancia que en la actualidad está tomando el uso de los probióticos, como alimentos funcionales para mejorar la respuesta inmune frente a bacterias patógenas, es de interés público; así mismo, existe una preocupación relacionado con las mala practicas sanitarias en la preparación de alimentos y su relación con la producción de brotes alimentarios, en la que la presencia de *Salmonella typhi* son las principales causas de intoxicación alimentaria a nivel mundial.

Entonces: ¿Cuál es el efecto *in vitro* de *Bifidobacterium* BLC sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en helado? Considerando los antecedentes se hipotetiza que: el probiótico *Bifidobacterium* BLC tiene efecto bactericida disminuyendo el crecimiento de *Salmonella typhi* en helado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

- Cultivo de *Bifidobacterium* BLC liofilizado comercializado por el Laboratorio Deltagen del Perú S.A.
- Cultivo de *Salmonella typhi*, proporcionado por el Laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Helado D'onofriocomercializado por la fábrica Nestlé Perú.

Reactivación y estandarización del inóculo de *Salmonella typhi*

La reactivación del patógeno se hizo a partir del cultivo de *S. typhi*, en Agar McConkey, y se incubó a 37°C por 24- 48 horas. Luego, a partir del cultivo, se sembró por superficie en placas petri conteniendo Agar McConkey (Ver Anexo 01) y se incubó a 37°C por 24 horas.

Para la estandarización del inóculo se procedió a preparar una suspensión en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE) a una turbidez semejante al tubo N° 1 del nefelómetro de MacFarland (3×10^8 UFC/mL).

Reactivación y estandarización del inóculo de *Bifidobacterium* BLC

A partir del cultivo se sembró en tubos con Caldo de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Ver Anexo 02) y se incubó en ambiente de microaerobiosis con una atmósfera de CO₂ por 48 horas a 37°C; esto se logró poniendo las placas sembradas en una jarra Gaspac con una vela misionera prendida y un sobre de antiácido "Alka seltzer" que fue el productor de CO₂. Luego, la suspensión incubada fue sembrada en placas con agar de MRSe incubadas en microaerobiosis con ambiente de CO₂ por 48 horas a 37°C.

Para la estandarización del inóculo se procedió a realizar una suspensión en SSF, a una turbidez semejante al tubo N° 1 del nefelómetro de MacFarland (3×10^8 UFC/mL).

Distribución y Pasteurización del helado

Se adquirió 10 L. de helado de sabor a lúcuma y se ajustó el pH del helado a en un rango de 6,5 a 7,0; luego se distribuyó en recipientes de plástico a razón de 100g cada uno, hasta alcanzar un total de 20 recipientes; luego, se procedió a taparlos. Todos los potes fueron pasteurizados en baño maría a 90 °C por 2 min. Enfriados a temperatura ambiente y se midió el pH para tener un dato inicial de referencia.

Implementación de los sistemas de ensayo e inoculación

Se conformarán los siguientes sistemas de ensayos:

Sistema 1 (Control Negativo): 5 recipientes con 100g de helado cada uno, sin inoculación.

Sistema 2 (Control para *B. BLC*): 5 recipientes con 100g de helado cada uno, se adicionó 1mL de inóculo de *Bifidobacterium* BLC

Sistema 3 (Control para *S. typhi*): 5 recipientes con 100g de helado cadauno, se adicionó 1mL de inóculo de *S. typhi*.

Sistema 4 (Problema): 5 recipientes con 100g de helado cada uno, se adicionó 1mL de cada inóculo (*Bifidobacterium BLC* y *S. typhi*.)

Condiciones de Incubación y medición de las poblaciones

De acuerdo al esquema de ensayo. Se homogenizó el inóculo con el helado y luego cada sistema se colocó en refrigeración (4°C) para su posterior evaluación.

Las poblaciones de *Bifidobacterium BLC* y *S. typhi* fueron determinadas por recuento total de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en cada uno de los sistemas mencionados utilizando un pote para cada medición. Estas poblaciones se midieron a los 0 (inicial), 5, 10, 15 y 20 días.

Recuento total de *Bifidobacterium BLC* y *S. typhi*

Para el recuento de *Bifidobacterium BLC*, se realizó diluciones decimales seriadas tomando 0,1 mL de estas (solo tres últimas diluciones) para sembrar por superficie con asa de Drigalski en placas con Agar MRS suplementado con antibióticos y se incubaron en microaerobiosis con ambiente de CO₂ por 48 horas a 37° C.

El recuento de *S. typhi* se realizó diluciones decimales seriadas tomando 0,1 mL de estas (solo tres últimas diluciones) para sembrar por superficie con asa de Drigalski en placas con Agar McConkey y se incubó por 48 horas a 37° C. Las siembras fueron realizadas partir de diluciones decimales de 10⁻⁶, y se fueron aumentando según el crecimiento anterior observado.

Medición de pH

Se hicieron mediciones del pH inicial del helado así como durante cada una de las determinaciones de las poblaciones bacterianas.

Análisis de resultados

Se utilizó el promedio de las mediciones como valor final para interpretar los resultados; la comparación de los grupos experimentales con el grupo testigo se realizará con la prueba T student³⁴.

RESULTADOS

La supervivencia de *S. typhi* en el sistema 2, control sin probiótico, disminuyó un logaritmo en relación al inóculo inicial; mientras en el sistema 4 con el probiótico, hay una disminución de 3 logaritmos (p<0,05) (Fig. 1)

El crecimiento de *B. BLC* en el sistema 3 y en el sistema 4 aumentó, aunque no se observó diferencias significativas (Fig. 2).

En la Figura 03, se presenta el efecto del probiótico *B. BLC* sobre *S. typhi* en el sistema 4, control problema; observándose que en los días 0 a 10, *B. BLC* crece mientras que *S. typhi* disminuye.

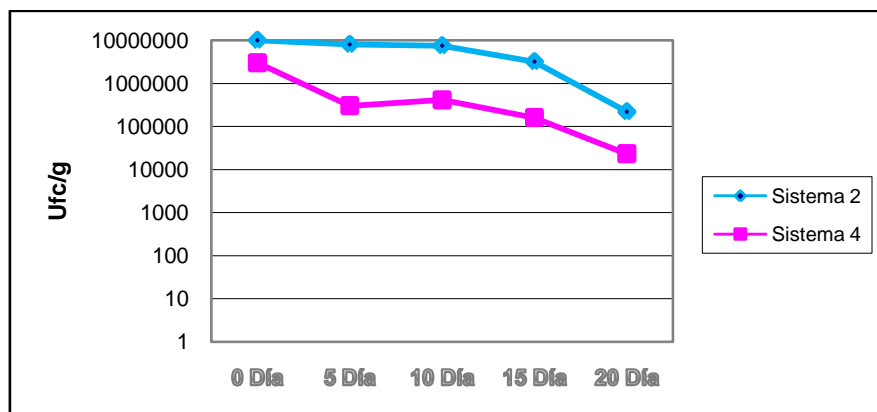


Fig. 1. Supervivencia de *Salmonella typhi* en el sistema 2(control sin probiótico) y sistema 4(problema) a través del tiempo.* Prueba T: Si hay diferencia significativa (Tc=-2,40< Tt= 2,301).

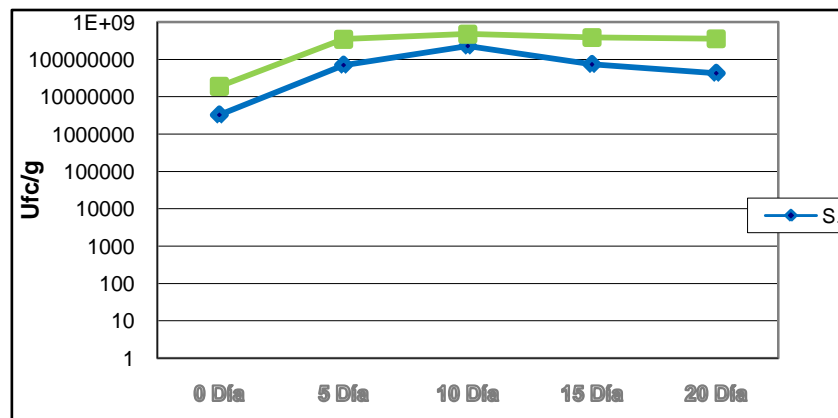


Fig. 2. Crecimiento de *Bifidobacterium BLC* en el sistema 3 (control sin patógeno) y sistema 4 (problema) a través del tiempo. * Prueba T: No hay diferencia significativa ($T_c = 2,28 > T_t = 2,301$)

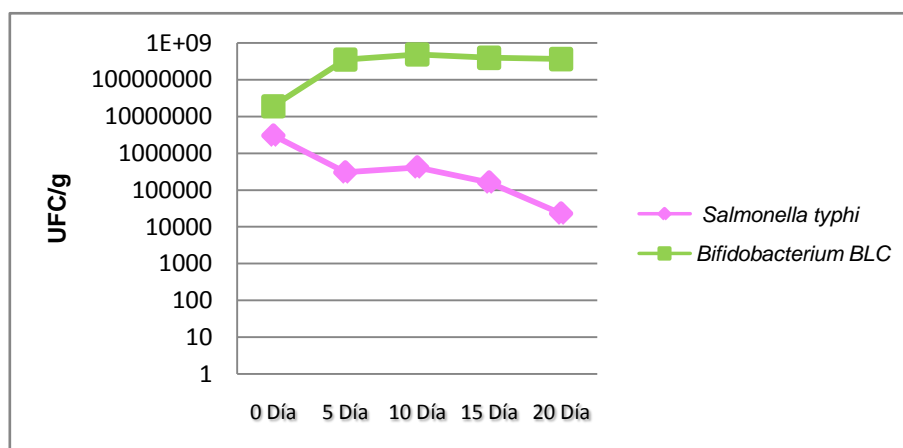


Fig. 3. Efecto del probiótico *Bifidobacterium BLC* sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en el sistema 4 a través del tiempo.

DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han demostrado que varias especies de probióticos presentan una acción antagonista en contra de patógenos intestinales³⁵⁻³⁸, esta acción es constatada al evaluar cada sistema de helado inoculado a través del tiempo, los cuales presentaron una disminución en la población del microorganismo patógeno agregado; en la Figura 01, se muestra la supervivencia de *Salmonella typhi* en los sistemas 2 y 4; el cual inicia en el sistema 4 con una concentración inicial de 3×10^6 Ufc/mL y se reduce a 23×10^3 Ufc/mL al término de los 20 días de evaluación (Ver Anexo 03); disminuyendo 3 logaritmos; lo cual nos indica que el probiótico está actuando sobre el crecimiento de *S. typhi*.

También se observa que en la Figura 02 el número inicial de *Bifidobacterium BLC* fue de 10^6 para el sistema 3 y 10^7 , en el sistema 4; y el aumento fue entre los 0 a 10 días, respectivamente (Ver Anexo 03); este rango es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud como la cantidad necesaria para que ejerzan sus efectos beneficiosos sobre nuestro organismo, a pesar de la reducción que sufren al pasar por la barrera de la acidez estomacal³⁹.

La disminución del crecimiento de *S. typhi* en el sistema 4 con el probiótico se observó entre los 0 a 10 días (Ver Figura 01); esto puede deberse a varias razones, incluyendo la

competencia por nutrientes y espacio, la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, disminución del potencial de óxido reducción, entre otros^{40, 41, 42}; o al pH del medio³⁸; o quizás, *S. typhi* resistió las condiciones de refrigeración, lo cual le posibilitaría mecanismos para adaptarse a la acción del probiótico.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por algunas bacterias como una estrategia de competencia por nutrientes y espacio⁴³ ante la presencia de otra bacteria competidora⁴⁴, estrés por temperatura o pH⁴⁵ y un mecanismo de “censado poblacional” o “*quorum sensing*”⁴⁶, además de participar en la comunicación celular⁴³; las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas (LAB) como *Bifidobacterium*, reducen la viabilidad de las células que sobreviven incluso a un estrés subletal; entran a través de las paredes para desestabilizar las membranas citoplasmáticas; y mecanismos reguladores, alteraciones en diferentes rutas metabólicas^{35, 47-51}, permitiendo la salida de moléculas importantes como aminoácidos y ATP, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular^{52, 53} (Ver Anexo 04); logrando así matar bacterias Gram negativas y Gram positivas⁴⁸.

Cabe resaltar, que en otros trabajos realizados con *Bifidobacterium* frente a *Listeria monocytogenes*³⁴ o *Staphylococcus aureus*⁵⁴, su población disminuyó más de 4 logaritmos en el sistema 4; caso contrario a lo que ocurrió con *S. typhi*, que durante el periodo de evaluación disminuyó solo 3; esta leve diferencia pudo deberse al comportamiento de las bacteriocinas producidas por *Bifidobacterium*; por la acción de la mutagénesis específica de sitio, se pueden producir bacteriocinas variantes que podrían diferir en sus espectros antimicrobianos y características físico-químicas^{35, 47}.

Por otro lado, es necesario destacar que la acidez del medio es un factor importante en el control del crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos en ambientes ácidos³⁸; no obstante, el pH de los sistemas evaluados mostró modificaciones a través del tiempo de incubación, se mantuvo entre 6,5 a 5,0 en todos los sistemas (Ver Anexo 05); donde el pH bajo influye determinadamente en la capacidad de sobrevivencia del probiótico⁵⁵⁻⁵⁷; la población de *Bifidobacterium BLCa* un pH 5 permaneció en 10⁷ Ufc/mL, el mínimo estipulado para una buena función sobre nuestro organismo^{57, 63}.

Además, el descenso del pH del medio no afectó el crecimiento de *S. typhi*, ya que ésta es capaz de crecer en ambientes de pH aún más ácido⁵⁸; en diversos estudios⁵⁹⁻⁶¹ esta bacteria entérica ha demostrado su resistencia a pH ácido (3,0 a 4,0); debido a que desarrolla varios mecanismos inducibles para sobrevivir a periodos transitorios de ácido extremo⁶²; Cabe mencionar que, la capacidad de multiplicación que *S. typhi* posee a bajas temperaturas es de 7°C⁵⁸; siendo 4°C la temperatura mínima para el almacenamiento de los sistemas durante la evaluación; entonces, podemos deducir que no se desarrolló sino que se mantuvo a las condiciones de refrigeración; el cual está relacionado con factores como el choque frío, la formación de cristales, la desnaturalización de proteínas y la incorporación de oxígeno al medio⁵⁷.

En el sistema 1, control, no se observó crecimiento de *S. typhi* ni de *Bifidobacterium BLC* lo que indica que estos microorganismos no están presentes originalmente en el helado utilizado o que fueron eliminados por completo en nuestra pasteurización; y que durante el tiempo de evaluación las placas no fueron contaminadas con alguna otra bacteria; por lo tanto deducimos que no hubo interferencia con nuestros resultados.

Por lo tanto, en base a resultados obtenidos y dadas las anteriores aseveraciones y trabajo encontrados⁶³; es muy probable que la disminución de la población de *S. typhi* en el sistema 4 no fue por el pH ni temperatura, pero si está asociada al probiótico presente y/o a sus productos metabólicos; debido a que entre los 0 a 10 días el crecimiento de *S. typhi* disminuye, mientras *Bifidobacterium BLC* aumenta su crecimiento; se podría decir que en este lapso de tiempo se da la acción probiótica del *Bifidobacterium*. (Ver Figura 03).

CONCLUSIONES

- *Bifidobacterium BLC* tiene acción inhibitoria sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en helado.
- La crecimiento de *Bifidobacterium BLC* no es afectado por la composición del helado ni por la presencia de *Salmonella typhi*.

RECOMENDACIONES

- Prolongar el periodo de evaluación hasta llegar a la muerte *Salmonella typhi*.
- Implementar o reforzar las normas de bioseguridad en el laboratorio de trabajo para así evitar la contaminación y posible infección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castro L, Rovetto C. Probióticos: Utilidad Clínica. Rev. Colombiana Médica. Colombia; 2006. 37 (6): 308-314.
2. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000; 130: 396-402.
3. López M, Domingo D. Antibiótico terapia con prebióticos. Barcelona; 2006
4. Heller S. Microflora del tracto gastrointestinal en el niño. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de diarreas. Rev. Enfermedades infecciosas en pediatría. España; 1998. 11(6): 179
5. Noriega L. Modificación de características fisiológicas en el género *Bifidobacterium*. Instituto de Productos Lácteos. España; 2004
6. Suárez L, Perdomo M, Escobar H. Microflora bacteriana y ecosistema intestinal. Fisiopatología del intestino delgado contaminado. Diarrea aguda. Medio Ambiente en España. Gen; 1994. 48(2): 61-64
7. Castillo C. Ecosistema intestinal. SisBib UNMSM. Lima, Perú
8. Arbo A, Santos J. Diarrheal diseases in the immunocompromised host. *Pediatr Infect Dis J*. 1987, 6:894-906.
9. Blum S. Intestinal Microflora and the interaction with immunocompetent cells. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999. 76(1-4): 199-205
10. Young RJ, Huffmans S. Probiotic use in children. *J Pediatr Health Care* 2003; 17: 277-283.
11. Dunne C, O'Mahony L, Murphy E, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Suppl): 386-392.
12. Berrocal D, Arias M, Henderson M. Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *L. monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogurt. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2002; 52 (4): 357-380.
13. Harmsen P. Analysis of intestinal floral development in breast-feed and formulafeed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-67.
14. O'Sullivan M, Thornton G, O'Sullivan G y Collins J. Probiotic bacteria: Mith or reality. *Trends Food Sci Tech* 1995; 3: 09-14.
15. Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int Dairy J* 1998; 8:993-1002.
16. Robaek S, Johansson M, Molin S. Alteration of intestinal Microflora in associated with reduction in abdominal bloating and pain with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000: 95:1-8.
17. Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 361-364
18. Iñiguez-Palomares C, Acedo-Félix A. Mecanismo de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *RESPYN* 2006; 7 (2): 21-26.
19. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17:725-40.

20. Sanders, ME. Probiotics: What, Why and When? Presented to the American Academy of Family Practitioners, Satellite Symposium. 2006. September 29, Washington DC. Disponible en: www.presentme.com/harvard/sept2006.asp#
21. González B, Treviño M, Jimenez Z. Bacteriocinas de probióticos: Características, propiedades antibacterianas y modos de acción. RESPYN 2003; 4(2): 99-106
22. Wildman R. Probiotics and prebiotics: Nutraceutical and functional foods. USA: CRC Press 2001
23. Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L. Short-chain fructooligosaccharide administrations dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy humans. J Nutr 1999; 129:113-116
24. Gibson G, Beatty E, Wang X y Cummings J. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. J Appl Bacteriol 1994, 77: 412-420.
25. Sanz Y, Colado M, Dalman J. Contribucion de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. Acta Pediatr Esp 2006; 64: 74 -78.
26. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 119-121
27. Koneman E, Allen V, Dowel V, Sommers H. Diagnóstico Microbiológico. 5ta ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999
28. Lennette E. Microbiología Clínica. 3ra ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1998.
29. Walker S. Microbiología. Mexico: Graw Hill Interamericana; 1999
30. Baumler A. The record of horizontal gene transfer in *Salmonella*. Trends in Microbiol; 1997. 5 (8)
31. Flores L. Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis* aisladas de ambientes marinos. Tesis para optar el título de Biólogo. SisBib.UNMSM, Lima, Perú. 2003.
32. D'Aoust J. *Salmonella* in foodborne bacterial pathogens. En: Doyle M, Dekker M. Food Contamination and Toxicology. New York, 1989
33. Cheikhoussef A, Pogori N, Tian F, Chen W y Zhang H. Interaction of *Bifidobacterium* and yogurt mixed cultura with *Salmonella* durante associated cultures growth. Biotechnol 2008; 7(3): 563-568.
34. Villanueva G. Efecto del probiótico *Bifidobacterium bifidum* sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en helado. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo. 2009.
35. Naidu A, Bidlack W y Clemens A. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci Nut 1999; 38(1): 13-126.
36. Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. J Nutr 2000; 130(2S Suppl): 415S-416S
37. Ray B y Daeschel M. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC press. 1992. 17: 125-132
38. Barrantes X, Raileyl D, Arias M y Chaves C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos de dos diferentes marcas de yogurt comercial sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. Arch Latinoamer Nutr 2004; 54(3): 293-297
39. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of Lactobacillus. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 3763-3766.
40. Gahan C, Driscoll O y Hill C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Food Tech 1996; 62: 3128-3132.
41. Ouwehand A; Tuomola E; Tolkkio S y Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel Probiotic strains to human intestinal mucus. Int J Food Microbiol 2001; 64: 119-126.
42. Dombou M, Tomioka I, Tsurutani R, Kitabatake S y Nakajima H. Method for production of a growth factor for *Bifidobacterium* sp. United States Patent US5294546. 1994.
43. López M, Ochoa J y Santoyo A. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Rev Mex Sci Farm 2008; 39(3): 49-57
44. Maldonado A., Jiménez D. R., Ruiz B. J. L. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific Gram positive bacteria is mediated by autoinduction mechanism. J Bacteriol 2004; 186(5):1556-1564.
45. McAuliffe O, Ross R, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol Rev 2001; 25:285-308.
46. Kuipers O, De Ruyter P, Beerthuyzen M, De Vos W. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. J Biotech 1998; 64(1):15-21.
47. Jack R, Tagg J, Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microb Rev 1995.59(2): 171-200.

48. Kalchayanad N, Itanilin M, Ray B. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin Acti and nisin. *Lett Appl Microbiol* 1992; 15(6):239-243
49. Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado M. Low-pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Bifidobacterium longum* Biotype *longum*. *Appl Env Microbiol* 2007; 73(20): 6450-6459
50. Cotter P y Hill C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 429-453.
51. Ruiz-Larrea F, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Navarro L. Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y de la dosis de SO₂. *Internacional Symposium Microbiology and Food Safety of Wine*. España, 2007.
52. Cotter P, Hill C y Ross R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 2005.3:777-788.
53. Wiedemann I, Breukink E, Van Kraaij C, Kuipers O. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem* 2001; 276(3):1772-1779.
54. Maldonado A. Evaluación de la acción probiótica de *Bifidobacterium BLC*, en helado, contaminado con *Staphylococcus aureus*. Tesis de Biólogo. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. 2009.
55. Martin J. Technical consideration for incorporating bifidobacteria and bifidogenic factors into dairy products. *Bull IDF* 1996; 313:49-51.
56. Modler H, Mckellar R, Goff H, Mackie D. Using ice cream as a mechanism to incorporate bifidobacteria and fructooligosaccharides into the human diet. *Cult Dairy Prod J* 1990; 25(3):4-9.
57. Corrales A, Henderson M, Morales I. Sobrevivencia de microorganismos probióticos en helado batido *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en helado batido. *Rev Chil Nutr* 2007; 34(2): 157-163
58. Ministerio de Salud de Nueva Zelanda. Microbial Pathogen Data Sheets: *Salmonella typhi*. New Zealand Food Safety Authority; 2001. <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/index.htm>
59. Foster JW. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J Bacteriol* 1991. 173(21): 6896-902.
60. Lin J, Lee I, Frey J, Slonczewski J, Foster JW. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177(14): 4097-4104
61. Foster JW. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21(4): 215-37
62. Moreno M. Inducible acid tolerance mechanisms in enteric bacteria. [Novartis Found Symp](#). 1999. 221:55-69
63. Gonzales B, Jimenez Z, Heredia N, Villarreal L. Efecto de microorganismos probióticos sobre el crecimiento de *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium*. *Ciencia UANL* 2006; 9(4):365-374.

Correspondencia: Pedro Mercado Martínez

E-mail: