

Efecto del cloruro de sodio, sales biliares y pH en la actividad antibacteriana de *Bifidobacterium animalis* sobre *Listeria monocytogenes*

Pedro Mercado Martínez¹; Luis Llenque Díaz²

Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo

¹Teléfono: 231864 Email: peemercado_1@hotmail.com

²Teléfono: 215933, Email: lullediaz@yahoo.com

RESUMEN

El estudio consistió en evaluar la variación del efecto antibacteriano de *B. animalis* sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* sometido previamente a diferentes concentraciones de cloruro de sodio, sales biliares y valores de pH en sistemas individuales. Se colocaron 2 ml de inóculo de *B. animalis* en cada tubo y se prepararon sistemas separados con, cloruro de sodio al 3,0% y 5,0%, sales biliares al 1,5% y 3,0% y pH 1,5 y 2,5 (problemas) y a los controles no se adicionó ninguna sustancia, se incubaron a 37°C por una hora en condiciones de microanaerobiosis. Paralelamente, se prepararon placas Petri con agar Muller-Hinton y medio semisólido inoculados con *L. monocytogenes* a una concentración final de $3,0 \times 10^7$ cél/ml, se les hizo cuatro pocillos de 0,8 mm de diámetro por placa a una distancia equidistante. La actividad antibacteriana de *B. animalis* se evaluó colocando 100 ul del contenido de los sistemas problemas y controles en cada uno de los pocillos de cada placa Petri y se incubó a 37°C por 48 h en condiciones de microaerobiosis. El efecto antibacteriano se evaluó midiendo el halo neto promedio de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. Entonces *B. animalis* mantuvo el mismo efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* "in vitro" cuando fue sometido previamente a cloruro de sodio 3,0 % y pH de 1,5, en tanto que una concentración mayor de sales biliares (5,0 %), y un pH de 2,5 disminuyó dicho efecto, e incrementó dicho efecto antibacteriano cuando fue tratado con sales biliares a las concentraciones de 1,5% y 3,0%.

Palabras clave: sales biliares, pH, *Bifidobacterium*, actividad antibacteriana, *Listeria*

ABSTRACT

The study consisted of assessing the variation of the antibacterial effect of *B. animalis* on the growth of *L. monocytogenes* previously subjected to different concentrations of chloride sodium, bile salts, and values of pH in individual systems. They were placed 2 ml of inoculum of *B. animalis* in each tube and prepared separate systems with sodium chloride to 3.0% and 5.0%, bile salts to 1.5% and 3.0% and pH 1.5 and 2.5 (problems) and controls are not added any substance, they incubated at 37 ° C for one hour in a microanaerobiosis position. At the same time, prepared with Muller-Hinton agar Petri plates and semi-solid medium inoculated with *L. monocytogenes* to a final concentration of 3.0×10^7 cells/ml, made them four wells of 0.8 mm in diameter per plate at a distance of equidistant. The antibacterial activity of *B. animalis* assessed by placing 100 ul of the contents of systems problems and controls in each of the wells of each Petri plate and incubated at 37 ° C for 48 hours under conditions of microaerobiosis. The antibacterial effect was assessed by measuring the average net halo of inhibition of the growth of *L. monocytogenes*. Then *B. animalis* maintained the same antibacterial effect on the growth of *L. monocytogenes* "in vitro" when it was subjected previously to sodium chloride 3.0% and pH of 1.5, while one concentration of bile salts (5.0%), and a pH of 2.5 diminished the effect, and increased this antibacterial effect when he was treated with bile salts in concentrations of 1.5% and 3.0%.

Keywords: bile salts, pH, *Bifidobacterium*, antibacterium activity, *Listeria*

I. INTRODUCCION

Los probióticos son microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que actúan en forma beneficiosa con el desarrollo de la flora microbiana en el intestino (Villena, 2011:4), estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo y actúan como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprolifáticos que son utilizados para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Penna, 1998:182) y se caracterizan por ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino al momento de ser consumido (Pardio, 1994:6); por lo tanto, un probiótico debe ser capaz de sobrevivir a su paso por el estómago y el intestino delgado, donde se encuentran dos barreras naturales importantes en los organismos de los mamíferos que son el pH ácido del estómago y la presencia de sales biliares en el intestino delgado (Corona, 2006:25).

Entre las bacterias probióticas más utilizadas en la industria alimentaria se encuentran las llamadas bacterias ácido lácticas, definido fisiológicamente por su capacidad para producir ácido láctico como uno de sus principales metabolitos resultante de la fermentación de carbohidratos, e incluyen a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y otras (González y col, 2003:99). *Bifidobacterium* posee distintas formas para competir en su ambiente, una de ellas es la producción de sustancias antagónicas (*Lactococcus* et.al, 2000:4084), como ácidos orgánicos en las que incluye mayoritariamente al ácido láctico y acético (Sanz y col, 2006:74), metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Gonzales y col, 2005:17).

Las bacteriocinas son proteínas con actividad antimicrobiana sobre especies genéricamente muy relacionadas y cuya actividad no es letal a la célula productora; algunas son producidas por bacterias ácido lácticas, como la nisina, que inhiben no solamente a bacterias de la misma especie, sino que también a patógenos presentes en alimentos como *L. monocytogenes* (Barboza y col, 2004:32). Otro tipo de bacteriocina, la bifidocina tienen un amplio espectro de inhibición que incluye no solo a bacterias Gram positivas sino también a un amplio número de bacterias Gram negativas (Sanz y Collado, 2005: 42).

Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas poseen carga neta positiva, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas; hidrofobicidad importante para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, y flexibilidad que le permite realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana, y otras bacteriocinas son estables al calor y activas en intervalos amplios de pH (López y col, 2008:2).

En general, las aplicaciones de las bacteriocinas dependen de su especificidad y características de actividad según las características del medio en que se encuentran: pH, solubilidad, fuerza iónica del alimento y sobre todo la temperatura, no todas se comportan igual en un mismo medio, como por ejemplo la nisina es más efectiva en entornos ácidos, dada su baja solubilidad a pH neutro y alcalino (Ross et.al, 1999:337).

Se ha caracterizado y purificado una bacteriocina denominada bifidocina B producida por *B. Bifidum* NCFB 1454, el mismo que mantiene su viabilidad bajo la influencia del pH, activa a pH de 2 a 10, cloruro de sodio, sales biliares y temperaturas bajas; además, se ha demostrado que es sensible a enzimas proteolíticas, resistente a tratamientos térmicos y solventes orgánicos (Yildirim y Johnson, 1998:50). También se ha demostrado que algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas toleran los cambios de pH y que la adición del cloruro de sodio al 4% permite el aumento de su actividad como la plantaricina S (Jimenez et.al, 1993:1415). Tal es así que algunas bacteriocinas son activas contra especies del género *Listeria* (Biavati y col, 2000:118).

Listeria monocytogenes es uno de los agentes patógenos comúnmente encontrado en alimentos contaminados (López y col, 2006:24), son bacilos gram-positivos, cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, móviles, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37°C, pero puede crecer a 4°C en pocos días, son anaerobios facultativas, catalasa positiva y oxidasa negativa (Seeliger

y col, 1986:1235). Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, puede encontrarse en el suelo, vegetales y formando parte de la flora fecal de muchos mamíferos y es capaz de sobrevivir a diferentes condiciones ambientales, de esta forma se ha aislado de vegetales crudos, leche, pescado, pavo y en carne fresca o procesada de pollo o res (Marzocca y col, 2005:54).

Así mismo, *L. monocytogenes* resiste diversas condiciones ambientales como amplios rangos de pH de 4,5 a 9,0; baja actividad de agua, 0,92 (Copes y col, 2000:47); altas concentraciones de sal y sobre todo su capacidad de sobrevivir y desarrollar a temperaturas de refrigeración (Kim, et. al; 2005:2356) y sobrevivir a tratamientos inadecuados de pasteurización (Espinoza y col, 2003:72).

Considerando que el cloruro de sodio, sales biliares y pH no influyen en la viabilidad de *B. animalis* y que éste tiene actividad probiótica contra *L. monocytogenes*, se planteó el siguiente objetivo: Determinar el efecto del cloruro de sodio al 3,0 % y 5,0 %; sales biliares de 1,5% y 3,0%; pH 1,5 y 2,5 en la actividad antibacteriana de *B. animalis* sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* in vitro; para conocer las condiciones óptimas de la actividad antibacteriana de Bifidobacterium y la potenciación de la misma.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Objeto de estudio

Material biológico

- *Bifidobacterium animalis*, obtenido de la casa comercial Sacco, Italia.
- *Listeria monocytogenes*, proporcionada por la cátedra de Fisiología y Genética Microbiana, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.

2.2 Métodos y técnicas

Procedimiento

1. Reactivación y preparación del inóculo de *B. animalis* (Zapata, 2010:10)

A partir del cultivo liofilizado, conservado en condiciones de refrigeración, a temperaturas entre -2 y -5 °C, se inoculó 0,3 g de cultivo en 2 ml de medio líquido Man Rogosa Sharpe (MRS), se incubó a 37 °C por 72 h, en condiciones de microanaerobiosis; luego, se realizó la propagación del cultivo en 20 ml de caldo MRS e incubado en las mismas condiciones por 48 h.

Del cultivo puro reactivado se realizó una suspensión en agua destilada estéril hasta obtener una concentración aproximada de $3,0 \times 10^8$ células/ml, comparándolo con el Nefelómetro de Mac Farland, constituyendo el inóculo a ensayar.

2. Reactivación del cultivo, preparación del inóculo y placas con medio inoculadas con *L. monocytogenes*

A partir del cultivo puro, conservado en caldo Brain Heart Infution (BHI) con glicerina bajo condiciones de refrigeración a temperaturas entre -2 y -5 °C, se realizó una siembra en caldo BHI y se incubó a 37 °C por 48 h, en condiciones de aerobiosis. Después se sembró en Agar BHI y se incubó a 37 °C por 48 h en condiciones de aerobiosis; a partir de una de las colonias características se sembró en agar Listeria inclinado y se incubó a 37°C por 24 h, en las mismas condiciones.

Del cultivo puro reactivado se realizó una suspensión en agua destilada estéril hasta obtener una concentración aproximada de $3,0 \times 10^8$ células/ml, comparándolo con el tubo N° 1 del nefelómetro de Mac Farland, constituyendo el inóculo a ensayar.

El inóculo se adicionó en medio semisólido para *Listeria* a una concentración de 1,0 ml de inóculo por cada 10 ml de medio y se mantuvo en baño maría de 45° C hasta su distribución en las placas con Agar Mueller-Hinton.

3. Implementación de los sistemas de ensayo

Se colocó 2 ml de inóculo de *B. animalis*, en cada uno de los 8 tubos, luego a:

- A un tubo se le agregó cloruro de sodio para alcanzar una concentración final al 3,0 % y a otro tubo al 5,0 %. (Problemas)
- A un tubo se le añadió sales biliares para alcanzar una concentración final al 1,5 % y a otro tubo al 3,0% (Problemas)
- A un tubo se les ajustó el pH a 1,5, con HCl 0,1 N, y a otro a pH 2,5 (Problemas)
- Dos tubos no recibieron ningún estímulo (Controles).

Todos los tubos fueron incubados a 37°C por 1 h y colocados en condiciones de microanaerobiosis (Zapata, 2010:10).

4. Evaluación de la actividad antibacteriana

En cada placa Petri estéril se vertió aproximadamente 12 ml de agar Mueller-Hinton y se dejó solidificar, luego se adicionó el medio semisólido inoculado con *L. monocytogenes* y se dejó solidificar e inmediatamente se realizaron 4 pocillos de 0,8 mm de diámetro, ubicados a 4 cm de distancia uno del otro, ayudados con una tubo de vidrio. Así mismo, se depositó 100 ul del cultivo de *B. animalis* que recibió el estímulo (Problemas) en cada uno de tres pocillos y 100 ul del tubo Control en el cuarto pocillo, y fueron incubados a 37°C por 24 h en condiciones de microanaerobiosis.

La lectura de los diámetros (mm) del halo de inhibición neto del crecimiento de *L. monocytogenes* producido alrededor de cada pocillo, se midió restando el diámetro del pocillo del diámetro total (Parente, 1992:293).

Cada uno de estos ensayos se realizó por triplicado.

5. Análisis estadístico

Las mediciones de los diámetros de halo de inhibición neto promedio fueron sometidos a la prueba del análisis de varianza (ANOVA); seguido de Tukey y Duncan usando el software SPSS (Parente, 1992:296) para determinar las diferencias significativas de cada sistema Problema con el sistema Control (Díaz, 2011;15).

III. RESULTADOS

En la Tabla 01, se observa que el ensayo control de *B. animalis* tiene un efecto antibacteriano de 7,0 mm de halo neto de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, y hay una disminución del efecto a las concentraciones ensayadas; según el Análisis de varianza (ANOVA), hay diferencia significativa entre el efecto del sistema control y las condiciones previas al ensayo; según Tukey y Duncan, dicha diferencia se da únicamente entre el sistema control y la concentración al 5,0 % de cloruro de sodio.

En la Tabla 02, se observa que las incubaciones previas en sales biliares al 1,5 y 3,0 % aumentó el efecto antibacteriano de *B. animalis* sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*; según el ANOVA se observa significancia entre el sistema control y la concentraciones evaluadas, que se confirma con la prueba de Tukey y Duncan, pero que ambas concentraciones tiene el mismo efecto.

En la Tabla 03, se observa que las incubaciones previas a pH 1,5 no modificó el efecto antimicrobiano de *B. animalis* sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* con respecto al control; en tanto que el pH 2,5 disminuyó dicho efecto; según el ANOVA se observa significancia entre el sistema control y la concentraciones evaluadas, y según la prueba de Tukey y Duncan, se confirma esta significancia solamente a pH 2,5.

Tabla 01. Diámetro del halo neto de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* por el efecto antibacteriano de *B. animalis* previamente sometido a las condiciones de ensayo con cloruro de sodio

Ensayo	Diámetro (mm) del halo neto de inhibición			
	1	2	3	X
Control	7,0	7,0	7,0	7,000
3, 0 %	6,0	7,0	6,0	6,333
5, 0%	3,0	4,0	4,0	3,666

Leyenda: Control: 0, 0 % de cloruro de sodio X: Promedio

Análisis de varianza(ANOVA): Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Diámetro del halo neto de inhibición de crecimiento

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Modelo corregido</i>	18,667 ^a	2	9,333	42,000	,000
Intersección	289,000	1	289,000	1300,500	,000
Nivel 1	18,667	2	9,333	42,000	,000
Error	1,333	6	,222		
Total	309,000	9			
Total corregida	20,000	8			

^a. R cuadrado = ,933 (R cuadrado corregida = ,911)

Diámetro del halo neto de inhibición de crecimiento

	Niveles de la tabla 1	N	Subconjunto		
			1	2	
DHS de Tukey ^{a,b}		5,0	3	3,666	
	% de NaCl	3,0	3		6,333
		,0	3		7,000
		Sig.		1,000	,269
Duncan ^{a,b}		5,0	3	3,666	
	% de NaCl	3,0	3		6,333
		,0	3		7,000
		Sig.		1,000	,134

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,222.

^a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

^b. Alfa = 0,05.

Tabla 02. Diámetro del halo neto de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* por el efecto antibacteriano de *B. animalis* previamente sometido a las condiciones de ensayo con sales biliares.

Diámetro (mm) del halo neto de inhibición				
Ensayo	1	2	3	X
Control	7,0	7,0	7,0	7,000
1, 5 %	9,0	10,0	9,0	9,333
3, 0 %	9,0	9,0	9,0	9,000

Leyenda: Control: 0, 0 % Sales biliares X: Promedio

ANOVA: Pruebas de los efectos inter-sujetos
Variable dependiente: Diámetro del halo neto de inhibición de crecimiento

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	9,556 ^a	2	4,778	43,000	,000
Intersección	641,778	1	641,778	5776,000	,000
Nivel 2	9,556	2	4,778	43,000	,000
Error	,667	6	,111		
Total	652,000	9			
Total corregida	10,222	8			

^a. R cuadrado = ,935 (R cuadrado corregida = ,913)

Diámetro de inhibición del crecimiento

Niveles de la tabla 2	N	Subconjunto	
		1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	,0	3	7,000
% de sales biliares	3,0	3	9,000
	1,5	3	9,333
	Sig.		1,000 ,483
Duncan ^{a,b}	,0	3	7,000
% de sales biliares	3,0	3	9,000
	1,5	3	9,333
	Sig.		1,000 ,267

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,111.

^a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

^b. Alfa = 0,05.

Tabla 03. Diámetro del halo neto de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* por el efecto antibacteriano de *B. animalis* previamente sometido a las condiciones de ensayo de pH del sistema.

Ensayo	Diámetro (mm) del halo neto de inhibición			
	1	2	3	X
Control	7,0	7,0	7,0	7,000
1, 5	7,0	7,0	7,0	7,000
2, 5	3,0	4,0	3,0	3,333

Leyenda: Control: pH 4, 0 X: Promedio

ANOVA: Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Diámetro del halo de inhibición de crecimiento

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	26,889 ^a	2	13,444	121,000	,000
Intersección	300,444	1	300,444	2704,000	,000
Nivel 3	26,889	2	13,444	121,000	,000
Error	,667	6	,111		
Total	328,000	9			
Total corregida	27,556	8			

^a. R cuadrado = ,976 (R cuadrado corregida = ,968)

Diámetro de inhibición del crecimiento

Niveles para la tabla 3	N	Subconjunto	
		1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	2,5	3	3,333
Valor de pH	4,0	3	7,000
	1,5	3	7,000
	Sig.		1,000
			1,000
Duncan ^{a,b}	2,5	3	3,333
Valor de pH	4,0	3	7,000
	1,5	3	7,000
	Sig.		1,000
			1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,111.

^a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

^b. Alfa = 0,05.

IV. DISCUSIÓN

Los probióticos producen sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas que aumentan la resistencia a la colonización, estimulan la producción de inmunoglobulinas e inhiben el crecimiento de patógenos (Villena,

2011:5). Tal es el caso de *Bifidobacterium animalis* que inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes* cuando estuvieron juntos en un mismo sistema de ensayo Control (placas petri con medio de cultivo).

Así tenemos que el efecto antibacteriano de *B. animalis* sobre *L. monocytogenes* no fue alterado por la incubación previa en cloruro de sodio al 3,0 y si, a la concentración del 5,0 %; en contraste con lo hallado por otros autores que afirmaron que la adición de cloruro de sodio al 4% permitió un aumento de la actividad de plantaricina S (Jimenez et.al, 1993:1418) y que la adición del 2,0 % de cloruro de sodio en combinación con una nisina (bacteriocinas), aumentó la eficacia de la misma (Pawar et.al, 2000: 114). En tal sentido, se supone una diferencia en el modo de actuar del cloruro de sodio sobre los compuestos antimicrobianos y que sería otra bacteriocina la que estaría participando en *B. animalis* durante el ensayo. Estadísticamente al comparar dicha actividad, mediante el ANOVA resultó ser significativo en relación al control y que la concentración del 5,0 % tuvo un efecto negativo al disminuir la actividad antibacteriana, en tanto que el 3,0 % no tiene significancia en relación al control, es decir no tuvo ningún efecto.

La actividad antibacteriana de *B. animalis* es afectada positivamente por las concentraciones 1,5 y 3,0 % de sales biliares en oposición a lo hallado por otros autores, este surfactante modula la actividad antimicrobiana detectada en los sobrenadantes de bifidobacterias, y favoreció la acción de la bifidocina producida por *Bifidobacterium* sp sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* (Huot, 1996: 307). Sin embargo también se demostró que las sales biliares afectaron a otras bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas como pediocina A y lactocina, disminuyendo su actividad (Mortvedt, 1991:1830). Estadísticamente se comparó dicha actividad y resultó ser tener diferencia significativa en relación al control y que se logra el misma intensidad de la actividad con cualquier de las dos concentraciones evaluadas.

El pH 2,5 disminuyó la actividad antibacteriana de *B. animalis* sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*, en tanto que el pH 1,5 no alteró dicha actividad en relación al control; es decir que la concentraciones de H⁺ no reaccionan intensamente con los grupos básicos de las proteínas (bacteriocinas), debido a que conforme el pH del medio se hace más bajo que el punto isoeléctrico, los aminoácidos de las proteínas se cargan positivamente (Berkeloff, 1996:325). Estos péptidos se unen a la membrana citoplasmática del patógeno a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos (cargados negativamente) que luego se insertan en la membrana de *L. monocytogenes* con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH (Gonzales et.al, 2005: 19). La evaluación estadística, refiere que existe diferencia significativa entre estos valores evaluados y el control y que dicha significancia se debería a que el pH 2,5 afecta negativamente la actividad antibacteriana de *B. animalis*.

Se supone que los ácidos lácticos producidos *B. animalis* penetran la membrana celular de *L. monocytogenes* y trastornan su potencial de membrana ocasionado la inhibición del transporte de nutrientes y actividad de la ATPasa (Copes y col, 2000:49). En concordancia con los resultados existen estudios que demuestran que la producción y acción de bacteriocinas está promovida por el pH (Lick et.al, 2001: 4139) y que además los compuestos responsables de la actividad antibacteriana son estables y activas a un amplio intervalo de pH que abarca de 2 a 11 (Sanz, 2005: 48); así mismo, también existen estudios que demuestran que la producción de bacteriocinas está promovida por pH ácido (Leal et.al, 2002:4467).

Cabe mencionar que las bacteriocinas son moléculas termorresistentes encargadas de la actividad antimicrobiana y que fundamentalmente presentan estabilidad térmica cuando está expuesto a 80°C durante 15, 30, y 60 min, y a 100 °C durante 15 y 20 min, pero a temperaturas inferiores sufren inactivación de sus péptidos disminuyendo su actividad antimicrobiana (Jiménez;1993:1415); los rangos de estabilidad térmica de otras bacteriocinas son amplios, abarcando de -5°C a 150 °C (Crespo y Gomez,2009: 82); así mismo, las bacteriocinas producidas por *Bifidobacterium* sp IATA-304, IATA-307 y IATA-0326 presentan dos tipos de sustancias de naturaleza proteica que se caracterizan por producir bifidocinas B estables a la temperatura bajas (Chen y Hoover, 2003: 85). Entonces será conveniente evaluar este parámetro en las condiciones adecuadas encontradas en la investigación.

V. CONCLUSIÓN

Bifidobacterium animalis mantuvo el mismo efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* "in vitro" cuando fue sometido previamente a cloruro de sodio 3,0 % y pH de 1,5, en tanto que una concentración mayor de sales biliares (5,0 %), y un pH de 2,5 disminuyó dicho efecto, e incrementó dicho efecto antibacteriano cuando fue tratado con sales biliares a las concentraciones de 1,5% y 3,0%.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOZA C, VÁSQUEZ A, SALCEDO H, BAUTISTA J. (2004). **Probióticos y conservadores naturales en alimentos**. Acta Universitaria., Vol. 14(nº 3): 32-38.
- BERKELOFF A, BORGET J, FAVARD P, GUINEBAULT M. (1996). **Biología y fisiología celular**. 2ª ed. Barcelona: Omega. S.A.
- BIAVATI B, VESCOVO M, TORRIANI S, BOTTAZZI V. (2000). **Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications**. Annals of Microbiology. Vol. 50: 117- 131
- CHEN H, HOOVER D. (2003). **Bacteriocins and their food applications**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety., Vol. 2: 82-100
- COPEL J, PELLICER K, MALVESTITI L, STANCHI N. (2000). **Sobrevivencia en tablas de cocina de Madera y plastic inoculadas experimentalmente con *Listeria monocytogenes***. Revista Analecta Veterinaria., Vol. 20(2):47-50
- CORONA V. (2006). **Identificación y determinación de la resistencia a pH ácido y sales biliares de *Bifidobacterium sp* aislados a partir del contenido gástrico del cerdo**. Trabajo de tesis para optar el título de Licenciatura en Ciencias de los Alimentos.
- CRESPO C, GÓMEZ A. (2009). **Una alternativa para la conservación de alimentos enlatados**. Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de alimentos. México, D.F.
- DÍAZ, E. (2011). **Efecto del sorbato de potasio y del propóleos sobre el crecimiento de *Aspergillus sp*, *Penicillium sp* y *Fusarium sp***. Tesis para optar el Título de Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.
- ENNAHAR S, SASHIHARA T, SONOMOTO K, ISHIZAKI A. (2001). **Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity**. FEMS Microbiol., Vol. 24: 85- 106
- ESPIÑOZA A, DE LA TORRE M, SALINAS M, SÁNCHEZ V. (2003). **Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, Enero -Marzo 2003**. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública., Vol. 21(2): 71-75
- GONZALES-MARTÍNEZ J, GÓMEZ T, JIMÉNEZ S. (2005). **Bacteriocinas de Probióticos: características, propiedades antimicrobianas y modo de acción**. Alimentario
- GONZÁLEZ B, TREVIÑO M, JIMÉNEZ Z. (2003). **Bacteriocinas de probióticos**. RESPYN., Vol. 4: 99-106
- HUOT E, BARRENA-GONZÁLEZ C, PETITDEMANGE H. (1996). **Tween 80 effect on bacteriocina synthesis by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris J46**. Lett. Appl Microbiol., Vol. 22: 307-310
- JIMÉNEZ DÍAZ, RÍOS SÁNCHEZ, DESMAZEUD, RUIZ BARBA, PIARD S. (1993). **Two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from green olive fermentation**. Appl Environ Microbiol., Vol. 53: 1416-1420
- KEREN T, YARMUS M, HALEVY G. (2004). **Immunodetection of the bacteriocina lactacin RM: analysis of the influence of temperature and tween 80 on its expression and activity**. Appl Environ Microbiol., Vol. 70: 2098-2104
- KIM J, D`SA E, Harrinson M, Harrinson J, Andress E. (2005). ***Listeria monocytogenes* survival in refrigerator dill pickles**. PubMed., Vol. 68(11):2356-61
- LAVERMICOCCA P, VALERIO F, EVIDENTE A, LAZZARONI S, CORCETTI A, GOBBETI M. (2000). **Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B**. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 66: 4084-4090

- LEAL M, JIMÉNEZ V, MALDONADO R, GARRIDO A, RUIZ B. (2002). **Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPC110.** Appl Environ Microbiol., Vol. 68: 4465-4471
- LICK S, DRESCHER K, HELLER K. (2001). **Survival of *Lactobacillus brueckii* subsp. Bulgaricus and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated gottling enminipigs.** Appl Environ Microbiol., Vol. 67: 4137-4143
- LÓPEZ J, OCHOA A, SANTOYO G, ANAYA J, MEDINA E, MARTÍNEZ M, LOEZA P. (2008). **Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos.** Revista mexicana de ciencias farmacéuticas., Vol. 39(3): 1-10
- LÓPEZ V, SUAREZ M, CHICO I, y col. (2006). ***Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿Son todos los alimentos igual de virulentos?** Revista Argentina de Microbiología., Vol. 38(4):23-38
- MARZOCCA M, MARUCCI M, SICA A. (2005). **Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina).** Revista Argentina de Microbiología., Vol. 36(4):52-55
- MAZORCA M, MARUCCI P. (2004). **Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca.** Rev. Argent. Microbiol., Vol. 36(4): 34-72
- MELANCON D, GRENIER D. (2003). **Production and properties of bacteriocin-like inhibitory substances from swine pathogen *Streptococcus suis* serotype 2.** Appl Environ Microbiol., Vol. 69: 4482-4488
- MORTVEDT C, NISSEN K, NES I. (1991). **Purification and amino acid sequence of lactocin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L 45.** Appl Environ Microbiol., Vol. 57: 1829-1834
- NEL H, BANER R, VANDAMME E, DICKS L. (2001). **Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PFD-1.** J. Appl Microbiol., Vol. 91: 1131-1138
- PARDIO S. **Los probióticos y su futuro.** Archivos latinoamericanos de nutrición. 1994; 46: 6-10
- PARENTE E, HILL C. (1992). **A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria.** J. Appl Bacteriol., Vol.73: 290-298
- PAWAR D, MALIK S, BHILEGAONKAR K, BARBUDDHE S. (2000). **Effect of Nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince.** Meat Science., Vol.56(13):112-121
- PENNA F. (1998). **Diarrea y probióticos.** Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Revista de enfermedades infecciosas en pediatría., Vol. XI (6): 182
- RILEY M, WERTZ E. **Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application.** Ann Rev Microbiol. 2002; 56: 117-137
- ROSS P, GALVIN M, MCAULIFFE O, MORGAN S, RYAN M, MEANEY W, HILL C. (1999). **Developing applications for lactococcal bacteriocins.** Vol. 76: 337-346
- SANZ Y, COLLADO M, DALMAN J. (2006); **Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales.** Acta pediatri esp. Vol. 64: 74-78
- SANZ H, COLLADO A. (2005). **Protein extracts with a wide range of antibacterial activity and strains of the genus *Bifidobacterium* which produce same.**
- SEELIGER H, JONES R, GENUS D. (1986). ***Listeria* Pirie. Bergey's manual of systematic bacteriology.** Williams and Wilkins. Vol. 2: 1235-1245
- VILLENA D. (2011). **Efecto del probiótico *Bifidobacterium* BLC sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco Brie-Floralp.** Tesis para optar el título de Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo.
- YILDIRIM Z, JOHNSON M. (1998). **Characterization and Antimicrobial Spectrum of Bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454.** J. Food Prot., Vol. 61: 47-51
- YILDIRIM Z, WINTERS D, JOHNSON M. (1999). **Purification, amino acid sequence and mode of action of Bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454.** J. Appl Microbiol., Vol. 86: 45-54

ZAPATA, K. (2010). **Efecto del probiótico *Bifidobacterium* BLC sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal.** Tesis para optar el Título de Biólogo Microbiólogo. Universidad Nacional de Trujillo-Perú.