



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Estudio de cepas de *Bifidobacterium spp.* presentes en
productos lácteos tipo yogurt.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO.

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Indira del Carmen Pérez Valduciel como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor 1: María Soledad Tapia

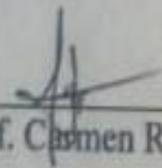
Tutor 2: Guillermina Alonso

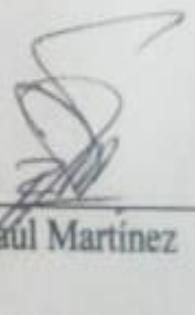
Caracas, Venezuela
Octubre- 2008

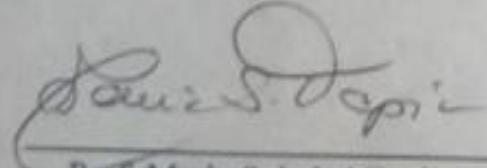
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. Indira del C. Pérez V.**

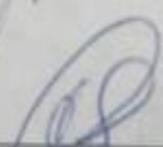
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Indira del C. Pérez V., C.I 16083914, titulado "Estudio de cepas de *Bifidobacterium spp* presentes en productos lácteos tipo yogurt", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 24 días del mes de Octubre del año 2008, dejando constar que la Prof. Maria Soledad Tapia actuó como coordinadora del jurado examinador.


Prof. Carmen Rodríguez


Prof. Raul Martínez


Prof. Maria Soledad Tapia
(Tutor 1)


Prof. Guillermina Alonso
(Tutor 2)



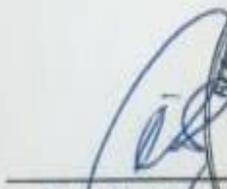


Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 04/11/2008, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller Pérez V. Indira del C., titular de la cédula de identidad No. 16.083.914; titulado: "Estudios de cepas de *Bifidobacterium sp.* Presentes en productos lácteos tipo yogurt." considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los diez días del mes de noviembre del año dos mil ocho.



Dra. Guillermina Alonso
Presidenta del
Consejo de la Escuela de Biología

GA/br.-

RESUMEN:

La adición de bacterias probióticas para la elaboración de alimentos funcionales es cada vez más frecuente en los productos fermentados. Un probiótico es un suplemento de origen microbiano, capaz de modular la inmunidad sistémica del intestino. Son utilizados para modificar o mejorar el equilibrio bacteriano intestinal, favoreciendo la salud de los consumidores. Los efectos que los organismos probióticos provocan en el sistema gastrointestinal dependen: a) Del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación, para obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales y b) de los factores extrínsecos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales. Entre los probióticos utilizados se encuentran las bifidobacterias.

En el país son pocos los estudios dirigidos a evaluar la caracterización microbiológica de las bifidobacterias. En este trabajo nos propusimos estandarizar las técnicas microbiológicas convencionales y automatizadas, además de estudios moleculares, para realizar estudios y obtener información de interés sobre los microorganismos de este género.

Se realizó el aislamiento de 30 colonias de cada tipo de yogurt analizado para un total de 60 colonias. Sólo 27 colonias del yogurt Bio y 11 colonias del yogurt Yogurtin, concuerdan con la identificación, según las pruebas microbiológicas aplicadas, y con las características del género *Bifidobacterium*. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con la galería Rapid ID 32 A para anaerobios. Estos resultados no arrojaron ningún perfil de identificación para estas cepas, ni para la cepa pura *B. lactis* utilizado en el estudio como un control positivo.

Se realizaron las siembras en dos medios selectivos reportados para este género (MRS suplementado y RCA), utilizando siembras por profundidad, tanto en placas como en tubos Miller-Prickett. Se comparó el crecimiento de estos microorganismos, encontrándose diferencias significativas en los títulos bacterianos obtenidos, en relación al medio utilizado y al método de siembra aplicado. El crecimiento en el medio MRS y la siembra en tubos Miller-Prickett, en cualquiera de las combinaciones fue significativamente mayor en comparación del crecimiento en el medio RCA y la siembra en placas.

La extracción de ADN realizada por el método de Gomes (1999) fue el más eficiente. Se visualizó la cantidad y calidad del material genético en geles de agarosa. La calidad del ADN fue ensayada con una amplificación del gen ribosomal del 16S

Los resultados obtenidos por ERIC-PCR concuerdan con los reportados en la literatura, afirmando la correcta identificación y la presencia de bifidobacterias en los aislados de los yogures. Los resultados de genotipificación permitieron demostrar una estrecha relación clonal entre los aislados.

En Venezuela no se han desarrollado estudios de identificación y caracterización molecular de este tipo de microorganismos de interés en la industria alimentaria. Este estudio representa el primer trabajo que demuestra que las técnicas moleculares basadas en secuencias repetidas ERIC y REP son una clave para la detección y caracterización microbiológica de especies de bifidobacterias de una forma rápida, sin descartar los métodos tradicionales de identificación.

DEDICATORIA

A Dios que me ayudó a mantenerme en este camino de lucha

A mis padres que son un digno ejemplo de trabajo, constancia y amor.

A mi hermana por su apoyo incondicional

Al futuro, el cual ayudará a llenarme de sabiduría y fuerza en, el que espero, sea un largo y fructífero camino.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecerle a la Universidad Central de Venezuela por darme la oportunidad de cursar mis estudios universitarios, dentro de las prestigiosas aulas de la máxima casa de estudio, esa casa que vence las sombras.

A mis padres y familiares, por que gracias a ellos, con sus consejos, amor y forma de vida, me han hecho una mujer de bien, y que finalmente está a punto de cumplir una meta más en mi vida, gracias por estar aquí apoyándome en mi camino. A mi Hermana que con ese rayito de luz que solo ella da me ha llenado de paciencia y momentos de apoyo cuando mas lo he necesitado.

A mis abuelas, primos, tíos en especial a mi tío Migue, Carmen y mis niños, por brindarme todo ese amor, cariño y comprensión y por motivarme a seguir en este camino. Espero algún día retribuirles todos aquellos momentos de mi ausencia

A mis dos tutoras Prof. Guillermina y Marisol, por permitirme lograr este trabajo maravilloso, por todos los consejos y regaños que me dieron, que ayudaron a convertirme en una mujer luchadora y segura de cada uno de los pasos que doy. Le doy gracias a mi jurado Prof. Carmen y Raúl por guiarme en este trayecto, por estar dispuestos a colaborar y por siempre brindarme esa mano amiga. A mis amigos de laboratorio tanto del ICTA Jorge y Francisco, como los del IBE Carlos, Yusi por hacerme reír y por que por cada día que falto al laboratorio logre obtener un resultado nuevo, Marialex, Giovany, Andreina y en especial a ADRI (el súper Ángel del laboratorio) por estar conmigo, dejarme aprender de ustedes y aconsejarme cuando mis Bifidos se ponía cada vez mas exquisitos!!!!.

A Beira Rojas y al personal del CVCM en especial a Isa, Liseth y la profesora Juana Vitelli, por ayudarme y estar pendiente de mi labor en esta investigación.

A Maíz e Ivan que mas que mis mejores amigos, son como unos hermanos a pesar de la distancia. Gracias por estar conmigo, por soportar mi estrés característico y por compartir tantos y tan buenos momentos que espero perduren por la eternidad.

A Edgar por ser mucho más que un amigo y un confidente, gracias por subir a bordo conmigo en esta locura y por darme las fuerzas que he necesitado a pesar de todo, por subir al laboratorio en días de descanso y mucho mas. Te Amo

Gracias a Ana, Jeis y Judith por estar pendiente de mi en esta etapa final, por ser unas grandes amigas y por ayudarme en lo que he necesitado en estos últimos días de desesperación.

A mis Amigos y compinches Teso (por ser tan dulce y cariñosa), Walfri (Alfredo), Dane (por ser un personaje único que creo en mi mayor seguridad), Jose Miguel (por ser un amigo incondicional), Dani (por acompañarme en momentos difíciles), Frank (por hacerme reír y dejar el gimnasio por ir a comer siempre jejeje), Felaco (por hacerme reír y dejarme los cambios son para mejorar), Gloria (a mi amiga química por ser comprensiva, y única), Manto (por ser una amiga comprensiva en todo momento) . Que les puedo decir son todos personas maravillosas y únicas con las que he reído y llorado, son los mejores amigos que me he podido encontrar en esta vida llena de obstáculos, pero que al irlos conociendo he podido entender que esta es maravillosa, espero que dicha amistad continúe por siempre!!!!.

A mi grupo dominocero Olga, Denis, Wilmer y Jacklin por brindarme su amistad y apoyo, además de todos esos ratos de liberar estrés con el dominó que ya está haciendo falta jaja y a todos las demás personas que no nombré pero que influyeron en mi vida y carrera, como los de la Voz de Ciencias y a mi grupo de trabajo de protocolo. Gracias TODOS!!!!

FINANCIAMIENTO:

Este trabajo fue financiado por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT G-20000001538), coordinado por Maria Soledad Tapia del Laboratorio de Nuevas Tecnologías del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, y por los proyectos del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), PI-03-33-5417-2004 y PG-03-33-5416-2004, coordinado por Guillermina Alonso, del Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental, ambos Institutos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

INDICE GENERAL.

RESUMEN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
FINANCIAMIENTO.....	vi
INDICE GENERAL.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABLAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Alimentos funcionales.....	3
1.2 Probióticos.....	4
1.3 El yogurt como alimento probiótico.....	7
1.4 Cepas del género <i>Bifidobacterium</i> como potenciales probióticas en yogurt....	10
1.5 Características del género <i>Bifidobacterium</i> sp.....	11
1.5.1 Funciones de las Bifidobacterias.....	12
1.6 Identificación tradicional y molecular del género <i>Bifidobacterium</i>	16
1.6.1 Otras técnicas moleculares utilizadas para la identificación y genotipificación bacteriana	22
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1 Medios y suplementos para el crecimiento del género <i>Bifidobacterium</i>	24
2.2 Identificación del género <i>Bifidobacterium</i>	29
2.3 Estudios de identificación por PCR a organismos probióticos.....	31
3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	38
3.1 HIPOTESIS.....	39
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo General.....	39
4.2 Objetivos Específicos	39
5. PLAN DE TRABAJO.....	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41

6.1 Materiales.....	41
6.1.1 Material biológico.....	41
6.1.2 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento.....	41
6.1.3 Pruebas bioquímicas y fisiológicas utilizadas.....	42
6.1.3.1 Medio Gelatina Nutritivo.....	42
6.1.3.2 Caldo Rojo de Metilo y Voges- Proskauer (MRVP).....	42
6.1.3.3 Solución de antibióticos utilizados para los medios MRS y RCA.....	42
6.1.3.4 Solución de HCl-cisteína.....	43
6.2 Métodos.....	43
6.2.1 Diluciones seriadas para la siembra de las muestras.....	43
6.2.2 Siembra por profundidad en placas.....	43
6.2.3 Siembra por profundidad en tubos caras planas o Miller-priket.....	44
6.2.4 Aislamiento de las colonias seleccionadas.....	44
6.2.5 Formación de atmósfera anaerobia.....	44
6.2.6 Identificación de las cepas por métodos convencionales.....	45
6.2.6.1 Prueba de la Catalasa.....	45
6.2.6.2 Producción de indol.....	46
6.2.6.3 Prueba de la gelatina.....	46
6.2.6.4 Motilidad.....	46
6.2.6.5 Prueba rojo metilo y Voges-Proskauer.....	47
6.2.6.6 Tinción Gram.....	47
6.2.6.7 Reducción del Nitrato.....	48
6.2.6.8 Fermentación de azúcares.....	48
6.2.6.9 Producción de ácido y gas a partir de glucosa.....	49
6.2.6.10 Prueba de Formación de Esporas.....	49
6.2.7 Aplicación de técnicas automatizadas (galerías Api para anaerobios).....	49
6.2.7.1 Identificación de las cepas del género <i>Bifidobacterium</i> por métodos automatizados.....	50
6.2.8 Comparación de dos medios de cultivos reportados selectivos para el género <i>Bifidobacterium</i>.....	50

6.2.8.1	Enumeración de cepas del género <i>Bifidobacterium</i> aisladas de productos tipo yogurt.....	50
6.2.9	Aislamiento del ADN genómico.....	51
6.2.9.1	Método de Levesqué y colaboradores.....	51
6.2.9.2	Método Gomez y colaboradores.....	51
6.2.10	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	52
6.2.11	PCR-16S.....	52
6.2.12	Eric-PCR (Secuencias <i>Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias</i>) y REP-PCR (<i>secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas</i>).....	54
6.2.13	Electroforesis en geles de agarosa.....	56
7.	RESULTADOS.....	57
7.1	Aislamiento de muestras.....	57
7.2	Pruebas convencionales para la identificación microbiológica de las cepas aisladas.....	58
7.3	Identificación de las cepas de estudio mediante el uso de galería automatizada.....	65
7.4	Comparación del crecimiento en los medios MRS y RCA	66
7.5	Aislamiento de ADN genómico.....	69
7.6	Evaluación de la cantidad y calidad del ADN mediante el uso de PCR-16S.....	71
7.7	Amplificación de las secuencias repetidas ERIC y REP en las cepas de Bifidobacterias aisladas de productos lácteos tipo yogurt.....	74
7.7.1	ERIC-PCR.....	74
7.7.2	REP-PCR.....	80
8.	DISCUSION DE RESULTADOS.....	83
9.	CONCLUSIONES.....	100
10.	RECOMENDACIONES.....	101
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	102
11.1	Consultas en línea.....	113

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Morfología celular de <i>Bifidobacterium</i> sp.....	3
Figura 2: Influencia de las bacterias prebióticas en la salud.....	6
Figura 3: Cambios de la microflora del intestino durante los primeros 7 días después del nacimiento.....	11
Figura 4: Suplemento dietético en capsula con bifidobacterias	14
Figura 5: Ejemplote un alimento con Bifidos, yogurt Danone.....	14
Figura 6: Ejemplo de una formula infantil con Bifidobacterias de Nestle.....	15
Figura 7: Pasos básicos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	17
Figura 8: Pasos para la realización de una REP-PCR.....	21
Figura 9: Esquema de Electroforesis en campo pulsado (PFGE).....	22
Figura 10: Producto de PCR obtenido con el uso de los iniciadores ADO-DEM en cultivos puros de las cepas <i>B. adolescentis</i> DSM20083 ^T y <i>B. dentium</i> DSM 20084 ^T	36
Figura 11: Esquema de trabajo para el estudio de cepas de bifidobacterias aisladas del yogurt.....	40
Figura 12: Esquema seguido para las realización de diluciones seriadas de las muestras investigadas para el aislamiento de bifidobacterias	43
Figura 13: Jarras Gas Pack y materiales utilizados para la incubación anaeróbica en la investigación de bifidobacterias en productos lácteos tipo yogurt.....	45
Figura 14: Aspecto de las colonias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt: Bio (A) y Yogurtin (B) en el medio MRS.....	58
Figura 15: Apariencia al microscopio óptico de células aisladas de yogurt “Bio” después de haber realizado la tinción Gram.....	59
Figura 16: Apariencia al microscopio óptico de células aisladas de yogurt “Yogurtin” después de haber realizado la tinción Gram.....	59
Figura 17: Porcentaje de cepas aisladas a partir de dos productos tipo yogurt con resultados positivos para el género <i>Bifidobacterium</i>	62
Figura 18: Porcentajes de pruebas positivas de fermentación de diferentes azúcares para bifidobacterias, aplicadas a cepas aisladas de productos tipo yogurt.....	64
Figura 19: Registro fotográfico de los resultados del Estuche de identificación para el control positivo <i>B. lactis</i> (A), para una de las muestras del yogurt “Yogurtin” (B) y para una de las muestras aisladas del yogurt “Bio” (C).....	65
Figura 20: Registro fotográfico de los resultados de las pruebas automatizadas Rapid ID 32 A indicando al genero <i>Bifidobacterium</i> como primera opción de identificación	66

Figura 21: Comparación del crecimiento de bifidobacterias presuntivas aisladas de yogurt “Bio”, en dos medios de cultivo (Man Rogosa Sharpe: MRS ó Reinforced Clostridium Agar: RCA), en placas o en tubos cara plana Miller-Pricket.....	68
Figura 22: Comparación del crecimiento de bifidobacterias presuntivas aisladas de yogurt “Yogurtin”, en dos medios de cultivo (Man Rogosa Sharpe: MRS ó Reinforced Clostridium Agar: RCA), en placas o en tubos cara plana Miller-Pricket.....	68
Figura 23: Registro fotográfico de la corrida electroforética de ADN de cepas de bifidobacterias utilizando dos metodologías de extracción.....	69
Figura 24: Registro fotográfico del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt	71
Figura 25: Registro fotográfico del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt	72
Figura 26: Registro fotográfico del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt	72
Figura 27: Registro fotográfico del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S en cepas de bifidobacterias usando la polimerasa <i>Pfu</i>	73
Figura 28: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR obtenido para cepas de bifidobacterias aisladas de productos comerciales, con el uso de los iniciadores ERIC ₁ y ERIC ₂ a una temperatura de hibridación de 38°C y 72°C de extensión. Carril 1: 1Kb DNA Ladder (invitrogen); Carril 2: 2Yog; Carril 3: 10Bio; Carril 4: <i>Pseudomona aeruginosa</i> .; Carril 5: <i>Acinetobacter baumannii</i> ; Carril 6: <i>Stenotrophomona maltophilia</i> ; Carril 7: <i>E.coli</i> J-62; Carril 8: Control negativo ...	74
Figura 29: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenido con el uso de los iniciadores ERIC ₁ y ERIC ₂ a una temperatura de hibridación de 38°C y 72°C de extensión y 3mM de MgCl ₂	75
Figura 30: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenido con el uso de los iniciadores ERIC ₁ y ERIC ₂ a una temperatura de hibridación de 38°C y 72°C de extensión y 3mM de MgCl ₂ con aislados de 7días de crecimiento. Carril 1: 1Kb DNA Ladder (invitrogen); Carril 2: 2Yog; Carril 3: 10Bio; Carril 4: <i>B. Lactis</i> CVCVM; Carril 5: <i>E.coli</i> J-62; Carril 6: Control negativo.....	76
Figura 31: Registro fotográfico de la corrida electroforética para la estandarización de la cantidad de ADN obtenido de cepas de bifidobacterias provenientes de productos lácteos, con el uso de los iniciadores ERIC ₁ y ERIC ₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y 72°C de extensión. Carril 1: 1Kb DNA Ladder (invitrogen); Carril 2: 10Bio con 1µl ; Carril 3: 10Bio con 0,5 µl; Carril 4: <i>E.coli</i> J-62 con 1µl; Carril 5: <i>E.coli</i> J-62 con 2µl; Carril 6: Control negativo.....	77

Figura 32: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenidos con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y diferentes temperaturas de extensión. **(A)** Temperatura de extensión a 65°C **Carril 1:** Control negativo; **Carril 2:** 8Yog ; **Carril 3:** 10Bio **Carril 4:** *E.coli* J-62; **Carril 5:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen). **(B)** Temperatura de extensión a 68°C. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen); **Carril 2:** 8Yog ; **Carril 3:** *E.coli* J-62; **Carril 4:** Control negativo78

Figura 33: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y 68°C de extensión, a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales.....79

Figura 34: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y 68°C de extensión, a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales79

Figura 35: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenidos con el uso del iniciador REP₁ a una temperatura de hibridación de 36°C y 68°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** *B. lactis* CVCM; **Carril 3:** 3Yog; **Carril 4:** *E.coli* J-62; **Carril 5:** Control negativo.80

Figura 36: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenidos con el uso del iniciador REP₁ a una temperatura de hibridación de 36°C y 65°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** 25Bio; **Carril 3:** *B. Lactis* CVCM; **Carril 4:** 3Yog; **Carril 5:** 6Bio; **Carril 6:** 11Yog ; **Carril 7:** 4Bio; **Carril 8:** 23Bio; **Carril 9:** 7Yog; **Carril 10:** 2Yog; **Carril 11:** 19Bio; **Carril 12:** 17Bio; **Carril 13:** 11Bio ; **Carril 14:** 20Bio; **Carril 15:** 16Bio; **Carril 16:** 2Bio; **Carril 17:** 5Bio; **Carril 18:** *E.coli* J-62; **Carril 19:** Control negativo.....81

Figura 37: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos para las cepas de bifidobacterias aisladas de productos comerciales tipo yogurt, con el uso del iniciador REP₁ a una temperatura de hibridación de 36°C y 65°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** 3Bio; **Carril 3:** 10Yog; **Carril 4:** 22Bio; **Carril 5:** 9Bio; **Carril 6:** 8Bio ; **Carril 7:** 10Bio; **Carril 8:** 9Yog; **Carril 9:** 27Bio; **Carril 10:** 4Yog; **Carril 11:** 26Bio; **Carril 12:** 1Yog; **Carril 13:** 15Bio ; **Carril 14:** 24Bio; **Carril 15:** 1Bio; **Carril 16:** 12Bio; **Carril 17:** 21Bio; **Carril 18:** 6Yog; **Carril 19:** 14Bio; **Carril 20:** 7Bio; **Carril 21:** 18Bio; **Carril 22:** 13Bio; **Carril 23:** 8Yog; **Carril 24:** 5Yog; **Carril 25:** *E.coli* J-62; **Carril 26:** Control negativo.....82

Figura 38: Análisis de los patrones de cepas *B. lactis* y *B. animalis* generados por ERIC-PCR.....97

Figura 39: Patrones de cepas de referencia de diferentes especies de Bifidobacterias generados por ERIC-PCR.....98

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Evidencias clínicas de los efectos beneficiosos de la administración de cepas del género <i>Bifidobacterium</i> frente a infecciones gastrointestinales en población infantil	7
Tabla 2: Comparación de la composición de la leche y del yogurt natural.....	8
Tabla 3: Características empleadas para diferenciar fenotípicamente especies y biotipos del género <i>Bifidobacterium sp.</i>	30
Tabla 4: Constituyentes de la solución de antibióticos de los medios selectivos para el género <i>Bifidobacterium</i>	42
Tabla 5: Características de los iniciadores para la amplificación del gen 16S ARNr.....	53
Tabla 6: Condiciones del programa para la PCR con el iniciador 16S ARNr.....	53
Tabla 7: Características de los iniciadores para la amplificación de las secuencias repetidas REP y ERIC.....	54
Tabla 8: Condiciones del programa para la PCR con los iniciadores ERIC 1 y ERIC 2.....	55
Tabla 9: Condiciones del programa para la PCR con el iniciador REP 1	55
Tabla 10: Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepas aisladas del yogurt “Bio”	60
Tabla 11: Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepas aisladas del yogurt “Yogurtin”.....	61
Tabla 12: Resultados de las pruebas de fermentación de azúcares de colonias aisladas de yogurt “Bio”.....	63
Tabla 13: Resultados de las pruebas de fermentación de azúcares de colonias aisladas de yogurt “Yogurtin”.....	64
Tabla 14: Títulos bacterianos de cepas de bifidobacterias obtenidos en cada medio utilizado y con dos metodologías de siembra.....	67
Tabla 15: Medición espectrofotométrica de la concentración de ADN de cepas aisladas de dos marcas comerciales de productos tipo yogurt (Bio y Yogurtin), identificadas microbiológicamente como pertenecientes al género <i>Bifidobacterium</i> , extraído por el método de Gomes y col., (1999)	70
Tabla 16: Comparación de los tamaños aproximados de los diferentes patrones obtenidos con otros patrones reportados en estudios de identificación molecular de bifidobacterias usando las secuencias ERIC.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS.

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARA.: Arabinosa.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal.

C: Citosina.

CVCM: Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos.

DUL: Dulcitol

ERIC: Secuencias Consenso Repetitivas de Enterobacterias.

EDTA: Ácido Etilendiamino Tetracético.

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura

g : gramos

G: Guanina

GLU: Glucosa

LAC.: Lactosa

M: Concentración molar.

MAL.: Maltosa

MANI.: Manitol.

MANO.: Manosa.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio.

ml: Mililitros.

MRS: Agar Man Rogosa Sharpe

M.P.P.S: Ministerio del Poder Popular para la Salud

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

PFGE: Electroforesis en campo pulsado (*Pulse Field Electrophoresis*).

RCA: Agar reforzado para clostridium (*Agar Reinforced Clostridium*).

RAF.: Rafinosa.

RAM: Ramnosa

REP: Repetidos Extragénicos Palindrómicos (*Repetitive Extragenic Palindromic*).

RIB.: Ribosa.

SAC.: Sacarosa.

SOR.: Sorbitol

Taq: *Thermophilus aquaticus*.

TBE: Buffer Tris Borato EDTA.

Th: Temperatura de hibridación.

V: Voltios.

XYL.: Xilosa

μL: micro Litro.

μM: micro Molar.

°C: grados centígrados

1 INTRODUCCIÓN:

Las bacterias son microorganismos unicelulares que carecen de membrana nuclear. Estos organismos procariotas, aunque parecen ser sencillos, resultan ser altamente complejos y adaptables a diversos ambientes. Aunque se les conoce como causa principal de enfermedades en humanos y animales, estos organismos microscópicos también forman parte importante para el balance de la naturaleza. Pueden encontrarse en todos los ambientes. En la naturaleza pueden estar en suelos, en el agua y en el aire, además pueden formar parte de la maquinaria de descomposición y recirculación de nutrientes, simbioses de plantas, y en el cuerpo de humanos y animales, ayudando a la digestión, producción de vitaminas, etc. Todos estos procesos biológicos son tan diversos como ellos mismos (Baron, 1996)

La microflora intestinal posee diversas funciones, una de ellas es ejercer un efecto protector en el hospedero contra la colonización del tracto intestinal por microorganismos patógenos. El balance y la composición normal de dicha microflora pueden ser afectados por diversas enfermedades, el uso de antibióticos, la alimentación y otros. La flora dominante representa entre 10^7 - 10^{11} células por gramo de tejido intestinal (Mejía, 2001; Barreda, 2005; Moreno, 2006).

Estos microorganismos pertenecientes a la flora intestinal se encuentran en diferentes lugares del intestino. Algunas están presentes en la luz intestinal y normalmente son expulsados con facilidad, mientras que otros se adhieren al epitelio intestinal y en consecuencia pueden colonizarlo. No se conocen con precisión los diferentes tipos de microorganismos presentes en la microflora intestinal, y se estiman que se encuentran en una cantidad de, por lo menos, cuatrocientas especies diferentes, que desarrollan el

ecosistema y mantienen un equilibrio dinámico, además de contribuir con las funciones digestivas del colon humano.

Una contribución que realiza la microflora al proceso digestivo en el colon es, por ejemplo, la formación de ácidos grasos de cadena corta o volátiles como el acetato, propionato y butirato, los cuales ejercen diversas funciones en el organismo. El acetato es utilizado como fuente de energía para el músculo esquelético y otros tejidos, el propionato interviene en la formación de intermediarios de rutas metabólicas, el succinil-CoA que actúa en el ciclo de Krebs, además ha sido asociado a la disminución del colesterol y los triglicéridos en el hígado, y por último el butirato sirve como combustible para los colonocitos, adicionalmente ha sido relacionado con diversas propiedades anticancerígenas (Laurentin, 2005). Además estos microorganismos permiten la digestibilidad de la lactosa en personas que no poseen la capacidad de digerirla (Gimeno, 2004)

Las bifidobacterias fueron descubiertas entre 1899-1900 por el Dr. Henry Tissier, en el Instituto Pasteur de Francia; son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano (Charteries y col., 1998), constituyendo uno de los diversos géneros predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptoestreptococo*, *Lactobacillus*, *Eubacteria*, *Clostridium* y *Bacteroides* (Poupard y col., 1973; Medina-Gutiérrez, 2002).

Estos microorganismos son de morfología variada, presentan células en forma de bacilos cortos: ramificados en “y”, bifurcadas, aisladas o dispuestas en “v” (**Figura 1**), de allí que se denominan bifidobacterias por presentar forma bífida.



Figura 1: Morfología celular de *Bifidobacterium* sp.

Fuente: <http://neofronteras.com>.

1.1 Alimentos funcionales.

Un alimento funcional es cualquier alimento modificado u otro ingrediente, que proporciona beneficios para la salud, superiores a los que presenta el consumo de nutrientes (Martín-Hernández y Cámara, 2000). Recientemente se dice que un alimento es funcional si contiene un componente (que puede o no ser un nutriente), que afecta una, o un número limitado de funciones en el organismo en una forma dirigida, de manera que tenga un efecto positivo en la salud, o que tenga efectos fisiológicos o psicológicos, más allá de los efectos nutricionales tradicionales (Clydesdale, 1997; Roberfroid, 2000; Morin, 2007).

Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, y los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los antioxidantes. Los probióticos se consideran también ingredientes funcionales. En la actualidad, los alimentos funcionales forman parte de los conceptos novedales en alimentación. Sin embargo, algunos de ellos, como el yogurt, se vienen utilizando desde hace muchos años y sigue siendo un elemento muy habitual de la dieta, ya que posee muchas propiedades nutricionales (Gimeno, 2004)

1.2 Probióticos.

La definición más aceptada de probióticos es: “Suplementos alimenticios conformados por microorganismos vivos que, una vez ingeridos, influyen beneficiosamente en la salud del consumidor al mejorar su “equilibrio microbiano intestinal” (Shah, 2000; FAO, 2001). Entre los géneros corrientemente utilizados con este fin figuran *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Sanz y Morillo, 2000).

En pocos años, los alimentos probióticos han evolucionado desde productos pioneros con cepas de *Lactobacillus acidophilus* hasta la gran variedad que existe actualmente, con varios tipos de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* e incluso hongos y levaduras como *Aspergillus oryzae* y *Candida pintolepsi* (Amores y col., 2004)

Entre los principales criterios empleados, al momento de la selección de cepas para la elaboración de alimentos probióticos se encuentran: el que no sea patógena, poseer tolerancia a concentraciones significativas de bilis ácidas y a la actividad gástrica, debe ser un habitante normal del tracto gastrointestinal y tener la capacidad de sobrevivir a través del mismo, en una colonización transitoria. Además, debe tener la propiedad de adherencia a las células epiteliales del colon; provocando exclusión competitiva contra bacterias patógenas por la adhesión a las mismos receptores de dichas células (antagonismo contra patógenos) y por último una buena potencialidad tecnológica (Gibson y Fuller, 2000).

Otros autores indican que deben tener la capacidad de producir sustancias antimicrobianas; inhibiendo patógenos mediante la producción de ácidos orgánicos, ácidos grasos volátiles, así como bacteriocinas, este último generalmente es producido por *Lactobacillus* (Ko y col., 1999).

Es importante mencionar que existen diferentes grupos de productos probióticos, los cuales se clasifican como probióticos naturales, que corresponden principalmente a los productos lácteos fermentados (yogurt, leche, quesos, etc.), los probióticos comercializados, que no son más que productos naturales comercializados que pueden contener diferentes cepas en forma más concentrada, y por último los suplementos alimenticios, donde la única diferencia está en que la cepa se encuentra encapsulada en una concentración específica para ejercer un efecto terapéutico (Contardo y col., 2005).

Los beneficios que ofrecen los probióticos se pueden categorizar en nutricionales y terapéuticos. Dentro de los nutricionales se encuentran aquellos cuyo papel es aumentar la biodisponibilidad de calcio, zinc, hierro, manganeso, cobre y fósforo; mientras que a nivel terapéutico, están relacionados con tratamientos de desórdenes intestinales, hipercolesterolemia, supresión de enzimas pro-carcinogénicas e inmunomodulación, entre otros (**Figura 2**) (Iñiguez y Acedo, 2006; Taranto y col., 2005).

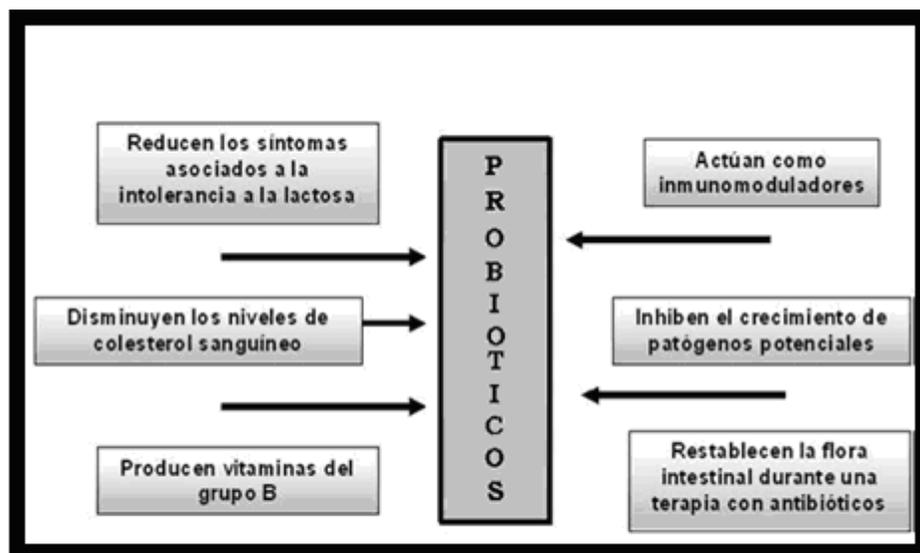


Figura 2: Influencia de las bacterias probióticas en la salud. Fuente: Taranto y col., 2005.

Al género *Bifidobacterium* se le atribuye una importante función en el mantenimiento del equilibrio del ecosistema intestinal y el desplazamiento de microorganismos patógenos. Las cepas de este género constituyen el grupo predominante de la microbiota fecal de niños alimentados con leche materna y unos de los microorganismos probióticos más importantes. El conocimiento de la contribución de este grupo bacteriano a la función de barrera intestinal, a través de las interacciones con el huésped es todavía muy limitado (Sanz y col., 2006). A nivel internacional existen diversos estudios que demuestran los efectos terapéuticos de estas cepas prebióticas, algunos ejemplos de estos son mostrados de forma resumida en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Evidencias clínicas de los efectos beneficiosos de la administración de cepas del género *Bifidobacterium* frente a infecciones gastrointestinales en población infantil.

Condición	Efecto	Cepa probiótica	Vehículo	Referencia
Diarrea por rotavirus	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Reducción de la incidencia y de la excreción en heces. ✓ Aumento de la síntesis de IgA 	<i>B. lactis</i> <i>B. breve</i> <i>B. bifidum</i>	Leche generalmente	Saavedra y Bauman, 1994 Araki y col., 1999 Phuapradit y col., 1999
Diarrea infecciosa aguda	Reducción de la frecuencia, incidencia y duración.	<i>B. infantis</i> <i>B. lactis</i>	Cápsulas y leche	Lee y col., 2001 Chouraki y col., 2004
Colonización tras tratamiento con antibióticos	Mejora la velocidad de colonización.	<i>B. Lactis</i> <i>B. bifidum</i>	Fórmulas infantiles	Black y col, 1991 Correa y col., 2005
Diarrea asociada al consumo de antibióticos	Reducción de la incidencia y duración.	<i>B. Lactis</i>	Fórmulas infantiles	Correa y col., 2005

1.3 El yogurt como alimento probiótico

El yogurt y otros derivados lácteos, constituyen alimentos básicos en la dieta de muchas poblaciones, tanto por sus características organolépticas como por sus propiedades nutricionales. La composición química de la leche le confiere un valor alto en la dieta del hombre (**Tabla 2**), pero al mismo tiempo se convierte en un medio excelente para el crecimiento descontrolado de una gran cantidad de microorganismos, incluyendo desde los benéficos hasta los patógenos, tales como: indicadores, fermentadores, probióticos, proteolíticos, productores de toxinas, productores de bacteriocinas, entre otros (Doyle, 2001). La Tabla 2 presenta la composición química de la leche y del yogurt natural.

Tabla 2: Comparación de la composición de la leche y del yogurt natural. Tomado de Deeth y Tamime, 1981.

Constituyentes por cada 100gr de alimento	Leche	Yogurt natural
Valor Energético (kJ)	150.00	220.00
Constituyentes principales :		
Proteínas	3.50	5.00
Grasas	0.10	1.00
Lactosa	5.00	5.00
Galactosa	c.00	1.50
Acido Láctico	c.00	1.00
Potasio	0.15	0.24
Calcio	0.12	0.18
Fósforo	0.10	0.14
Sodio	0.05	0.08
Constituyentes secundarios :		
Ácido Hipúrico	2.00	c.00
Ácido Fumárico	1.00	8.00
Ácido Succínico	c.00	19.00
Ácido Benzoico	0.50	7.00
Colesterol	2.00	7.00
Urea	0.40	0.02
Glucosa	c.00	30.00

El yogurt siempre ha tenido una imagen de alimento saludable, por lo que se le considera como un alimento funcional por excelencia, pero además como el vehículo ideal para la adición de probióticos y prebióticos (Hernández, 2006).

El yogurt natural contiene 144 calorías, alrededor del 5% del total de las requeridas por los adultos. Los yogures de frutas con preservativos o saborizantes y azúcar pueden llegar a duplicar el contenido calórico sin necesidad de agregar ningún otro nutriente. Este alimento a su vez contiene una alta concentración de calcio, el cual es un compuesto importante para el ser humano; el contenido de calcio en el yogurt supera al presente en la carne, pescado y cerdo inclusive es mayor al presente en la leche (Helferich y Westhoff, 1980).

El yogurt es un gel de apariencia viscosa, resultante de la acidificación microbiana de la leche. Los microorganismos que intervienen en esa fermentación ácido láctica incluyen a las bacterias pertenecientes al género de los *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. y *Bifidobacterium* sp. Los cocos son los responsables de la producción de ácido, y los bacilos aportan el sabor y el aroma debido a la producción de acetaldehído (Salvatierra y col., 2004).

Según la norma COVENIN 2393, el yogurt es el producto coagulado obtenido por fermentación láctica de la leche, o mezcla de ésta con derivados lácteos, mediante la acción de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrukii subsp bulgaricus* y *Streptococcus salivarius Subs. thermophilus*, pudiendo estar acompañadas con otras bacterias ácido lácticas, que por su actividad le confieren las características al producto terminado. Estas bacterias deben ser viables y activas desde su inicio y durante toda la vida útil del producto terminado (alrededor de 21 días a 5°C).

Los trabajos que destacaron la relevancia del yogurt y su asociación con la salud surgieron en Europa, a partir de los estudios de Metchnikoff y su teoría de la longevidad de los pueblos balcánicos, asociada al alto consumo de productos fermentados de leche.

Actualmente, diversos investigadores han estudiado los microorganismos utilizados en la producción de leche fermentada y productos afines y sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo humano y animal (Salvatierra y col., 2004).

El yogurt se ha considerado tradicionalmente como un alimento saludable debido a su contenido bacteriano, pero existen pocos estudios científicos acerca de sus efectos, particularmente en la gente sana. Estos efectos dependen de la capacidad de los organismos probióticos para sobrevivir y multiplicarse en el tracto gastrointestinal (Del Campo y col., 2003).

1.4 Cepas del género *Bifidobacterium* como potenciales probióticas en yogurt.

Los cultivos de bacterias como las bifidobacterias son cada vez mas frecuentes en productos fermentados, debido a sus características probióticas. Del total de las especies de bifidobacterias identificadas, sólo son ampliamente utilizadas en la elaboración industrial de productos lácteos las siguientes: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium longum*. Desde el punto de vista tecnológico se recomienda que las cepas a usar deban tener una tasa de crecimiento y una producción de ácido altas, además de una tasa baja de post acidificación durante el almacenamiento (Macfarlane y Cummings, 1999; Ward y Roy, 2005).

1.5 Características del género *Bifidobacterium* sp.

Las bifidobacterias son un grupo de bacterias que pertenecen a la familia *Actinomycetaceae*; son bacilos Gram-positivos, inmóviles, no esporulados, anaerobios estrictos, catalasa negativo, cuyos extremos, por lo general muestran protuberancias y pueden o no tener una o más ramificaciones (Salminen y col., 1993).

Charteries y colaboradores (1997) indicaron que las bifidobacterias, además de ser comensales del intestino de animales, se encuentran distribuidas en varios nichos ecológicos en el tracto gastrointestinal y el genitourinario de humanos.

Estos investigadores señalaron además que, en los humanos, las Bifidobacterias son unos de los primeros microorganismos en establecerse como flora natural luego del nacimiento, ya que el intestino es estéril al momento de nacer, pero inmediatamente después del nacimiento comienza a ser colonizado por muchas bacterias, apareciendo las Bifidobacterias después de dos ó tres días, las cuales vienen a predominar rápidamente, tal y como se muestra en la **Figura 3**.

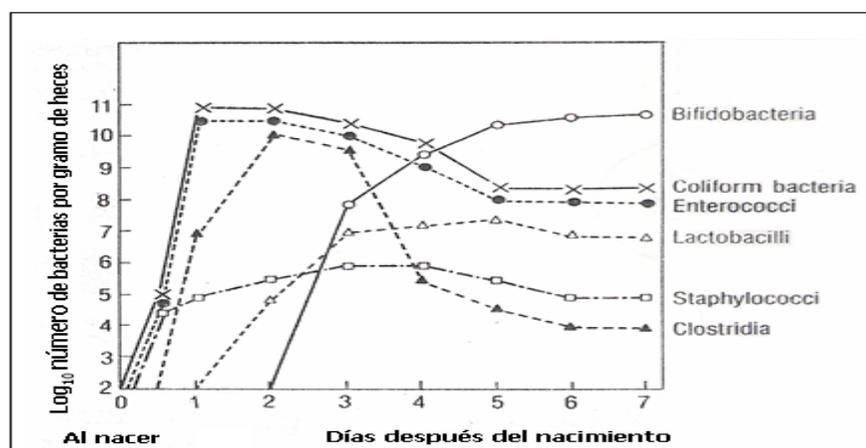


Figura 3. Cambios de la microflora del intestino durante los primeros 7 días después del nacimiento. Tomado y modificado de: Hoover, 1993.

Las bifidobacterias desempeñan un papel importante en el intestino, contribuyendo al control del pH, mediante la liberación de ácido acético y ácido láctico, producidos en cantidades relativamente altas, durante las fermentaciones de azúcares. Además, restringen el crecimiento de patógenos potenciales y bacterias putrefactivas como se esquematiza en la **(Figura 2)**. Hoover (1993) señaló que el ácido producido por las bifidobacterias afecta negativamente el crecimiento de enteropatógenos ácido-sensibles, como *Clostridium perfringens*.

Las bifidobacterias son considerados organismos anaeróbicos, aunque algunas especies tienen la capacidad de tolerar oxígeno. Generalmente, la toxicidad de este elemento resulta a partir de los efectos de diferentes componentes activos del mismo, tales como el superóxido, los radicales hidroxilos y el peróxido de hidrógeno. La tolerancia al oxígeno está relacionada con la utilización del mismo. En ausencia de carbohidratos exógenos, algunas cepas pueden utilizarlo durante el metabolismo de los sustratos intercelulares (Tamime y col., 1995).

1.5.1 Funciones de las bifidobacterias.

En 1971, Hill y colaboradores reportaron que la dominancia de las bifidobacterias en las paredes del colon promueve la competencia por el espacio y los nutrientes.

Tamime y colaboradores (1995) demostraron que las bifidobacterias pueden desconjugar o hidrolizar enlaces de las sales biliares en sus formas libres, con una mayor actividad biocida en contra de las bacterias extrañas. También los ácidos grasos volátiles secretados por las bifidobacterias pueden actuar en la estimulación peristáltica. Esta actividad, junto con el control sobre la abundancia de la mucosa en la superficie intestinal, contribuye al funcionamiento saludable del intestino.

Algunas bacterias intestinales tienen la capacidad de sintetizar nitrosaminas (familia de compuestos potencialmente carcinogénicos), y la degradación de estos compuestos por las bifidobacterias, desempeña un papel importante en la reducción del riesgo de cáncer en el colon (Tamime y col., 1995).

En años recientes, se le ha dado una importancia considerable al empleo de las bifidobacterias para la elaboración de alimentos probióticos, particularmente en Japón y Europa. Entre los productos alimenticios que contienen bífidos se encuentran: la leche bifidus, empleada en infantes con deficiencia nutricional, como por ejemplo niños con intolerancia a la lactosa; Biogarde, productos de leche coagulada con bifidobacterias comercializado en Alemania; en el mercado del yogurt, las casas Yoplait y Dannon han introducido bifidobacterias en el mercado europeo, y diversos productos bifidus en Canadá, Italia, Polonia, Checoslovaquia, Inglaterra y Brasil (Sánchez, 2002). La casa comercial Dannon comercializa productos como el yogurt Activia descremado, el cual posee *Bifidus regularis* como cultivo prebiótico (Consultas en línea Activia, 2008).

En el mercado americano, las bacterias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* y especies de *Bifidobacterium*) se comercializan bajo dos formas diferentes: en alimentos y en suplementos dietéticos. Los productos alimenticios que contienen estas bacterias son por lo general productos lácteos, como leche fluida que contienen 0,6% de bacterias probióticas y yogurt, donde se utiliza aproximadamente 40% de las bacterias prebióticas

(Maguiña, 2001). Uno de los ejemplos del uso de Bifidobacterias como suplementos dietéticos y alimentos se pueden observar en las **Figuras 4,5,6**.



Supplement Facts		
Serving Size: 2 Capsules		
	Amount Per Serving	% Daily Value
Vitamin K	6.8 mcg	8.5 %
Proprietary Blend	470 mg	
Bifidobacterium bifidum		
Blue-Green Algae (<i>Aph. flos-aquae</i>)	170 mg	

* Daily Value not established.

Figura 4: Suplemento dietético en cápsulas que contiene Bifidobacterias. Tomado de: www.sbgalgae.com



Figura 5: Ejemplo de un alimento con Bifidos, Yogurt de Danone. Tomado de:

<http://www.yoguractivia.com.ar/>

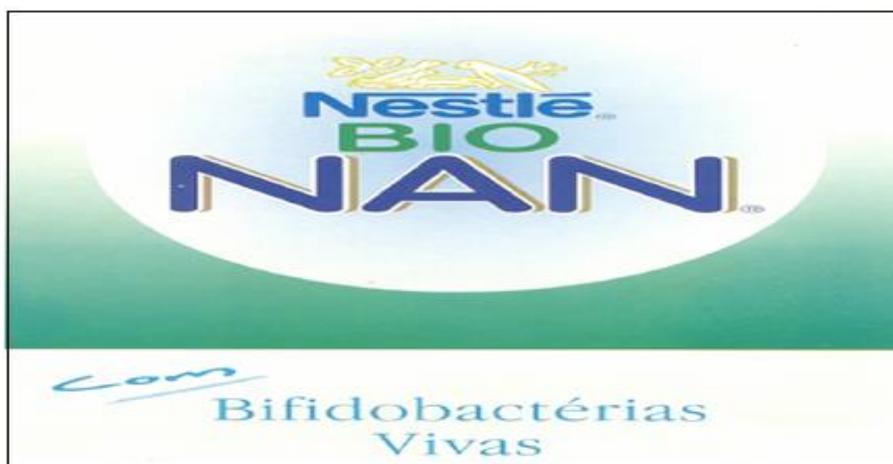


Figura 6: Ejemplo de una formula infantil con Bifidobacterias de Nestle.

Tomado de: [www. pt.livra.com](http://www.pt.livra.com)

En Venezuela, existe una escasa oferta de productos probióticos, entre los que se encuentran los productos lácteos, los clásicos yogures, y últimamente los denominados bebidas “Bio”, que las comercializan como bebidas prebióticas, y a los cuales no se le a identificado el género y especie de las cepas que contienen. Por esta razón en el país se están desarrollando diversas estrategias para la obtención de alimentos naturales que posean dentro de su composición microorganismos probióticos como las bifidobacterias. Este es el caso del estudio realizado por Tapia y colaboradores en el 2007, en el cual incorporaron este tipo de microorganismos en películas comestibles, como una cubierta de frutos frescos cortados, con la finalidad de ofrecerle al consumidor una alternativa de consumo de alimentos naturales y saludables como las frutas, que a su vez están reforzadas con la incorporación de estos microorganismos para la elaboración de un alimento funcional y natural.

1.6 Identificación tradicional y molecular del género *Bifidobacterium*

Cuando Tissier aisló por primera las bifidobacterias, a partir de heces de lactantes, las denominó *Bacillus bifidus*, basado en la morfología que estos microorganismos presentaban. También han sido aisladas del intestino, de la vagina y de la boca de humanos adultos, al igual que de tracto intestinal de varios animales como vacas, ovejas, pollos, ratones y conejos. Además diversos investigadores confirman que su clasificación es realizada basándose en sus criterios fisiológicos y metabólicos, de la presencia de enzimas características para el género y de los requerimientos nutricionales durante su metabolismo (Mitsuka y Kaneuchi, 1977).

En 1967, De Veries y Stouthamer (Citados en Shah, 1997) descubrieron la presencia de la enzima fructosa-6-fosfato-cetolasa (F6PPK) en las bifidobacterias y la ausencia de dos enzimas: aldolasa y la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, las cuales están presentes en bacterias del género *Lactobacillus* (Bezkorovainy y Millar-Cathpole, 1989).

La presencia de otras dos enzimas de importancia fisiológica, la α -galactosidasa, que hidroliza los disacáridos y los trisacáridos que contienen residuos de galactosa, como la rafinosa y la estaquinosa; y la α -glusidasa que se encuentran en las bifidobacterias y podrían ser utilizadas como un método rápido para su identificación y diferenciación, a pesar de su costo (Chevalier y col., 1990)

La identificación de las bifidobacterias basada en sus características fenotípicas no siempre proporciona resultados claros y fiables, puesto que las células pueden cambiar su morfología dependiendo de los aislados, de las condiciones y de los medios de crecimiento,

por lo que se deben implementar diversas técnicas moleculares para su mejor identificación (Mayer y col., 2007).

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, es un método *in vitro* de síntesis de ADN, en el que un segmento particular es especialmente amplificado al ser delimitado por un par de iniciadores específicos que lo flanquean. Estas copias del fragmento de interés son copiadas de forma exponencial, obteniéndose así millones de copias a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación, en presencia de una enzima polimerasa de ADN termoestable, tal y como se demuestra en la **Figura 7** (Mas y col., 2001; Rodríguez y Barrera, 2004).

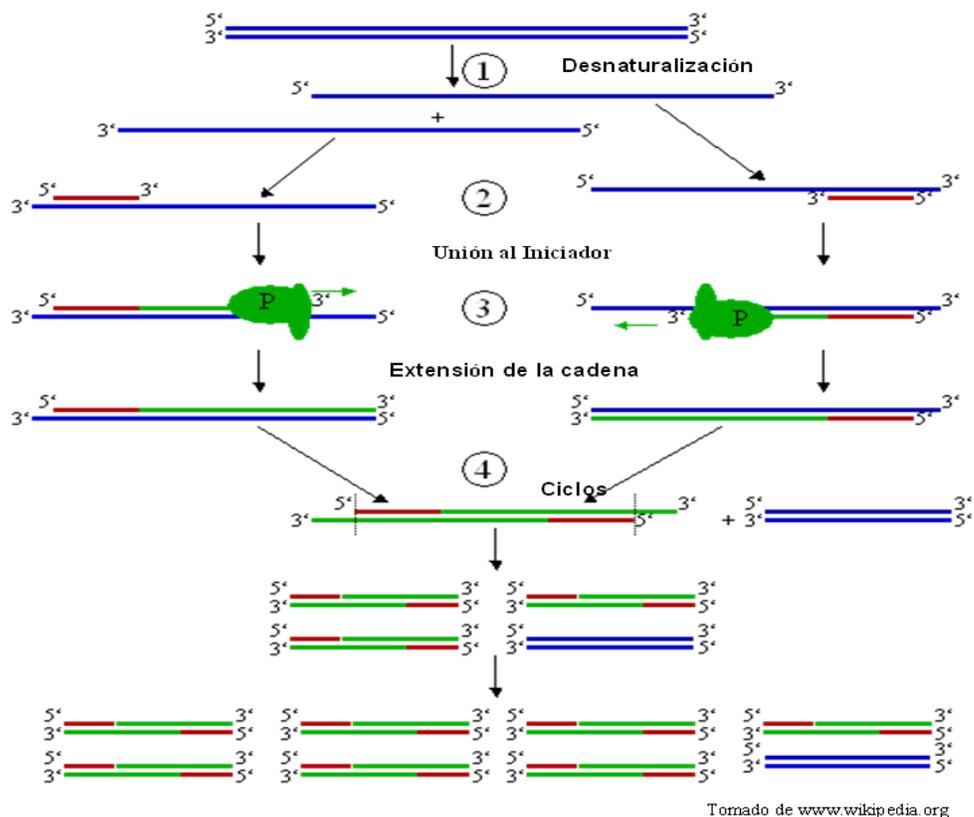


Figura 7: Pasos básicos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Tomado y modificado de: Luque y Herráez, 2001.

La PCR en tiempo real es una técnica efectiva para la detección y cuantificación de microorganismos en el cual, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior. Utiliza la detección por fluorescencia, y se puede medir durante el desarrollo de la reacción la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación (Costa, 2004). Esta técnica se ha utilizado para la detección y enumeración de bifidobacterias en muestras de heces, por lo que en un futuro dicha técnica puede ser una herramienta muy popular para la detección, identificación y cuantificación de Bifidobacterias (Ward y col., 2005).

Diversos estudios utilizando métodos moleculares han sido aplicados para el estudio de especies de *Bifidobacterium* spp. en heces humanas. Se ha sugerido que los estudios de PCR basados en secuencias conservadas del ARN ribosomal, sería una de las opciones para obtener resultados confiables de este tipo de microorganismo. También se han utilizado otros métodos para la identificación de las bifidobacterias, como lo son los estudios del gen *hsp60*, identificando este género por PCR utilizando pares de iniciadores específicos, y cuya sensibilidad fue medida con 127 especies (Delcenserie y col., 2005).

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas moleculares para genotipificación, basadas en la PCR, que han supuesto un avance importante en el estudio e identificación de diversos microorganismos. Estas técnicas son muy útiles como método de tipificación, y para estudiar la relación clonal entre aislados de una misma especie.

La elección de la técnica a utilizar depende de factores tales como rapidez, laboriosidad, facilidad de interpretación, poder de discriminación y reproducibilidad, y también factores de tipo económico (Fernández-Cuenca, 2004). Entre las técnicas moleculares de tipificación están las que utilizan secuencias repetitivas del genoma.

Las ubicaciones de las secuencias REP (secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas, del inglés *Repetitive Extragenic Palindromic*) y ERIC (secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias) son específicas para cada cepa bacteriana, y por ello el tamaño de los fragmentos amplificados en cada cepa será diferente. Los amplicones pueden ser visualizados a través de electroforesis en geles de agarosa. Los patrones de bandas resultantes pueden ser utilizados para comparar distintos organismos procariotas (Ross y col., 2005).

A nivel de especie bacteriana, existe la suficiente diversidad genética como para identificar, no solo a nivel de cepa, sino los diferentes clones. Los clones bacterianos se definen como los aislados genéticamente relacionados y que son indistinguibles entre sí mediante los métodos moleculares de tipificación, o bien aislados que son tan similares que posiblemente deriven de un ancestro común (Fernández-Cuenca, 2004).

Las técnicas de PCR para genotipificación están fundamentadas en la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas, y la separación electroforética de los productos de amplificación. Estas se pueden utilizar conjuntamente con otros métodos moleculares, como la restricción enzimática, la hibridación con sondas específicas o la secuenciación de ácidos nucleicos, que permiten trabajar con un número mayor de muestras y son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente.

Algunos de estos procedimientos tienen que ser validados en el laboratorio de investigación (estandarización de protocolos, equipos y reactivos), debido a que presentan una baja reproducibilidad, mientras que otras pueden requerir un software adecuado para analizar patrones de bandas de ADN, que son complejos y difíciles de interpretar visualmente. Otras dificultades que se pueden asociar a estas metodologías son los criterios utilizados para interpretar los patrones de bandas múltiples, y establecer comparaciones entre varios geles, aunque esto último puede resolverse con la utilización de programas informáticos que analizan automáticamente los patrones y los une en agrupaciones (*clusters*) (Fernández-Cuenca, 2004).

La REP PCR es una técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas, las secuencias REP, que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias y algunas bacterias Gram positivas y hongos (**Figura 8**). Con estos cebadores se amplifican las regiones que separan las secuencias REP, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición y posición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN, proporcionando una medida de la relación clonal entre diferentes cepas.

La técnica se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales); es bastante rápida (menos de 24 h) y posee un relativo bajo costo, una vez que se dispone de un termociclador. Los patrones de bandas suelen ser sencillos, aunque pueden existir excepciones (Fernández-Cuenca, 2004).

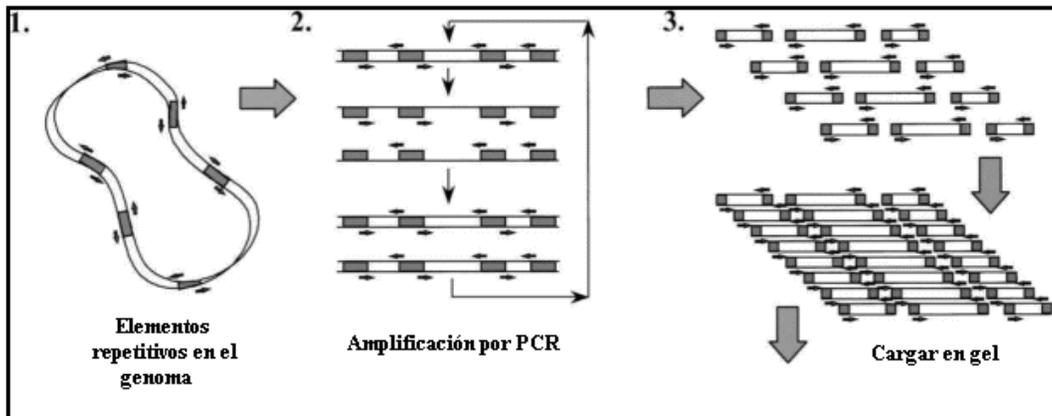


Figura 8: Pasos para la realización de una REP-PCR:(1) Los iniciadores anclan a los extremos de las secuencias repetidas, (2) la amplificación por PCR se da desde el extremo de una repetición a la siguiente. (3) Los fragmentos obtenidos luego de la PCR dependerán la ubicación y frecuencia de las repeticiones y se observan por su migración en geles de agarosa. Tomado y modificado de: http://www.pa.ipw.agrl.ethz.ch/courses/sem_dipl/current.html.

La amplificación de la secuencia ERIC mediante PCR es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias Gram negativas y positivas. (Tenover y col., 1995). Las secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias, ERIC, son elementos de 126 pb, que contienen un repetido invertido central conservado, localizado en regiones extragénicas. Al igual que en la técnica anterior, se utilizan cebadores que amplifican las regiones que separan las secuencias repetidas, permitiendo establecer relaciones clonales.

1.6.1 Otras técnicas moleculares utilizadas para la identificación y genotipificación bacteriana.

De todas las técnicas que se utilizan en la actualidad para serotipificar microorganismos, la electroforesis en campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), se considera el estándar de referencia en la tipificación de bacterias (**Figura 9**).

Esta técnica se basa en la digestión del ADN bacteriano con una enzima de restricción, y su posterior corrida electroforética en un gel, aplicando pulsos de campo eléctrico alternos y permitiendo la separación de fragmentos de ADN de gran tamaño (Olive y Ben, 1999).

La ventaja principal de esta metodología es que puede ser usada para la diferenciación entre la diversidad de especies de bifidobacterias porque tiene un poder discriminativo excelente (Ward y Roy., 2005), pero el tiempo necesario para obtener resultados puede requerir de dos o cuatro días, según el protocolo de trabajo a seguir. Otra desventaja es la posibilidad de variación en la interpretación de los datos, y la necesidad de un equipo especializado (Ross y col., 2005).

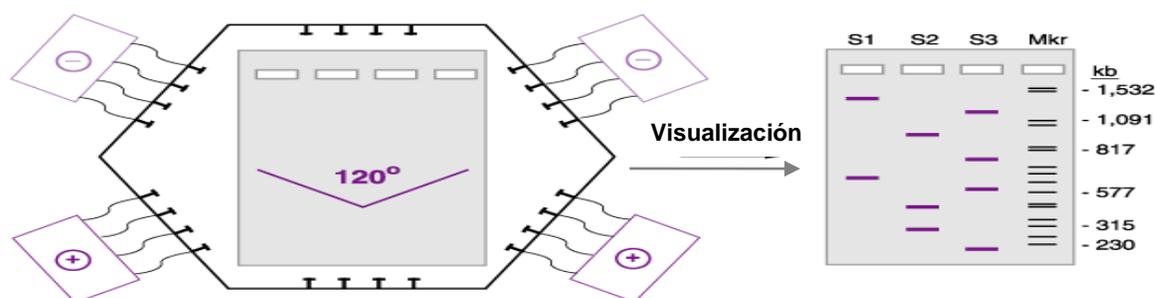


Figura 9: Esquema de electroforesis en campo pulsado (PFGE). Tomada y modificada de: <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture8/Lecture8.html>

Otra técnica es que permite la identificación de grupo y la tipificación de clones de microorganismos, y se basa en la detección y el análisis del gen que codifica el 16S del ARN ribosomal (gen 16S ARNr). Este gen está constituido por una región variable y una conservada para cada especie, por lo que su identificación mediante métodos moleculares, como polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (con sus siglas en inglés RFLP) y ensayos de hibridación, permite identificar a los estreptococos de acuerdo a su grupo.

La PCR ribotipia, es una variante que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar las regiones espaciadoras que separan los genes ribosomales 16S y 23S. Esta técnica es reproducible, aunque posee un poder de discriminación bajo, que puede incrementarse con la utilización de enzimas de restricción, pero que sigue siendo bajo comparado con la ERIC-PCR, la REP-PCR y la PFGE (Fernández-Cuenca, 2004).

Existen una variedad de técnicas, tanto microbiológicas como moleculares, que unidas pueden conformar un conjunto de herramientas prometedoras para la correcta identificación de este género, que conforma un grupo de microorganismos de difícil estudio, así como muchos otros de importancia para la microbiología tradicional (Vlková y col., 2002).

2. ANTECEDENTES:

2.1 Medios y suplementos para el crecimiento del género *Bifidobacterium*.

Lim y col. (1993), realizaron estudios de sensibilidad a una variedad de antibióticos utilizando el método de doble macrodiluciones en caldo, en los cuales se determinaron las dosis mínima inhibitoria para cada una de las 5 cepas de Bifidobacterias que se analizaron (*B. bifidum* ATCC 11863, *B. longum* ATCC 15707, *B. infantis* ATCC 15697, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, y *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527). Los autores demostraron que la estreptomicina y la gentamicina son poco activos en este microorganismo, en comparación con otros antibióticos aminoglicósidos y que la sensibilidad a la tetraciclina es muy variada. Los resultados obtenidos demuestran la resistencia de dicho género a antimicrobianos como kanamicina, neomicina, paramomycin, ácido nalidixico y sulfato de polimixina B, y los autores indican que dichos antibióticos, a los cuales se observó resistencia, son la clave para la preparación de los medios de cultivo selectivos para este grupo.

Calicchia y col. (1993), suministraron técnicas aplicables a la selección de una mezcla específica desecada de *B. bifidum* G9-1, *E. faecium* 129 BIO 3B y *L. acidophilus* Ks-13. Estos autores demostraron que empleando un medio de resuspensión conteniendo fosfato, HCl-Cisteína, Tween 80, agar y 10% de emulsión de silicona B, como agente antiespumante, a pH 7.0 ± 1.00 , era posible proveer las condiciones adecuadas para recuperar a estos microorganismos previo al plaqueo. Así mismo, emplearon como medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *B. bifidum* G9-1, el agar modificado VF-bouillon (extracto de hígado, carne magra de vacuno más L-cisteína) mediante la técnica de

difusión en triple capa con incubación anaerobia a 37°C por 48-72 horas; que ha sido un método usado en laboratorios, obteniéndose de manera satisfactoria un promedio de recuperación del 99% de cada microorganismo mencionado.

Los medios de cultivo para bifidobacterias se caracterizan por contener sustancias que disminuyen el potencial redox (por ejemplo cisteína, ácido ascórbico ó sulfito de sodio), antibióticos, una fuente de carbono, agentes selectivos que inhiben el crecimiento de bacterias ácido lácticas, y frecuentemente se fortifican con sangre de caballo o sangre de oveja. También se ha reportado que las condiciones de incubación son generalmente en anaerobiosis, con temperaturas que oscilan en un rango de 37 – 41 °C, por un tiempo mayor a 48 horas (Charteries y col, 1997).

Dinakar y Mistri en 1994, rehidrataron de un cultivo de *Bifidobacterium* sp en caldo MRS con 0,05% suplementado con L-cisteína, además de una solución de antibióticos (sulfato de neomicina, sulfato de paramomicina, ácido nalidíxico y cloruro de litio), para inocularlo en muestras de queso cheddar. Los recuentos en dicho medio fueron de $3,3 \cdot 10^6$ UFC/g y se incrementaron a $1,7 \cdot 10^7$ en 18 semanas, permaneciendo viable en el alimento a través del período de maduración durante 6 meses, a temperaturas entre 6 y 7°C. Estos resultados demostraron la capacidad de crecimiento de este microorganismo en estas condiciones.

Arany y col., (1995), aislaron especies de *Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus acidophilus* de muestras de agua y yogurt congelado, empleando la técnica de reparación-detección, combinada con el procedimiento anaeróbico del tubo plano, para detectar células dañadas y no dañadas.

Como medio de cultivo utilizaron el agar sorbitol-bifido humano de Mara y Oraguis modificado (MHBSA), con y sin agentes selectivos, con una incubación de 72 horas a 37°C. Estos autores recuperaron el 99,9% (3 ciclos logarítmicos), más de células de *Bifidobacterium sp* que la técnica de incorporación en placas, con el mismo medio de cultivo y las mismas condiciones mencionadas, pero colocadas en jarras de anaerobiosis (GasPack). Los autores indican que una posible explicación a este hecho es que las células que fueron colocadas en los tubos planos no se ven tan expuestas a condiciones aeróbicas, tal como el caso de las placas en los sistemas de jarras que debe pasar un tiempo mayor en alcanzar por completo el ambiente anaerobio.

Dave y Shah en el año 1996, evaluaron 15 medios de cultivo para la recuperación selectiva y recuento de *S. thermophilus*, *L. delbruckii sp*, *L. acidophilus* y *Bifidobacterium spp*. Los autores reportan que la recuperación de estas bacterias en agar RCA fue idéntica a la obtenida en MRS a pH 6,8, pero que la recuperación disminuía en el agar Reinforced Clostridium Agar RCA a pH 5,3.

En 1999, Payne y colaboradores evaluaron 6 medios selectivos (agar De Man Rogosa Sharpe modificado “MRS-m”; “RMS”, Agar Columbia modificado “m-Col”, agar Arroyo, Martin y Cotton “AMC”, agar neomicina, paramomicina, ácido nalidíxico, cloruro de litio “NPLN” y el agar cloruro de litio, propionato de sodio “LP”). Los resultados demostraron que MRS-m y el AMC fueron exitosos en la enumeración de especies de *Bifidobacterium*, obteniendo los mayores porcentajes de recuperación en comparación con los otros medios empleados, utilizando siembras por profundidad como por superficie.

Ingham en el mismo año de 1999, empleó el medio m-BIM (Bifidobacteria Iodoacetato modificado), el cual es una modificación del medio descrito por Muñoa y Pares en 1983, y lo comparó con el agar MRS- BCD (MRS más bilis, cisteína y dicloxacilina), el cual es empleado comercialmente para la enumeración de *Bifidobacterium sp.*

Ambos medios resultaron igualmente efectivos para la recuperación de *B. infantis* en productos nutricionales en polvo, almacenados a 22°C en latas selladas. Sin embargo, ambos fueron pobremente correlacionados para la enumeración de *B. lactis* ó *B. infantis* en productos almacenados en condiciones no óptimas. Según la experiencia del autor, tales condiciones se refieren al almacenamiento del producto por muchas semanas, en latas selladas a temperaturas mayores a 37°C o alrededor de 3 meses a 29°C.

Dichos autores también mencionaron que el medio m-BIM no se puede recomendar como único medio para la enumeración de bifidobacterias en productos nutricionales en polvo almacenados bajo condiciones altas de temperatura y/o humedad relativa. Sin embargo, para la enumeración de rutina en productos adecuadamente almacenados, que también contienen *L. acidophilus*, se encontró que dicho medio es preferible a MRS-BCD, debido a que las colonias de este género fueron fácilmente distinguibles de las de *L. acidophilus*.

Davinson y col. (2000), compararon la recuperación de bifidobacterias en yogurt fermentado congelado y almacenado por 11 semanas a 20°C, mediante 3 métodos: un sistema de reparación-detección en tubos aplanados y en placas con medio Glucosa- bifido-modificado (MBGA) y mediante placas con RCA-maltosa- galactosa (MGRCA).

Los autores concluyeron que el yogurt congelado puede servir como un excelente vehículo para la incorporación de bacterias probióticas. El almacenamiento del producto tuvo poco o ningún efecto en la supervivencia del cultivo, que permaneció en niveles suficientes para ofrecer los efectos terapéuticos sugeridos.

El método de tubo aplanado con el agar MBGA (Glucosa- bifido-modificado), combinado con la técnica de reparación –detección permitió la recuperación de un ciclo logarítmico mas, comparado con las recuperaciones empleando placas de petri. Los ingredientes del medio de cultivo quizás sean o no responsables de este efecto, pero el método de siembra por si mismo es una razón para realzar la recuperación, debido al constante ambiente anaerobio.

Kheadr y col. (2006), realizaron un estudio similar al de Lim y col. (1993), determinando la sensibilidad de distintas cepas de bifidobacterias (*B. animalis* ATCC 27536, *B. bifidum* R0071, *B. bifidum* ATCC 15696, *B. bifium* BB12, *B. breve* ATCC15700, *B. breve* R0070, *B. infantis* ATCC 15697, *B. longum* ATCC 15707, *B. longum* ATCC 15708, *B. longum* R0175, *B. longum* P/N 601377, *B. pseudolongum* ATCC 25562, *B. thermophilum* ATCC 25866) a diferentes antimicrobianos como ampicilina, penicilina, vancomicina, kanamicina, neomicina, paramomicina, streptomycin, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, entre otros, utilizando microdiluciones en caldo con los diversos antibióticos.

Estos autores encontraron que el género mostró una resistencia a kanamicina y vancomicina a una concentración de 500 µg /ml, además de ser resistentes a neomicina y

paramomicina a 250µg /ml. Igualmente diez de las trece cepas utilizadas eran ligeramente resistentes a streptomycin a 250µg /ml y mostraron diferentes niveles de sensibilidad al resto de los antibióticos analizados en su estudio, lo cual puede ser una base para la preparación de medios para la selección de este grupo bacteriano.

2.2 Identificación del género *Bifidobacterium*.

En 1959, Sundman y col., clasificaron a los organismos del género *Bifidobacterium* según las características morfológicas que presentaban, además de sus requerimientos fisiológicos y metabólicos. Anteriormente estas bacterias se consideraban de manera errónea, dentro del grupo de lactobacilos.

En 1968, de Vries y Stouthamer realizaron estudios de la capacidad de fermentación de distintos azúcares (lactosa, galactosa, manitol y xylosa), presente en 6 cepas de *Bifidobacterium bifidum*. Los autores demostraron la capacidad del microorganismo para utilizar los sustratos, siendo la glucosa fermentada en su totalidad, seguida por la lactosa, y también midieron los productos formados, encontrando acetato, lactato y alcohol etílico.

Este tipo de pruebas de fermentación de azúcares y producción de ácidos como el láctico y el acético, son las pruebas de diagnóstico mas importantes para la identificación de este género, mientras que las pruebas bioquímicas tales como la enzima catalasa, reducción de nitrato, formación de indol, licuefacción de la gelatina, junto con la fermentación de la ramnosa, dulcitol, glicerol y adonitol, resultan negativas para *Bifidobacterium sp.* Por esas razones muchos autores aplican estas pruebas con la fermentación de distintos azúcares para diferenciar las especies de bifidobacterias, tal como se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Características empleadas para diferenciar fenotípicamente especies y biotipos del género *Bifidobacterium sp.*

Especies y Biotipos	Azúcares									
	ARA	XYL	RIB	MANO.	SAC	MAL	LAC	RAF	MANI.	SOR
<i>B. bifidum a</i>	-	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-
<i>B. bifidum b</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. infantis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. breve</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. thermophilum</i>	-	-	-	-	+	+	V	+	-	-
<i>B. adolescentis a</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. adolescentis b</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. longum a</i>	+	+	+	(+)	+	+	+	+	-	-
<i>B. longum b</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Símbolos: Positivo (+); Negativo (-), Variable (v), débil positivo ((+)). Ara= Arabinosa; Xyl = Xilosa; Rib = Ribosa; Mano= Manosa; Sac= Sacarosa; Mal = Maltosa; Lac = Lactosa; Raf = Rafinosa; Mani= Manitol; Sor =Sorbitol. Tomado de Mitsuoka y Kaneuchi, 1977.

La morfología de las colonias del género *Bifidobacterium sp.* se caracterizan por ser convexas, de bordes enteros, circulares, de consistencia blanda y pueden ser de colores que van desde el crema hasta el blanco (Scardovi, 1986).

Medina-Gutiérrez (2002), aisló en Venezuela, especies de bifidobacterias a partir de heces de lactantes sanos de veinte días de nacidos, alimentados con leche materna, con la finalidad de obtener potenciales probióticos para el uso de la industria farmacéutica y alimentaria. A las colonias aisladas se le realizaron diferentes pruebas microbiológicas características a dicho género, como tinción Gram, gelatina, indol y fermentación de azúcares entre otros.

De un total de 400 colonias aisladas, sólo obtuvo dos que fueron supuestas como pertenecientes a este género, las cuales se sometieron a condiciones hostiles, simulando el paso por el sistema gastrointestinal, permitiendo así afirmar su condición como potenciales probióticas. Cabe destacar que es el único trabajo de identificación de cepas de bifidobacterias que ha sido reportado como realizado en el país.

2.3 Estudios de identificación por PCR a miembros del género *Bifidobacterium*.

La mayoría de los estudios moleculares realizados a las bacterias ácido lácticas, poseen como finalidad obtener métodos rápidos para la detección de estos microorganismos que poseen potencialidad probiótica, las cuales serán mas adelante utilizadas para la elaboración de alimentos funcionales (Malinen, 2002).

En el año 2001, Gevers y colaboradores, utilizaron REP-PCR para la identificación de especies de *Lactobacillus*, debido a la importancia que poseen este tipo de bacterias ácido lácticas en la industria de la elaboración de diferentes productos fermentados y suplementos alimenticios. Los autores concluyeron que dicha técnica es fácil de realizar y ofrece resultados confiables y reproducibles para la detección de este y otros tipos de bacterias ácido lácticas.

En el 2002 Ventura y Zink realizaron un estudio para una rápida identificación y diferenciación de bifidobacterias como *B. lactis* y *B. animalis*, las cuales son difíciles de identificar y diferenciar debido, a las homologías que poseen en cuanto a características fenotípicas y genotípicas. Estos investigadores utilizaron dos oligonucleótidos específicos para los genes que codifican para las secuencias 16S- 23S ITS del ARNr, y que fueron desarrollados para la identificación específica de *B. animalis*, utilizando PCR- Multiplex y electroforesis de campo pulsado. Con estos resultados, estos investigadores realizaron un análisis de secuencias de dichas regiones, demostrando, según los banco de datos, que *B. lactis* y *B. animalis* poseen un rango de similaridad del 93,4-97%, y que las diferencias que poseen se basan en la inserción de 8 nucleótidos encontrados entre los 318 y 338 pares de base de las secuencias ITS de *B. animalis*, que no están presentes en *B. lactis*. Los autores llegaron a la conclusión que dicha diferencia que presentan estas dos especies, utilizando técnicas moleculares con iniciadores específicos, es lo que permitirá la rápida diferenciación. Además con este estudio los investigadores propusieron una nueva clasificación taxonómica, y estas dos variantes del género *Bifidobacterium* deben ser separadas hasta el nivel de subespecie, debido a las grandes similitudes que poseen.

Masco y col. (2003), realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la utilización de diversos elementos repetitivos de ADN PCR (Rep-PCR), para la taxonomía y la discriminación entre especies descritas dentro del género *Bifidobacterium*, utilizando un conjunto de iniciadores (BOX, ERIC, (GTG5) y REP), orientados a identificar los elementos repetitivos de ADN.

Los autores reportan que el primero (BOXA1R), en las condiciones ensayadas por ellos, resultó ser la opción más óptima para la identificación taxonómica de 80 tipos del género *Bifidobacterium* y otras cepas de referencia. Posteriormente, el BOX-PCR fue probado para la identificación de 48 aislados desconocidos de bifidobacterias procedentes de muestras fecales de humanos y productos probióticos. En conclusión la técnica de rep-PCR fingerprinting, utilizando el primer BOXA1R, puede ser considerado como una herramienta fácil, rápida y reproducible, que ofrece altos rendimientos para la identificación de una amplia gama de bifidobacterias a nivel de especies, subespecies y posiblemente, hasta el nivel de cepas.

Ventura y col. (2003), realizaron estudios de identificación de especies de bifidobacterias utilizando las secuencias repetitivas intragénicas de enterobacterias (ERIC-PCR). Los autores concluyeron que, esta técnica, puede ser utilizada para la taxonomía y análisis de cultivos mixtos de bifidobacterias provenientes de productos alimenticios o de otros ambientes. Los autores analizaron 89 cepas de 26 especies, y sólo 53 pudieron identificarse y clasificarse hasta el nivel de especie. Las cepas pudieron clasificarse como 24 *B. breve*, 8 *B. lactis*, 13 *B. longum*, 2 *B. infantis*, 2 *B. pseudocatenulatum* y 4 *B. bifidum*.

Otro estudio realizado en el mismo año fue el de Venema y Maathuis, quienes utilizaron una de las variantes de la PCR para la identificación de cepas de bifidobacterias hasta el nivel de especie, con iniciadores específicos (Bif164 y Bif662) dirigidos para la identificación de secuencias de ARNr-16S. El producto de la reacción de PCR se obtuvo en un total de 12 especies del total de las cepas encontradas en el tracto gastrointestinal humano.

Los productos de PCR fueron tratados con diversas enzimas de restricción generando fragmentos que fueron usados para la correcta identificación de especies individuales de este género, los cuales fueron probados con otras cepas aisladas de heces de niños sanos mediante pruebas *in Vitro* (modelo del intestino grueso). Los autores demostraron que estas secuencias poseen un alto nivel discriminativo sobre la totalidad de estas especies.

Vitali y col. (2003), usaron PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de mezclas de *Bifidobacterium*, utilizando iniciadores específicos (Y116Sl e Y1ITSr para identificar a *B. infantis* Y1, Y816Sl Y8ITSr para *B. breve* Y8, Y10 Y1016Sl e Y10ITSr para *B. longum* Y10), diseñados para la identificación de estas cepas presentes en un producto probiótico farmacéutico (VSL-3) y además utilizados para la enumeración directa y para evaluar la cinética de estos microorganismos en el producto.

Estos análisis revelaron que *B. infantis* Y1 es la cepa predominante en el producto probiótico, y que su tasa de crecimiento fue la más alta. *B. infantis*, *B. breve* Y8 e Y10 *B. longum* son co-cultivadas durante la producción industrial, la cinética de las características de estas cepas pueden explicar las diferentes concentraciones en la preparación de probióticos. La validación del método de cuantificación de PCR fue realizada mediante la identificación de un número representativo de mezclas de cepas de la bacteria con estudios automatizados de ribotipificación. Los autores concluyeron que la metodología descrita representa una herramienta útil para la detección y cuantificación específica de cepas bacterianas y de las especies en mezclas complejas, como por ejemplo los preparados farmacéuticos, lácteos, muestras de heces y de biopsias.

La conclusión a la que llegaron con estos resultados es que esas 3 cepas tienen diferentes cinéticas de crecimiento en este producto farmacéutico (VSL-3); lo que hace posible optimizar en el proceso de producción, modificando el tamaño del inóculo y la inoculación de las tres cepas, con el fin de obtener un producto probiótico con las concentraciones equivalentes de cada cepa. La técnica rápida y sensible de PCR en tiempo real tiene un gran potencial para la caracterización de mezclas complejas de bacterias.

Se ha demostrado que la amplificación por PCR de los genes que codifican para el ADN ribosomal, junto con los análisis de restricción, posee un potencial elevado para la discriminación de varias bifidobacterias hasta el nivel de especie, originando la técnica conocida como ribotipificación. Bonjoch y colaboradores (2004), demostraron la presencia de bifidobacterias en aguas residuales, que presentaban contaminación fecal, tanto de origen humano como animal.

Estos investigadores utilizaron iniciadores específicos basados en la secuencia del ARN ribosomal 16S de dos especies pertenecientes a este género, *B. dentium* y *B. adolescentis* (**Figura 10**). Los autores concluyeron que esta técnica es un método nuevo que puede proveer información para la caracterización de las fuentes de contaminación fecal y discriminar si su origen es proveniente de humanos o animales.

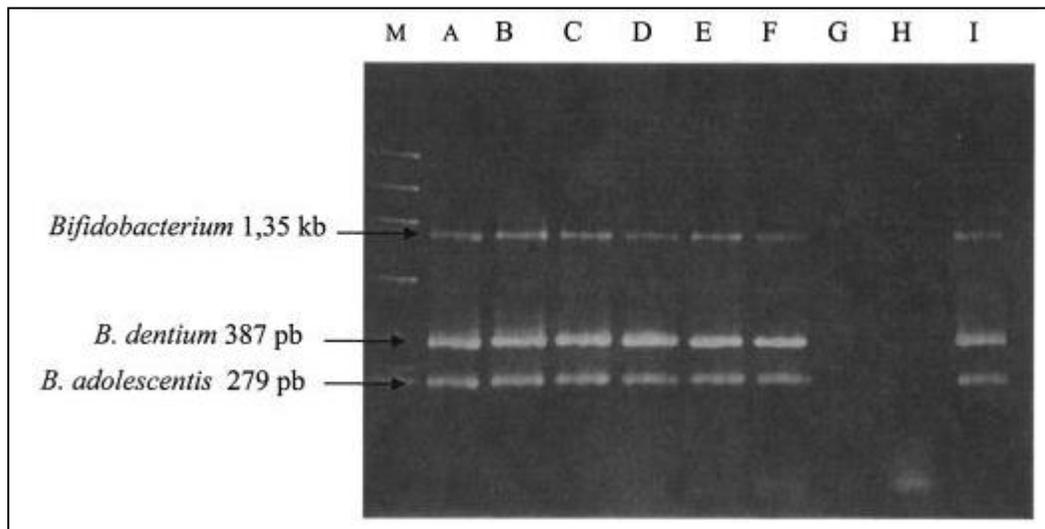


Figura 10: Producto de PCR obtenido con el uso de los iniciadores ADO-DEM en cultivos puros de las cepas *B. adolescentis* DSM20083^T y *B. dentium* DSM 20084^T. En el primer carril del gel (M), se encuentra el marcador de peso molecular y a la izquierda en los carriles de A-G se encuentran los tamaños correspondientes a las bandas de referencia en pares de bases de las distintas diluciones de estas cepas utilizadas 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 10^0 respectivamente, y los últimos dos carriles (H e I) representan los controles positivos y negativos respectivamente.

Debido a la amplia gama de técnicas moleculares aplicada a este grupo microbiano y su importancia, se han realizado además estudios de cuantificación. Delroisse y colaboradores en el 2006, cuantificaron cepas de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus spp.* en muestras de heces de rata usando PCR en tiempo real, usando iniciadores específicos para el género *Bifidobacterium* (F-bifido, R-bifido y MGB-bifido) y para el género *Lactobacillus* (F-lacto, R-lacto y MGB-lacto).

Los autores concluyeron que el ensayo es rápido y sensible para cuantificar gran variedad de cepas de bifidobacterias (30 especies) y *Lactobacillus* (15 especies), con una muy baja detección y cantidad de muestra (5104 bacterias por gramo de heces); por lo que sugieren que esta variante de la reacción en cadena de la polimerasa, usando iniciadores apropiados, es un enfoque ideal para la detección y cuantificación de bacterias que deben

contribuir a la realización de nuevos estudios de la composición y dinámica de la microflora intestinal.

Además de los estudios realizados para la identificación rápida y reproducible de bifidobacterias en productos comerciales, también se han aplicado métodos moleculares para su detección en el medio ambiente, como un indicador de contaminación fecal de origen ya sea animal o humano. Este último fue el estudio de King y col., en el 2007, utilizando PCR anidada con iniciadores específicos para la detección de *Bifidobacterium adolescentis* en los estuarios de Georgia. Estos investigadores tomaron muestras del afluente municipal del río Milledgeville (Planta municipal de tratamiento) por triplicado, a una profundidad de 0,5 metros en diferentes zonas, además muestrearon 8 estuarios en Georgia (Negro Banco Creek, Altamaha River, West Point-Fedrica río, Dunbar Creek, un afluente al río Little Satilla, dos afluentes del Río Jefe de la tortuga, y el río Little Satilla. Dunbar Creek). Los resultados demostraron la presencia de contaminación fecal humana en Dunbar en River, Banco Negro Creek, y en un pequeño afluente del Río Satilla. En los otros cinco lugares, incluidos los estuarios West Point-Federica Altamaha River y el río no fue detectada la presencia de *B. adolescentis*. Los autores concluyeron que el trabajo es un enfoque prometedor para la detección y rápida respuesta y mitigación de la contaminación fecal humana en entornos acuáticos de gran interés para el ser humano.

3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.

El empleo de cultivos probióticos en la industria de alimentos es considerado hoy en día un enfoque emergente, cuyo análisis y desarrollo están enmarcados en un contexto integral, en el cual, grupos multidisciplinarios se enfrenten al reto que significa suministrar a los consumidores productos de alta calidad, innovadores, nutritivos y seguros. La variedad de atributos benéficos para el ser humano que ofrecen este tipo de alimentos funcionales, como el yogurt, debido a la presencia de los cultivos probióticos, ameritan su estudio, mas aún, teniendo en cuenta que en el país no existen métodos oficiales adecuados para el aislamiento, caracterización, identificación y enumeración, para el estudio de las especies correspondientes al género *Bifidobacterium*. Los estudios microbiológicos tardan varios días en ofrecer resultados fiables y es necesario disponer de algún tipo de procedimiento de identificación, rápido y confiable, para la determinación acertada de este tipo de microorganismos.

Este proyecto de tesis permitirá hacer una contribución en este sentido, determinando la presencia de este género en productos lácteos nacionales, utilizando técnicas de microbiología tradicional y molecular, lo cual permitirá en un futuro abrir el campo de investigación en el país sobre el tema de los beneficios probióticos en los seres humanos, y su uso potencial sea mejor aprovechado por las industrias alimenticias y farmacéuticas.

3.1 HIPÓTESIS.

Es conocido que cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*, pueden ser encontrados en productos lácteos. Estas cepas son buenas productoras de ácido acético y láctico y generan beneficios a los consumidores en las dosis apropiadas. El aislamiento de estas bacterias en dichos productos permitirá comparar distintos métodos de identificación, tradicional y molecular, lo cual redundará en beneficio de los consumidores y de las industrias alimentaria y farmacéutica.

4. OBJETIVOS:

4.1. Objetivo General.

Aislar, identificar, enumerar y caracterizar las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos nacionales tipo yogurt.

4.2. Objetivos Específicos.

1. Aislar y cultivar las bacterias de los productos lácteos tipo yogurt.
2. Identificar y clasificar las cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* por métodos microbiológicos tradicionales y automatizados.
3. Comparar el crecimiento de las cepas provenientes de los yogures, en dos medios de cultivo reportados como selectivos para el género *Bifidobacterium sp.*
4. Determinar los títulos bacterianos por siembra por profundidad, tanto en placas como en tubos planos Miller-Pricket.
5. Aislar el ADN genómico de las cepas.
6. Caracterizar la cepa de interés utilizando PCR.

5. PLAN DE TRABAJO.

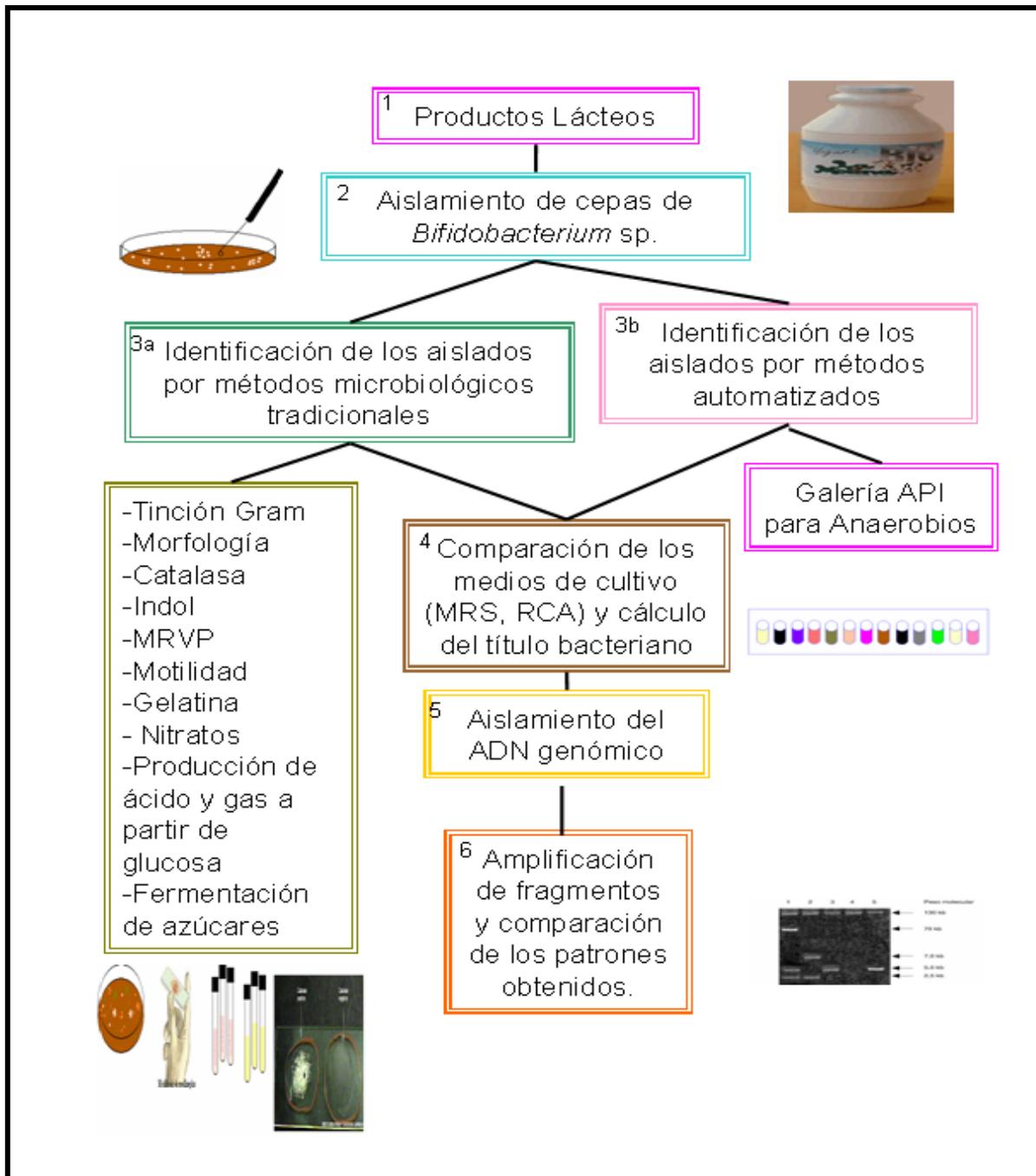


Figura 11: Esquema de trabajo para el estudio de cepas de bifidobacterias aisladas del yogurt.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Materiales:

6.1.1 Material biológico.

Las muestras fueron recolectadas a partir de dos marcas de yogurt comercializados en los mercados del Área Metropolitana de Caracas (Yogurt “Bio” y Yogurt “Yogurtin”), ambos de consistencia líquida, manufacturadas por Lácteos los Andes, C.A (Lácteos los Andes, C.A, Nueva Bolivia, Edo. Mérida, Venezuela. Registrado en el M.P.P.S Bajo el N° A-72.747 y A-54.408, respectivamente).

Estos dos yogures se seleccionaron con el mismo sabor, para evitar las posibles variaciones que se puedan presentar, y se analizó un yogurt por semana, para garantizar que las muestras pertenecieran a lotes diferentes. Además se aseguró que los yogures, no solo estuvieran dentro de su rango de vida útil, sino que además el producto estuviera lo mas alejado posible de su fecha de vencimiento, lo cual nos permitió tener mayor certeza de la presencia o ausencia del microorganismo a estudiar.

6.1.2 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento.

En el estudio se emplearon el Agar y el caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) y Agar Reinforced Clostridium (RCA), ambos de Oxoid, LTD (Basingstoke, Inglaterra). Ambos medios son recomendados para el crecimiento de este grupo de microorganismos (Payne, 1999, Arroyo1994).

6.1.3 Pruebas bioquímicas y fisiológicas utilizadas.

Todos los medios de las pruebas realizadas para la identificación microbiológica, fueron utilizados en esterilidad o filtrados según la composición del mismo.

6.1.3.1. Medio Gelatina Nutritivo.

Este medio se utilizó para medir la presencia de hidrolasas o proteinasas, que permiten la incorporación de ciertos sustratos a la célula.

6.1.3.2 Caldo Rojo de Metilo y Voges- Proskauer (MRVP).

Este medio se utilizó con la finalidad de comprobar si la fermentación de la glucosa es realizada por la vía de los ácidos mixtos o por la vía del butilenglicol.

6.1.3.3. Solución de antibióticos utilizados para los medios MRS y RCA.

La solución de antibióticos utilizada posee los constituyentes que se presentan en la **Tabla 4**, según lo recomendado por Payne en 1999:

Tabla 4: Constituyentes de la solución de antibióticos de los medios selectivos para el género *Bifidobacterium* (Payne,1999).

Constituyentes	Concentración (g/l)
Cloruro de litio	2
Propionato de sodio	3
Acido nalidíxico	0,02
Sulfato de polimixina B	0,0085
Sulfato de kanamicina	0,050
Iodoacetato	0,0125
2,3,5 Trifeniltetrasodio	0,025

6.1.3.4. Solución de HCl- Cisteína.

La solución de cisteína- HCl (Merck Darmstadt, Alemania) fue utilizada como un agente reductor en el medio MRS a una concentración del 0,5%.

6.2. Métodos:

6.2.1. Diluciones seriadas para la siembra de las muestras.

Se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , de cada uno de los yogures analizados, en agua peptonada (**figura 12**). Estas se realizaron agregando 11ml de la muestra en 99 ml de agua peptonada.

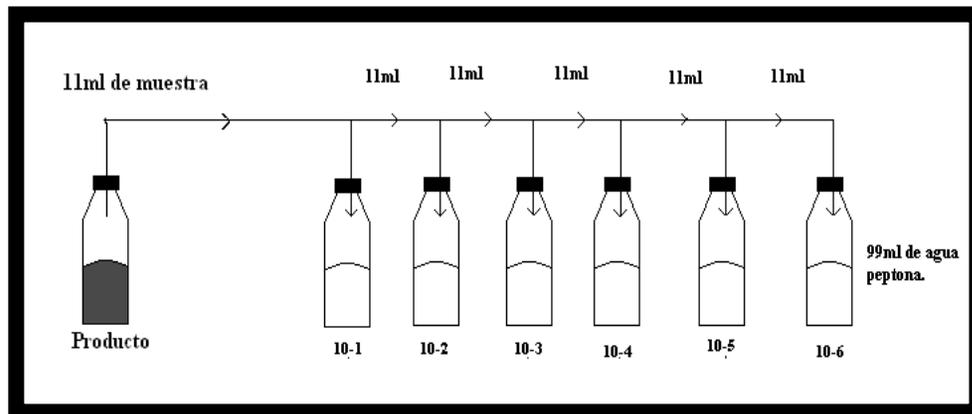


Figura 12: Esquema seguido para las realización de diluciones seriadas de las muestras investigadas para el aislamiento de bifidobacterias.

6.2.2. Siembra por profundidad en placas.

Para la siembra se colocó 1ml de la dilución 10^{-6} de cada muestra del yogur “Bio” y “Yogurtin” en placas de agar por duplicado. A cada placa se le agregó 5ml de agar MRS atemperado y suplementado con 0,05% p/v de la solución de antibióticos y 0,5% p/v de cisteína. Una vez solidificado, se le añadieron 10ml adicionales del mismo agar. Este procedimiento se utilizó de igual manera con el agar RCA. Cada una de las placas fueron incubadas en anaerobiosis, utilizando jarras de Gas-Pack, junto a una vela y una solución diluida de alka-seltzer, a 37°C por 48horas.

6.2.3. Siembra por profundidad en tubos caras planas o Miller-Prickett.

Para la siembra en estos tubos se colocó 1ml de la dilución 10^{-6} de cada muestra del yogurt en tubos caras planas. Una vez colocadas las muestras en los tubos Miller-Prickett, se le adicionaron 4 ml de agar MRS atemperado y suplementado con 0,5% p/v de la solución de antibióticos y 0,5% p/v de cisteína. Una vez solidificado, se le añadieron 5ml del mismo agar. Este procedimiento se repitió cuando se utilizó el agar RCA.

Los tubos fueron incubados en anaerobiosis, utilizando jarras de Gas-Pack, con vela y una solución diluida de alka-seltzer para asegurar la anaerobiosis, a 37°C por 48 horas.

6.2.4. Aislamiento de las colonias seleccionadas.

Las colonias aisladas semanalmente de cada uno de los yogures, fueron seleccionadas según la similitud de la morfología con la reportada en la bibliografía. Se colocaron en cuñas del agar seleccionado, sembrando por agotamiento ó, por su dificultad de crecimiento, en tubos de rosca con caldo del mismo tipo, para obtener un mayor número de colonias puras. En el caso de la siembra por agotamiento, cada uno de los tubos de rosca, fueron incubados bajo las mismas condiciones de anaerobiosis utilizando jarras de Gas-Pack a, 37°C por 48 horas. Estas colonias se repicaron cada 15 días, para mantenerlas viables, en caldo MRS suplementado con Cisteína- HCl, manteniéndose en refrigeración.

6.2.5. Formación de atmósferas anaerobias.

Las atmósferas anaerobias se formaron con ayuda de jarras de anaerobiosis (recipiente Gas- Pak) y su eficiencia fue comprobada con indicadores comerciales de

anaerobiosis. Las jarras constan de un soporte para placas, incluido en una cubeta transparente con tapa hermética. Las siembras fueron realizadas utilizando tanto velas, como tabletas del producto comercial alka-seltzer, diluidas en 5ml de agua aproximadamente; los cuales ayudan a mejorar la atmósfera de anaerobiosis dentro de la jarra, tal como se muestra en la **Figura 13**.



Figura 13: Jarras Gas Pack y materiales utilizados para la incubación anaeróbica en la investigación de bifidobacterias en productos lácteos tipo yogurt

6.2.6 Identificación de las cepas por métodos convencionales.

Se realizaron diversas pruebas microbiológicas para verificar si las características metabólicas y fisiológicas de las cepas aisladas de los yogures concuerdan con el perfil de las bifidobacterias. Las pruebas se realizaron según las especificaciones descritas en MacFaddin, 2003.

6.2.6.1. Prueba de la Catalasa.

Con el asa de siembra se tomó una colonia pura de 72 horas de crecimiento y se colocó sobre un portaobjetos limpio. A este se le añadió una gota de H₂O₂ al 30% sobre el microorganismo y se observó la producción o no de burbujas.

6.2.6.2 Producción de indol.

Se colocaron 6ml de caldo peptonado en tubos de rosca y se esterilizaron por calor húmedo (autoclave) por 15min. Estos tubos se inocularon con una colonia de 72 horas de crecimiento y se incubaron en anaerobiosis, por 72 horas a 35°C. Terminado el tiempo de incubación, se revelaron las pruebas con 0,5ml de reactivo de Kovac, agitando suavemente. El desarrollo de un color rojo denotó la producción de indol.

6.2.6.3 Prueba de la gelatina.

Se prepararon 6 ml de medio gelatina nutritivo para cada uno de los tubos de rosca a utilizar, y fueron esterilizados utilizando calor húmedo (autoclave) por 15 minutos. Estos tubos se inocularon con una colonia de 72 horas de crecimiento utilizando un asa recta. Este inóculo fue realizado con mucho cuidado formando un eje en el medio del tubo que contiene el medio gelatina, y colocándolos en anaerobiosis por 72 horas a 35°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se colocaron en nevera por 20 minutos para luego observar los resultados. Si se licua la gelatina será positivo y si el medio continúa solidificado será negativo.

6.2.6.4 Motilidad.

Se prepararon 6 ml de agar nutritivo por cada uno de los tubos de rosca a utilizar y se esterilizaron mediante el uso de una autoclave por 15 minutos. Estos tubos fueron inoculados con un asa recta, con la que se tomó una colonia fresca de 72 horas de crecimiento, formando con mucho cuidado un eje en el medio del tubo y colocándolos en anaerobiosis por 72 horas a 35°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se observaron los resultados obtenidos. Un crecimiento sobre el eje indica una bacteria no

móvil y el crecimiento alrededor del eje indica movilidad por parte del microorganismo.

6.2.6.5 Prueba Rojo Metilo y Voges-Proskauer.

Se prepararon dos tubos de rosca estéril con 6ml de caldo MRVP, para cada una de las cepas aisladas. Se inocularon los microorganismos por duplicado. Los tubos fueron colocados en anaerobiosis por 72 horas a 35°C. Una vez finalizado el período de incubación se agregaron en un tubo 2 a 3 gotas del reactivo rojo de metilo, y al otro tubo 2 gotas de α -naftol al 5%, agitándose vigorosamente, y luego se le añade 1 gota de KOH mezclándolo muy bien, para revelar la prueba. Una vez reveladas las pruebas del rojo de metilo, si el resultado es positivo se observará la formación de un color rojizo, si es negativo el tubo tomará una coloración amarilla. En la prueba Voges-Proskauer (VP) si se observa una coloración rojiza el resultado será positivo, si no se forma ningún tipo de coloración la prueba se considera negativa.

6.2.6.6 Tinción Gram.

Se tomó con el asa de níquel una colonia bacteriana y se disolvió sobre una gota de agua, la cual se extiende sobre una lámina de portaobjetos, dejando secar la preparación.

Luego se realizará el siguiente procedimiento:

1. Tinción con cristal violeta.
2. Fijación con una solución de yodo.
3. Extracción con Alcohol o Acetona.

4. Tinción de contraste con Safranina.

6.2.6.7 Reducción del Nitrato.

Se preparó 2ml de caldo nitrato por tubo de prueba. Los tubos se inocularon con una colonia fresca de 72 horas de crecimiento con un asa, y se colocaron en anaerobiosis por 72 horas a 35°C. Terminado el tiempo de incubación se reveló la prueba con 6 gotas de ácido sulfanílico y otras 6 de α -naftilamina, agitando suavemente.

El desarrollo de un color rojo denotó la presencia de nitritos. Esta prueba se puede comprobar con un blanco, al cual se le añadirán los reactivos y si continúa igual se le añade una pequeña cantidad de polvo de zinc, para verificar la formación del color.

6.2.6.8. Fermentación de azúcares.

Para esta prueba se colocaron 6 ml de caldo rojo fenol en tubos de rosca, y por separado en los diferentes tubos se diluyeron 1% de los azúcares que se eligieron para el estudio como son: lactosa, rafinosa, sorbitol, manitol, dulcitol y ramnosa.

Estos medios fueron esterilizados por filtración, para evitar la degradación del carbohidrato por el calor. Las cepas, de 72 horas de crecimiento, se sembraron por duplicado en cada tubo que poseía un azúcar diferente. Además se utilizaron blancos para verificar si las reacciones obtenidas son las correctas.

Estos tubos fueron inoculados con un asa, y se colocaron en anaerobiosis por 72 horas a 35°C. El cambio de color de rojo a amarillo indica la producción de ácido, que provoca el cambio de color del indicador, lo cual denota la utilización de dichos carbohidratos como fuente de energía.

6.2.6.9 Producción de ácido y gas a partir de glucosa.

Se prepararon 10ml de caldo rojo fenol por cada uno de los tubos de rosca a utilizar, y se les colocaron de manera invertida los tubos Durham, los cuales ayudaron a presenciar la formación de gas, producto del desplazamiento del líquido. Cada tubo se esterilizó por 5min. Además se utilizaron “blancos” para verificar las reacciones.

Los tubos fueron inoculados con un asa, y se colocaron en anaerobiosis por 72 horas a 35°C. El cambio de color de rojo a amarillo indica la producción de ácido, que provoca el cambio de color del indicador, lo cual denotará la utilización de los carbohidratos como fuente de energía.

6.2.6.10 Prueba de formación de esporas.

Un cultivo en caldo MRS de 72 horas, se colocó en un baño a 100°C, por 10 minutos, y rápidamente en hielo por 5 minutos. Una vez que las células fueron sometidas al shock térmico, se colocaron en placas de medio MRS para probar si existe o no desarrollo de formas esporuladas.

6.2.7 Aplicación de técnicas automatizadas (galerías API para anaerobios).

Este tipo de prueba consiste en un sistema para la identificación de microorganismos anaerobios de importancia médica. El sistema está estandarizado, y combina un total de 20 pruebas colorimétricas. El estuche Api de la casa comercial bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francia), consta de un formato (galería) con 20 microtubos conteniendo los medios de identificación en forma deshidratada. Los resultados fueron leídos por el equipo ATB Expression Vitex Systems, bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francia).

6.2.7.1 Identificación de las cepas del género *Bifidobacterium* por métodos automatizados.

Las microtubos se inocularon con una suspensión bacteriana de no más de 72 horas de crecimiento. La galería se inoculó con 35 μ L de una suspensión bacteriana de cada cepa a analizar, suspendida en 2ml de agua destilada estéril. Tras un período de incubación de 4:00- 4:30 horas a 37 °C, se observaron los virajes de color en el medio, bien sea directamente o tras la adición de reactivos utilizados para el revelado de las pruebas.

6.2.8 Comparación de dos medios de cultivos reportados selectivos para el género *Bifidobacterium*.

Una vez realizado las pruebas microbiológicas correspondientes para el género, y asegurado la correcta morfología de las colonias, se realizaron diluciones seriadas de las dos marcas de yogures utilizadas en nuestro estudio y se sembraron por profundidad en los medios RCA suplementado con 0,05% de la solución de antibióticos recomendada por Payne en 1998 y MRS suplementado con las misma solución de antibióticos mas 0,5 % de cisteína- HCl, tanto en placas como en tubos Miller-Pricket. Estos se colocaron en anaerobiosis a 37°C por 72 horas.

6.2.8.1 Enumeración de cepas del género *Bifidobacterium* aisladas de productos tipo yogurt.

Una vez terminado el período de incubación de las placas y tubos Miller-Pricket con los dos medios de cultivo se realizó la enumeración, a fin de comprobar cual es el medio mas apropiado para el crecimiento de este grupo bacteriano. El contaje se realizó según las

reglas de contaje de colonias (APHA, 1992). Se calculó el título bacteriano según la siguiente fórmula:

$$T = \frac{\# \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{Volumen de siembra}}$$

6.2.9 Aislamiento del ADN genómico.

6.2.9.1 Método de Levesqué y col. (1995)

Una vez obtenidas las cepas, se procedió a purificar su ADN genómico utilizando una modificación de la técnica de Levesqué y colaboradores (1995). Se cultivó la cepa durante 72 horas en 2 mL de caldo MRS. En un tubo eppendorf se colocaron 200 μ L del crecimiento bacteriano en caldo y 800 μ L de agua bidestilada. Se llevó a ebullición por 30 minutos, y se centrifugó la suspensión celular a 12.000 xg durante 2 minutos. Se descartó el sedimento, y el sobrenadante se almacenó a -20°C para su análisis posterior (Hugo, 2006).

6.2.9.2 Método de Gomes y col. (1999)

Para aplicar este método de aislamiento los cultivos bacterianos se crecieron en 5ml de caldo MRS durante 7 días a 37°C. De allí se tomaron 1,5 ml del caldo que presentaba el crecimiento y se centrifugaron a 13.000 xg durante 5 minutos. El sedimento fue resuspendido en 200 μ L de la solución Tris 0,1M a la cual se le añadieron 200 μ L de solución de lisis (NaOH 0,2 N y 1% de SDS), los cuales se mezclaron con 700 μ L de fenol-cloroformo-isoamílico en una proporción v/v de 25: 24: 1 respectivamente. Dicha mezcla se homogenizó y centrifugó por 10 minutos a 13.000 xg, donde al finalizar se observó la formación de dos fases. Se tomó la fase acuosa que fue colocada en un eppendorf y se le agregaron 700 μ L de etanol frío y se centrifugó 13.000 xg por 5 minutos. El sedimento fue

lavado con etanol al 70% y se centrifugó a 13.000 xg durante 5 minutos. El ADN se secó y se resuspendió en 50 μL de agua destilada estéril (Gomes y col., 1999).

6.2.10 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La identificación y caracterización de las bifidobacterias, se realizó por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando la polimerasa ATE, aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, de la casa comercial Fundaim. La polimerasa viene en una mezcla LPU que incluye la polimerasa ATE, el buffer de reacción y el magnesio, todo optimizado a una concentración de 2X. La mezcla contiene desoxinucleótidos (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) para una concentración final de 200 μM c/u; la enzima Taq DNA polimerasa (concentración final de 20 unidades. mL^{-1}) y MgCl_2 (concentración final de 1,5 mM).

El volumen final de la mezcla de PCR fue de 25 μL . En cada reacción se utilizan: 12,5 μL de la mezcla LPU con la polimerasa ATE, 2,5 μL de los iniciadores para una concentración final de 4 μM , y 4,5 μL de agua miliQ, para un volumen final de 23 μL , al cual se le añaden 2 μL de la muestra de ADN obtenido por alguno de los métodos antes descritos. El control negativo de los reactivos para todos los casos, se preparó con agua miliQ en sustitución al lisado celular (o ADN molde) para asegurar que ni la mezcla de LPU, ni los iniciadores estuviesen contaminados.

6.2.11 PCR-16S

Para garantizar la presencia de ADN en los aislamientos realizados, todas las muestras fueron sometidas a una reacción PCR universal, en la cual se amplifica una región del gen ARNr 16S, altamente conservada entre los diferentes organismos.

Un resultado positivo en esta reacción nos garantiza descartar falsos negativos de nuestros resultados. Los iniciadores utilizados son los reportados por Lu y colaboradores (2000). Las secuencias se muestran en la **Tabla 5** y las condiciones de la reacción de PCR en la **Tabla 6**.

Tabla 5: Características de los iniciadores para la amplificación del gen 16S ARNr

Gen	Iniciadores	Secuencias	Th °C	Tamaño amplificado
16S ARNr	U1 U2	5' CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3' 5' ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC 3'	55	996 +150

Th: Temperatura de hibridación

El control positivo de la reacción es una cepa de *E. coli* J-62 (fenotipo F⁻, His, Lac, Pro, Trp, RIF (CVCM # 131)) y cuya extracción de ADN fue realizada con el método de Levesque.

Tabla 6: Condiciones del programa para la PCR con los iniciadores 16S ARNr.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Calentamiento	94	5min	1x
Desnaturalización	94	1min	
Hibridación de los iniciadores (<i>annealing</i>)	50	1min	35x
Extensión de los iniciadores	72	2min	
Extensión final	72	10min	1x
Preservación	4	∞	1x

6.2.12 Eric-PCR (Secuencias *Consenso Intergénicas Repetitivas de Enterobacterias*) y **REP-PCR** (*secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas*)

Una de las técnicas utilizadas para la identificación de Bifidobacterias aisladas fue la técnica de ERIC – PCR. En la **Tabla 7** se reportan las secuencias de los iniciadores utilizados, reportados por Ventura y colaboradores, 2003 y Ventura y Zink, 2002, y las condiciones de la reacción se muestran en la **Tabla 8**.

La segunda técnica usada para la identificación de este tipo de microorganismos fue la REP – PCR y se realizó utilizando el cebador único REP1 reportado por Masco y colaboradores, 2003. Las secuencias del iniciador se describen en la **Tabla 7** y las condiciones para la reacción en la **Tabla 9**.

Tabla 7: Características de los iniciadores para la amplificación de las secuencias repetidas REP y ERIC.

Gen	Iniciadores	Secuencias	Th (°C)	Tamaño amplificado (pb)
ERIC	ERIC1	5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3'	Variable	Variable
	ERIC2	5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3'		
REP	REP'1	5' GCG CCG ICA TGC GGC ATT 3'	Variable	Variable

Th: Temperatura de hibridación

Tabla 8: Condiciones del programa para la PCR con los iniciadores ERIC1 y ERIC2.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Calentamiento	94	5min	1x
Desnaturalización	94	1min	
Hibridación de los iniciadores (<i>annealing</i>)	36 ; 38	1min	40x
Extensión de los iniciadores	72; 65; 68	10min	
Extensión final	72; 65; 68	15min	1x
Preservación	4	∞	1x

Tabla 9: Condiciones del programa para la PCR con el iniciador REP1.

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Calentamiento	94	5min	1x
Desnaturalización	94	1min	
Hibridación de los iniciadores (<i>annealing</i>)	36	1min	40x
Extensión de los iniciadores	65; 68	10min	
Extensión final	65; 68	15min	1x
Preservación	4	∞	1x

Th: Temperatura de hibridación

En el Laboratorio de Biología de Plásmidos se han estandarizado el uso de estas reacciones utilizando una temperatura de hibridación de 38 °C para enterobacterias, pero como en nuestro caso trabajamos con otras cepas bacterianas no enterobacterias, se ensayaron distintas temperaturas a fin de estandarizar las condiciones de la reacción de PCR para la identificación de los aislados de dicho género de los productos lácteos a estudiar.

6.2.13 Electroforesis en geles de agarosa.

Los productos de las reacciones de amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Se preparó la agarosa disolviendo la cantidad adecuada en buffer TBE 1X (stock 10X: Tris Base 0,89M, ácido bórico 0,89M y EDTA 0,02, pH: 8,0) (Sambrook y Russel, 2001). Para los fragmentos pequeños como los amplificados en ERIC y REP se utilizaron geles de agarosa al 2%, y para las reacciones de PCR restantes, se utilizaron geles de agarosa al 1,2%.

A las muestras del ADN amplificado se le añadió buffer de carga 6X (azul de bromofenol 0,25 %, xylene cyanol 0,25% y glicerol 30%). Como marcador de peso molecular se utilizó Gene Ruler 1 kb, DNA ladder, de la casa comercial Lab Aid. Una vez culminada la corrida, el ADN se visualizó con bromuro de etidio, a una concentración de 0,5 µg. mL⁻¹. Las imágenes se observaron en un equipo de Gel Doc 1.000 de la casa Bio-Rad (Milán, Italia), y su análisis se realizó con el programa Multi Analyst (Rivas, 2006).

7. RESULTADOS

Como un aporte a la microbiología del género *Bifidobacterium*, bacterias que tienen altos potenciales como probióticas en productos lácteos, nos propusimos estudiar la presencia de este microorganismo en dos productos nacionales, comercializados en el área Metropolitana de Caracas, que en su composición declaran contenido de probióticos. El estudio se realizó mediante su aislamiento, enumeración e identificación de las cepas utilizando métodos microbiológicos, tanto tradicionales como automatizados, y métodos moleculares.

7.1 Aislamiento de las muestras

Se analizaron un total de 10 yogures marca “Bio” y 10 marca “Yogurtin”, uno por cada semana, para asegurar que estos pertenecieran a lotes diferentes y verificar si las cepas se encontraban presentes en todas las muestras analizadas. Se aislaron un total de 3 colonias por muestra, para un total de 30 colonias por cada una de las marcas comerciales utilizadas en el estudio. Este aislamiento se realizó en el Laboratorio de Nuevas Tecnologías entre los meses de octubre y noviembre del 2007. Cada una de las colonias aisladas poseía las siguientes características: forma circular, convexas, con bordes enteros, y de colores crema, ó blanco en algunas ocasiones según lo mencionado por Scardovi en el año de 1986. Estas se pueden observar en la **Figura 14**.



Figura 14: Aspecto de las colonias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt: Bio (A) y Yogurtin (B) en el medio MRS.

7.2 Pruebas convencionales para la identificación microbiológica de las cepas aisladas

A partir de las colonias aisladas (60 colonias en total) se obtuvieron cultivos frescos crecidos como se mencionó en la metodología; y a cada uno de los aislados de los productos lácteos se les realizó las pruebas descritas en el apartado 6.2.6 de materiales y métodos.

Es importante mencionar que un factor que se controló durante todo el estudio fue evitar la reoxigenación de los medios manteniendo un carácter reductor, de manera de asegurar la obtención de cultivos puros y asegurar el desarrollo de las bifidobacterias. Todos los medios preparados fueron utilizados inmediatamente después de la esterilización y utilizando la solución de cisteína- HCl para reducir el medio.

La primera diferenciación que se realizó fue la tinción de Gram (**Figuras 15 y 16**). En ambas figuras se observan bacilos Gram positivos, con bordes ensanchados y bifurcados, característicos de este género bacteriano. Las manchas rojas observadas en la fotografía son decoloraciones o restos del colorante. La visualización al microscopio certificó la pureza del cultivo de bacterias aisladas de cada uno de los yogures.

Una vez que se verificaron los cultivos puros obtenidos de los 60 aislados, a todos los organismos Gram positivos y con forma bacilar ramificados o curvos, se les realizó el resto de las pruebas mencionadas para comprobar que los resultados de las pruebas bioquímicas fueran las mismas que las del microorganismo de estudio. En la **Tabla 10** y en la **Tabla 11** se muestran los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas que fueron aplicadas en esta parte del estudio para las 30 cepas aisladas del yogurt “Bio” y las 30 cepas provenientes del yogurt “Yogurtin”.



Figura 15: Apariencia al microscopio óptico de células aisladas de yogurt “Bio” después de haber realizado la tinción Gram.



Figura 16: Apariencia al microscopio óptico de células aisladas de yogurt “Yogurtin” después de haber realizado la tinción Gram.

Tabla 10: Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepas aisladas del yogurt "Bio".

Colonia	Tinción Gram	Catalasa	Gelatina	Indol	Motilidad	MR/VP	Nitrato	Formación de esporas
1	+	-	-	-	-	+/-	-	-
2	+	-	-	-	-	+/-	-	-
3	+	-	-	-	-	+/-	-	-
4	+	-	-	-	-	+/-	-	-
5	+	-	-	-	-	+/-	-	-
6	+	-	-	-	-	+/-	-	-
7	+	-	-	-	-	+/-	-	-
8	+	-	-	-	-	+/-	-	-
9	+	-	-	-	-	+/-	-	-
10	+	-	-	-	-	+/-	-	-
11	+	-	-	-	-	+/-	-	-
12	+	-	-	-	-	+/-	-	-
13	+	-	-	-	-	+/-	-	-
14	+	-	-	-	-	+/-	-	-
15	+	-	-	-	-	+/-	-	-
16	+	-	-	-	-	+/-	-	-
17	+	-	-	-	-	+/-	-	-
18	+	-	-	-	-	+/-	-	-
19	+	-	-	-	-	+/-	-	-
20	+	-	-	-	-	+/-	-	-
21	+	-	-	-	-	+/-	-	-
22	+	-	-	-	-	+/-	-	-
23	+	-	-	-	-	+/-	-	-
24	+	-	-	-	-	+/-	-	-
25	+	-	-	-	-	+/-	-	-
26	+	-	-	-	-	+/-	-	-
27	+	-	-	-	-	+/-	-	-
28*	+	+	-	-	-	+/-	-	-
29*	+	-	-	-	-	-/+	-	-
30*	+	-	-	-	-	-/+	-	-
Bf	+	-	-	-	-	v/-	-	-

(-) = Negativo, (+) positivo, (v)= Variable, * Descartada, Bf = Características propias del género.

Tabla 11: Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a cepas aisladas de yogurt "Yogurtin"

Colonia	Tinción Gram	Catalasa	Gelatina	Indol	Motilidad	MR/VP	Nitrato	Formación de esporas
1	+	-	-	-	-	+/-	-	-
2	+	-	-	-	-	+/-	-	-
3	+	-	-	-	-	+/-	-	-
4	+	-	-	-	-	+/-	-	-
5	+	-	-	-	-	+/-	-	-
6	+	-	-	-	-	+/-	-	-
7	+	-	-	-	-	+/-	-	-
8	+	-	-	-	-	+/-	-	-
9	+	-	-	-	-	+/-	-	-
10	+	-	-	-	-	+/-	-	-
11	+	-	-	-	-	+/-	-	-
12*	+	-	-	-	-	-/-	-	-
13*	+	-	-	-	+	+/-	+	-
14*	+	-	-	-	+	+/-	-	-
15*	+	+	-	-	+	+/-	-	-
16*	+	-	-	+	-	-	?	-
17*	+	-	-	-	-	-	?	-
18*	+	-	-	-	-	-	?	-
19*	+	-	-	-	-	-	-	+
20*	+	-	-	-	+	-	-	-
21*	+	-	-	-	+	-	-	-
22*	+	+	-	-	-	+/-	-	+
23*	+	+	-	-	-	+/-	-	-
24*	+	+	-	-	-	+/-	-	-
25*	+	-	-	+	-	+/-	-	-
26*	+	-	-	+	-	+/-	-	-
27*	+	-	-	+	-	+/-	+	-
28*	+	-	-	-	+	-/-	-	-
29*	+	-	?	-	-	+/-	-	-
30*	+	-	?	-	-	+/-	-	-
Bf	+	-	-	-	-	v/-	-	-

(-) = Negativo, (+) positivo, (?) dudoso, (v)= variable * Descartada, Bf = Características propias del género.

Los resultados nos verifican que las cepas 28, 29 y 30 del yogurt “Bio”, al igual que las cepas 12 a 30 del yogurt “Yogurtin” no presentaban las características de las bifidobacterias, ya que algunas pruebas de identificación realizadas (gelatinasas, nitrato, indol, formación de esporas, entre otras) dieron resultados contrarios a las características para dicho género.

Los resultados confirman que entre las 30 colonias aisladas del yogurt “Bio”, 27 (90%) parecen ser positivas para el género *Bifidobacterium* y de las 30 del yogurt “Yogurtin” solo 11 (36,66%) cepas parecen tener dichas características. De las 60 colonias aisladas en este trabajo, obtuvimos un 18,3% de cepas positivas para el yogur “Yogurtin”, un 45% para el yogurt “Bio”. El 36,7 de las cepas que no correspondían con el género de interés (**Figura 17**).

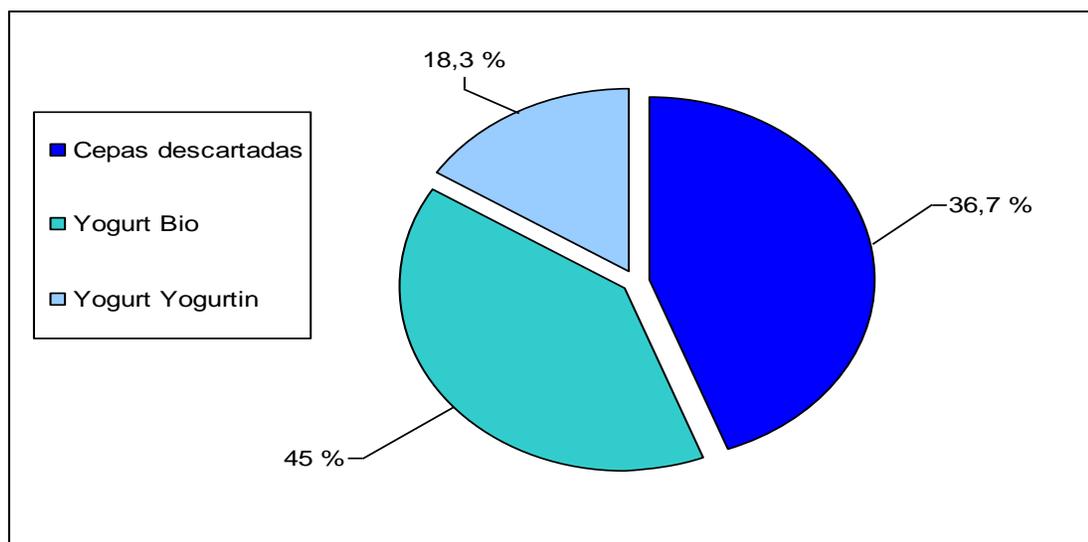


Figura 17: Porcentaje de cepas aisladas a partir de dos productos tipo yogurt con resultados positivos para el género *Bifidobacterium*

Para confirmar la identificación de las presuntas cepas de bifidobacterias, se realizó la prueba de fermentación de diversos sustratos, señalados en la **Tabla 3**, como el dulcitol y la rafinosa, para los cuales las bacterias del género *Bifidobacterium* responden de forma negativa y otros como la lactosa, rafinosa, sorbitol, manitol y la glucosa para los cuales este género responde de forma positiva. Estos resultados se muestran en las **Tablas 12 y 13**.

Tabla 12: Resultados de las pruebas de fermentación de azúcares de colonias aisladas de yogurt "Bio".

Colonia	Lactosa	Rafinosa	Sorbitol	Manitol	Dulcitol	Ramnosa	Producción de ácido a partir de glucosa	Producción de gas a partir de glucosa
1	+	+	+	+	-	-	+	-
2	+	+	+	+	-	-	+	-
3	+	+	+	+	-	-	+	-
4	+	+	+	+	-	-	+	-
5	+	+	+	+	-	-	+	-
6	+	+	+	+	-	-	+	-
7	+	+	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	-	-	+	-
9	+	+	+	+	-	-	+	-
10	+	+	+	+	-	-	+	-
11	+	+	+	+	-	-	+	-
12	+	+	+	+	-	-	+	-
13	+	+	-	+	-	-	+	-
14	+	+	-	+	-	-	+	-
15	+	+	-	+	-	-	+	-
16	+	+	+	+	-	-	+	-
17	+	+	+	+	-	-	+	-
18	+	+	+	+	-	-	+	-
19	+	+	+	+	-	-	+	-
20	+	+	+	+	-	-	+	-
21	+	+	+	+	-	-	+	-
22	+	+	+	+	-	-	+	-
23	+	+	+	+	-	-	+	-
24	+	+	+	+	-	-	+	-
25	+	+	+	+	-	-	+	-
26	+	+	+	+	-	-	+	-
27	+	+	+	+	-	-	+	-
Bf	+	V	V	+	-	-	+	-

(-) = Negativo, (+) positivo, (V) variable, Bf = Características propias del género.

Tabla 13: Resultados de las pruebas de fermentación de azúcares de colonias aisladas del yogurt "Yogurtin".

Colonia	Lactosa	Rafinosa	Sorbitol	Manitol	Dulcitol	Ramnosa	Producción de ácido a partir de glucosa	Producción de gas a partir de glucosa
1	+	+	+	+	-	-	+	-
2	+	+	+	+	-	+	+	-
3	+	+	+	+	-	-	+	-
4	+	+	+	+	-	+	+	-
5	+	+	-	+	-	-	+	-
6	+	+	+	+	-	-	+	-
7	+	+	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	-	-	+	-
9	+	+	+	+	-	-	+	-
10	+	+	+	+	-	?	+	-
11	+	+	-	+	-	+	+	-
Bf	+	V	V	+	-	-	+	-

(-) = Negativo, (+) positivo, (V) variable, (?) dudoso ,Bf = Características propias del género.

En la **Figura 18** se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación, las cuales pueden ser variables según la especie. El análisis de los resultados señala que las 60 colonias de los dos yogures, 38 (63,33%) son posibles cepas de bifidobacterias. El 100% de estas 38 colonias fermentan la lactosa, la rafinosa, el manitol y la glucosa, el 92% fermenta sorbitol, y el 10,52% la ramnosa, y ninguna cepa posee capacidad de fermentar el dulcitol.

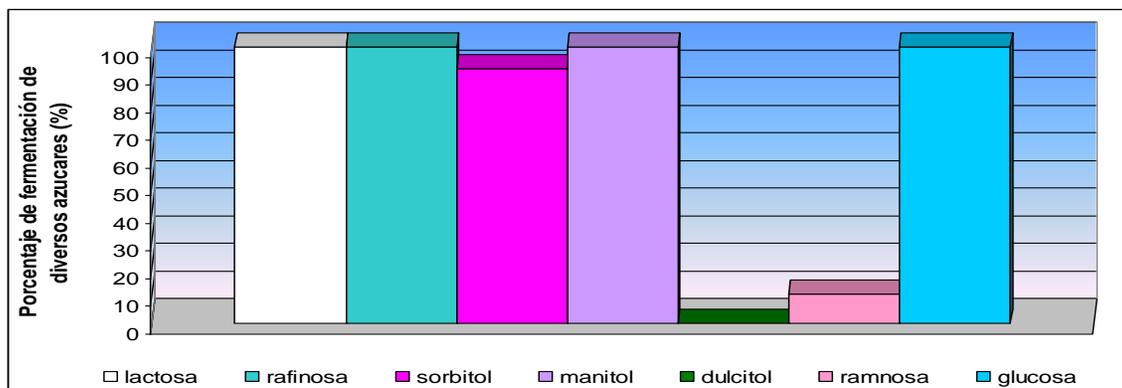


Figura 18: Porcentajes de pruebas positivas de fermentación de diferentes azúcares para bifidobacterias, aplicadas a cepas aisladas de productos tipo yogurt

7.3 Identificación de las cepas de estudio mediante el uso de galería automatizada.

La galería API automatizada utilizada en el estudio para corroborar los resultados anteriores fue la Rapid ID 32 A, para organismos anaerobios. Dicha galería se aplicó a las cepas de estudio. Los resultados del equipo no arrojaron ningún perfil de identificación para estas, ni siquiera para la cepa *B. lactis*, usada como control positivo (Cepa N° 1298, donada por el CVCM), sin embargo se debe resaltar que los resultados observados en las lecturas de las muestras son iguales a los del género estudiado. En la **Figura 19** se muestran el registro fotográfico de las pruebas automatizadas con las reacciones de color generadas, notándose claramente que se conserva los patrones de reacción entre las muestras aisladas de los yogures analizados y la cepa control de *B. lactis*. En la **Figura 20** se muestra el registro reportado por el equipo.



Figura 19: Registro fotográfico de los resultados del Estuche de identificación para el control positivo *B. lactis* (A), para una de las muestras del yogurt “Yogurtin” (B) y para una de las muestras aisladas del yogurt “Bio” (C).

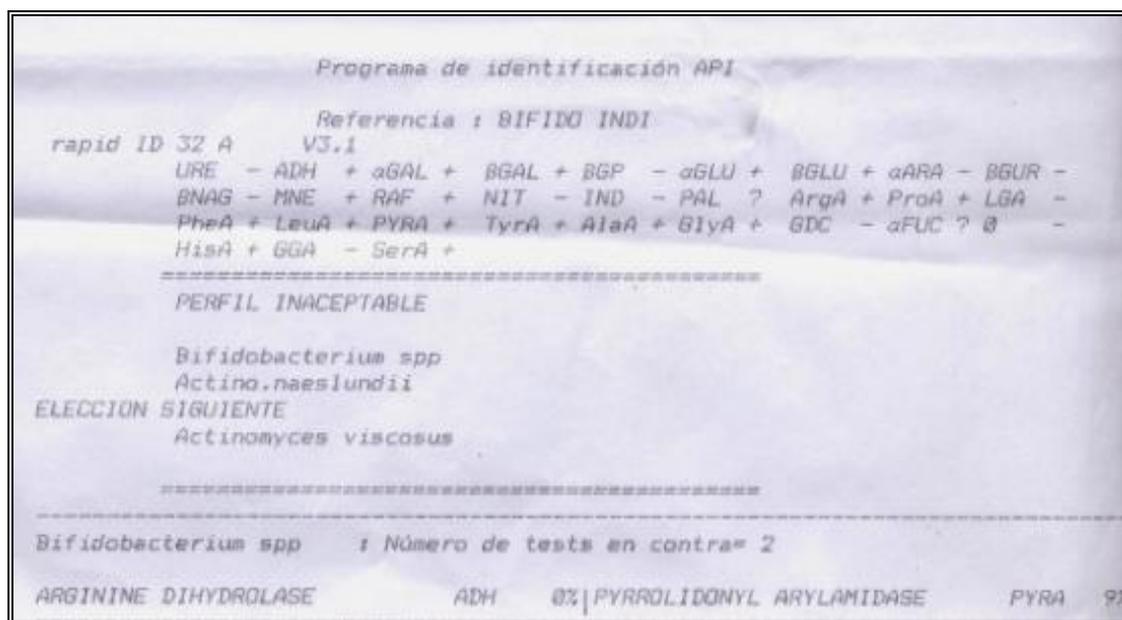


Figura 20: Registro fotográfico de los resultados de las pruebas automatizadas Rapid ID 32 A indicando al genero *Bifidobacterium* como primera opción de identificación.

7.4 Comparación del crecimiento en los medios MRS y RCA.

Para la comparación del crecimiento en los medios de cultivo reportados como selectivos para este género, se realizaron los cálculos del título bacteriano una vez identificada las colonias. Se analizaron cuatro muestras de cada uno de los yogures y se realizaron siembras en profundidad, tanto en placas como en tubos Miller-Pricket, con ambos medios por triplicado, para verificar cual de los dos medios y cual tipo de siembra son más efectivos para el crecimiento de este microorganismo.

Para cada caso de los valores obtenidos se realizó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA multivariantes) para verificar si realmente esas diferencias marcadas entre los medios y los tipos de siembra, representaban una diferencia significativa. Los cálculos se realizaron con el programa computarizado Statgraphics Plus versión XV15. Los valores obtenidos revelan que realmente existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) de los títulos bacterianos obtenidos con respecto a los medios utilizados y el método de siembra con un 95 % de confianza. En la **Tabla 14** se muestra el promedio de cada uno de los valores obtenidos en esta experiencia.

Tabla 14: Títulos bacterianos de cepas de bifidobacterias obtenidos en cada medio utilizado y con dos metodologías de siembra.

Tipo de siembra en profundidad	Medio de cultivo utilizado	Marca de yogurt	Título bacteriano (ufc/ml) *
Placa	MRS	BIO	$5,70 \times 10^7$ A
Tubo Miller-Pricket	MRS	BIO	$7,37 \times 10^7$ B
Placa	RCA	BIO	$9,08 \times 10^6$ C
Tubo Miller-Pricket	RCA	BIO	$2,93 \times 10^7$ D
Placa	MRS	Yogurtin	$3,02 \times 10^5$ a
Tubo Miller-Pricket	MRS	Yogurtin	$4,40 \times 10^5$ b
Placa	RCA	Yogurtin	$1,04 \times 10^5$ c
Tubo Miller-Pricket	RCA	Yogurtin	$2,48 \times 10^5$ d

* Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En las **figuras 21 y 22** se grafican los resultados obtenidos de dicha experiencia con el yogurt “Bio” y “Yogurtin”, respectivamente. En ambos gráficos se observa una tendencia marcada que nos permite afirmar que el medio MRS suplementado (Agar Man Rogosa Sharpe), tanto en la siembra por profundidad en placas como en tubos, permite un mejor crecimiento de las bifidobacterias, en comparación con el medio RCA (Reinforced Clostridium Agar). Otra tendencia que se logra observar en ambas gráficas, es que el microorganismo se recupera mejor (por los mayores títulos obtenidos) cuando se cultiva en tubos Miller-Pricket que cuando se siembra en placas de petri.

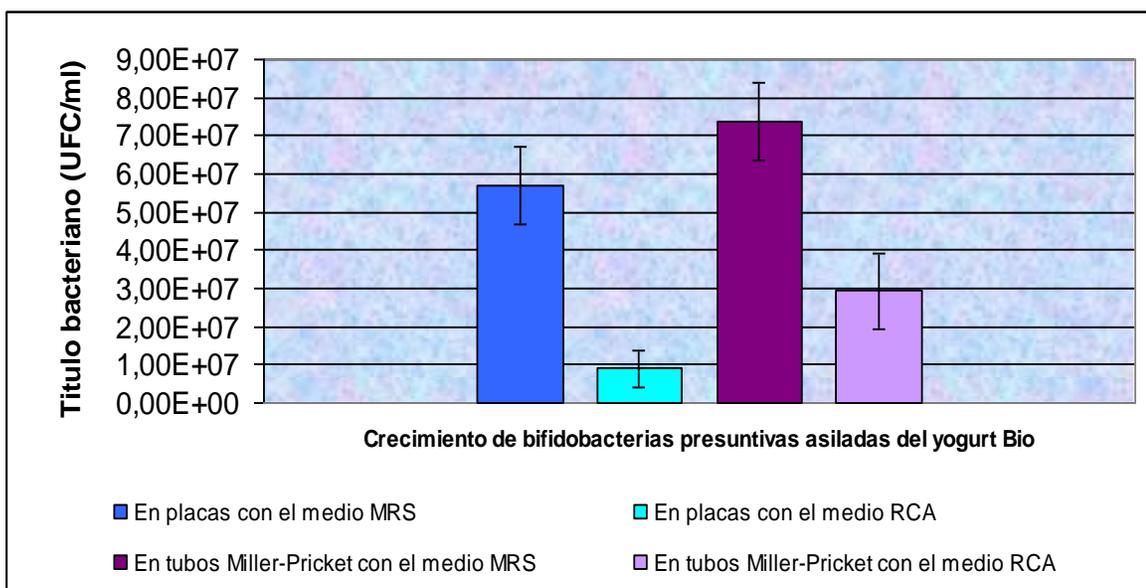


Figura 21: Comparación del crecimiento de bifidobacterias presuntivas aisladas de yogurt "Bio", en dos medios de cultivo (Man Rogosa Sharpe: MRS ó Reinforced Clostridium Agar: RCA), en placas o en tubos cara plana Miller-Prickett

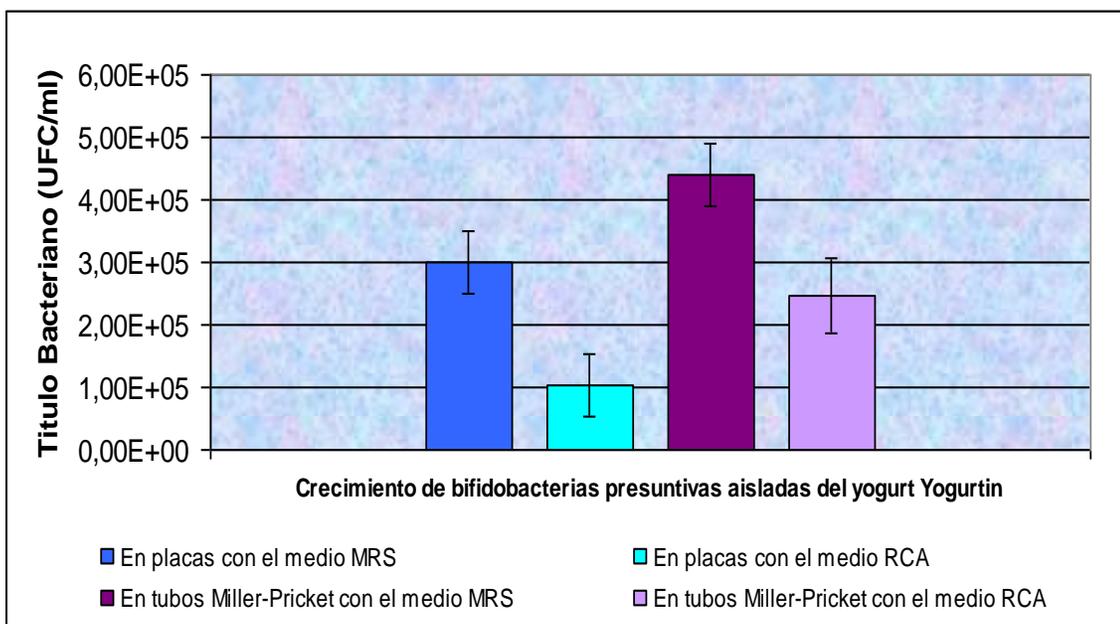


Figura 22: Comparación del crecimiento de bifidobacterias presuntivas aisladas de yogurt "yogurtin", en dos medios de cultivo (Man Rogosa Sharpe: MRS ó Reinforced Clostridium Agar: RCA), en placas o en tubos cara plana Miller-Prickett

7.5 Aislamiento del DNA.

A todas las cepas identificadas microbiológicamente como pertenecientes al género *Bifidobacterium*, se les purificó el ADN, siguiendo los métodos descritos en el apartado de materiales y métodos. Se encontró que el método de Levesque y col. (2005) generó valores de concentración de ADN menores que los obtenidos por el método de Gomes y col. (1999). En la **Figura 23** se muestran el registro fotográfico de la corrida electroforética de algunas de las muestras purificadas, igualmente se aprecia que el método de Levesque generó un menor rendimiento. Por los valores obtenidos se decidió solo utilizar el método de Gomes, para la extracción de las otras muestras aisladas de los yogures.

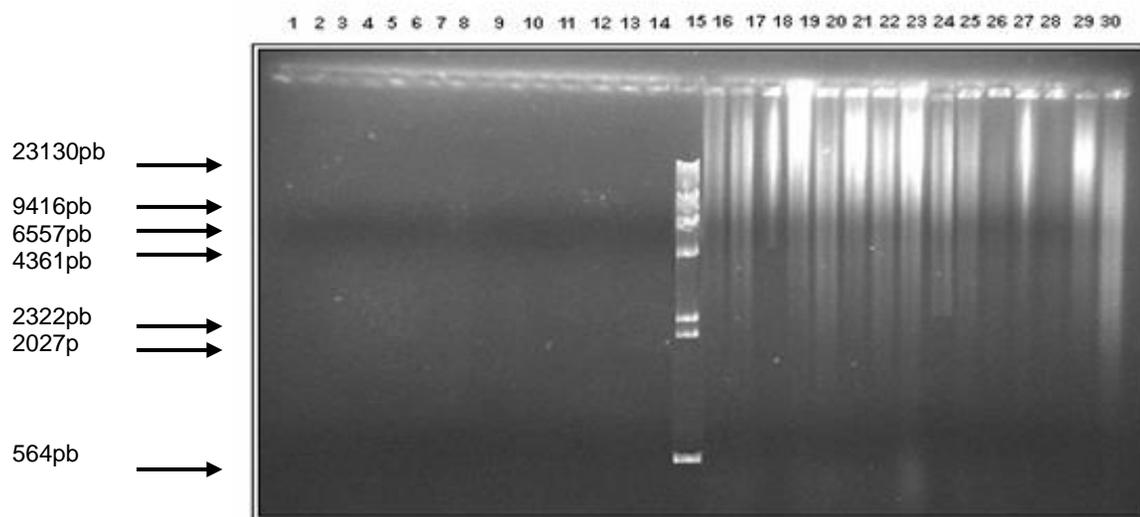


Figura 23: Registro fotográfico de la corrida electroforética de ADN total de cepas de bifidobacterias aisladas de dos yogures comerciales utilizando dos metodologías de extracción. **Carril 15:** Marcador λ DNA-Hind III. **Muestras extraídas de acuerdo a Levesque y col. (1995)** (Carril1: 8Bio ;Carril 2: 6Bio;Carril 3: 8Yog; Carril 4: 10Yog ;Carril 5: 25Bio ; Carril 6: 5Bio ; Carril 7: 9Yog ; Carril 8: 7Yog; Carril 9: 27Bio; Carril 10: 18 Bio; Carril 11: 12Bio; Carril 12: 4Bio; Carril 13: 2Yog ; Carril 14: CVCM); **Muestras extraídas de acuerdo a Gomes (1999)** (Carril 16: 8Bio; Carril17: 6Bio; Carril 18: 8Yog; Carril19: 10Yog; Carril 20: 25Bio ; Carril 21: 5Bio; Carril22: 9Yog ; Carril 23: 7Yog; Carril 24: 27Bio;Carril 25: 18 Bio ; Carril 26: 12Bio; Carril 27: 4Bio ; Carril 28: 2Yog; Carril 29: CVCM; Carril 30:6YOG .

La **Tabla 15** presenta los resultados de la concentración del ADN purificado espectrofotométricamente por el método de Gómez y col., (1999), que corroboró los resultados visualizados en el gel de electroforesis. La determinación espectrofotométrica para los aislados por el método de Levesque y col, (1995) no fue realizada, ya que dicho método de aislamiento genera gran cantidad de impurezas pues no posee etapas de purificación previa y dicha contaminación tiende a generar sobrestimación en las lecturas.

Tabla 15: Medición espectrofotométrica de la concentración de ADN de cepas aisladas de dos marcas comerciales de productos tipo yogurt (Bio y Yogurtin), identificadas microbiológicamente como pertenecientes al género *Bifidobacterium*, extraído por el método de Gomes y col., (1999)

Muestra	Abs 260/280nm	Abs 260/230nm	Concentración de ADN (µg/ml)	Muestra	Abs 260/280nm	Abs 260/230nm	Concentración de ADN (µg/ml)
1 Bio	1,40	0,77	773,8	21 Bio	1,32	0,75	878,1
2 Bio	1,48	0,91	1051,4	22 Bio	1,38	0,73	705,3
3 Bio	1,36	0,75	690,2	23 Bio	1,46	0,77	703,6
4 Bio	1,56	1,21	1533,7	24 Bio	1,60	1,30	2325,0
5 Bio	1,42	0,81	859,8	25 Bio	1,51	0,96	1189,5
6 Bio	1,54	0,85	832,0	26 Bio	1,53	0,88	970,8
7 Bio	1,40	1,02	1619,6	27 Bio	1,44	1,00	1525,7
8 Bio	1,21	0,57	567,5	<i>B. lactis</i> (CVCM)	1,25	0,56	486,6
9 Bio	1,68	1,27	2092,5	1 Yogurtin	1,90	1,57	3171,9
10 Bio	1,66	0,16	1620,9	2 Yogurtin	1,38	0,88	1139,2
11 Bio	1,43	0,92	1336,0	3 Yogurtin	1,27	0,54	464,2
12 Bio	1,57	0,90	933,2	4 Yogurtin	1,28	0,51	824,1
13 Bio	1,42	0,74	749,2	5 Yogurtin	1,44	0,85	929,4
14 Bio	1,41	0,83	861,8	6 Yogurtin	1,83	1,62	3650,8
15 Bio	1,55	1,02	1575,1	7 Yogurtin	1,54	0,93	1002,1
16 Bio	1,52	0,91	1052,3	8 Yogurtin	1,41	0,82	787,6
17 Bio	1,51	0,93	1027,9	9 Yogurtin	1,56	0,97	1146,3
18 Bio	1,41	0,87	1145,6	10Yogurtin	1,36	0,95	1455,7
19 Bio	1,33	1,13	3144,7	11Yogurtin	1,46	0,94	1298,4
20 Bio	1,59	1,05	1245,8				

7.6 Evaluación de la calidad del ADN extraído mediante PCR-16S.

La amplificación de un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S se realizó a fin de comprobar la presencia e integridad del ADN genómico de las muestras aisladas. Los resultados se muestran en las Figuras 24, 25 y 26. Se observaron los productos de amplificación de 150 pb aproximadamente para las 39 muestras y un fragmento de 996pb observado únicamente en el control positivo (Carril10, 16 y 19 respectivamente). Sin embargo la amplificación del segmento de 150pb comprobó la integridad del ADN genómico aislado y se garantizó de esta forma, que puede ser utilizado para las otras reacciones de PCR que se aplicaron en el estudio.

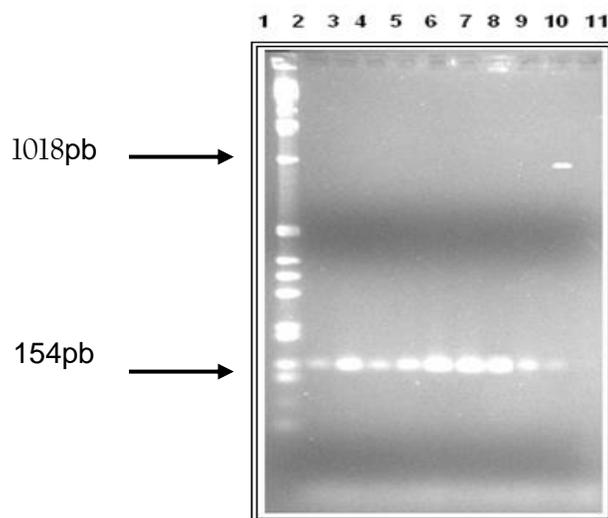


Figura 24: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder; **Carril 2:** 14Bio; **Carril 3:** 15Bio; **Carril 4:** 2Bio; **Carril 5:** 21Bio; **Carril 6:** 4Yog; **Carril 7:** 9Yog; **Carril 8:** 10Yog; **Carril 9:** 11Yog; **Carril 10:** *E.coli* J-62; **Carril 11:** Control negativo.

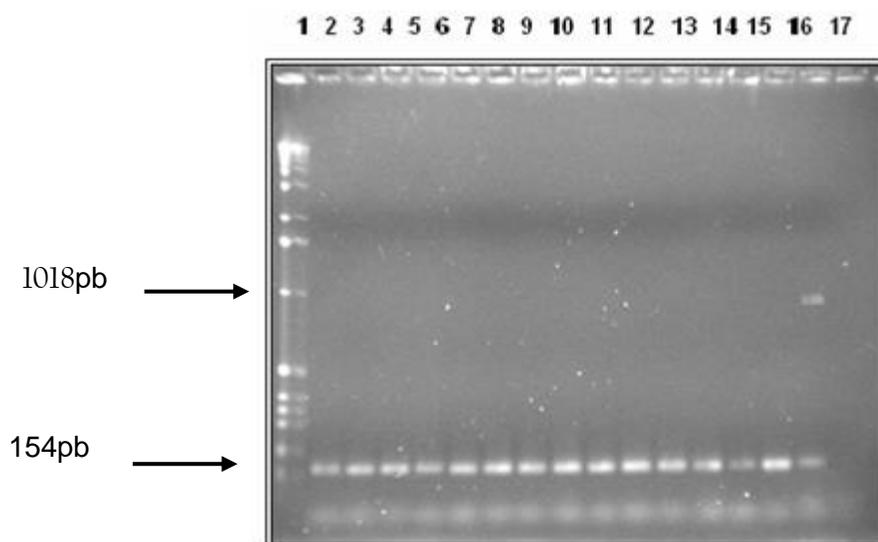


Figura 25: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder; **Carril 2:** 2Yog; **Carril 3:** 5Yog; **Carril 4:** 9Bio; **Carril 5:** 6Yog; **Carril 6:** 13bio; **Carril 7:** 10Bio; **Carril 8:** *B. Lactis* CVCM; **Carril 9:** 22Bio; **Carril 10:** 16Bio; **Carril 11:** 17Bio; **Carril 12:** 20Bio; **Carril 13:** 1Yog; **Carril 14:** 24Bio; **Carril 15:** 19Bio; **Carril 16:** *E.coli* J-62; **Carril 17:** Control negativo.

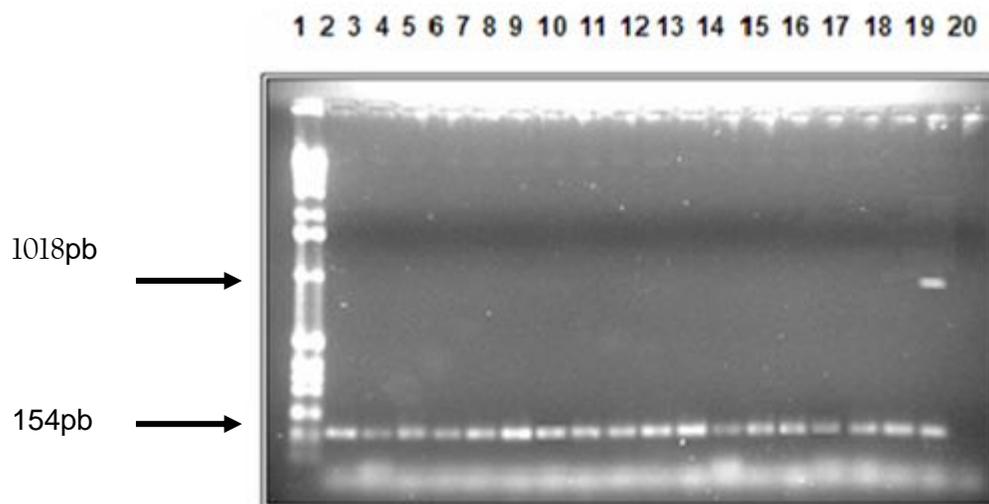


Figura 26: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder; **Carril 2:** 3Bio; **Carril 3:** 18Bio; **Carril 4:** 6Bio; **Carril 5:** 8Bio; **Carril 6:** 1Bio; **Carril 7:** 7Bio; **Carril 8:** 3Yog; **Carril 9:** 12Bio; **Carril 10:** 27Bio; **Carril 11:** 4Bio; **Carril 12:** 23Bio; **Carril 13:** 26Bio; **Carril 14:** 9Yog; **Carril 15:** 5Bio; **Carril 16:** 8Yog; **Carril 17:** 11Bio; **Carril 18:** 25Bio; **Carril 19:** *E.coli* J-62; **Carril 20:** Control negativo.

Sin embargo, ya que solo se observó la banda de 996pb en la cepa utilizada como control positivo “*E.coli* J-62”, y no en las cepas analizadas, se decidió repetir a modo de prueba la reacción de PCR utilizando la polimerasa *Pfu* aislada, de la bacteria *Pyrococcus furiosus*, la cual posee una tasa de error mucho menor y es mucho mas específica y fiable, con las mismas condiciones de reacción mencionadas en la metodología. La reacción de amplificación de la subunidad ribosomal generó los patrones esperados de 996pb y 150pb (**Figura 27**). Con estos resultados pudimos comprobar que la extracción de ADN por el método de Gomes y col., (1999) fue realizada eficientemente.

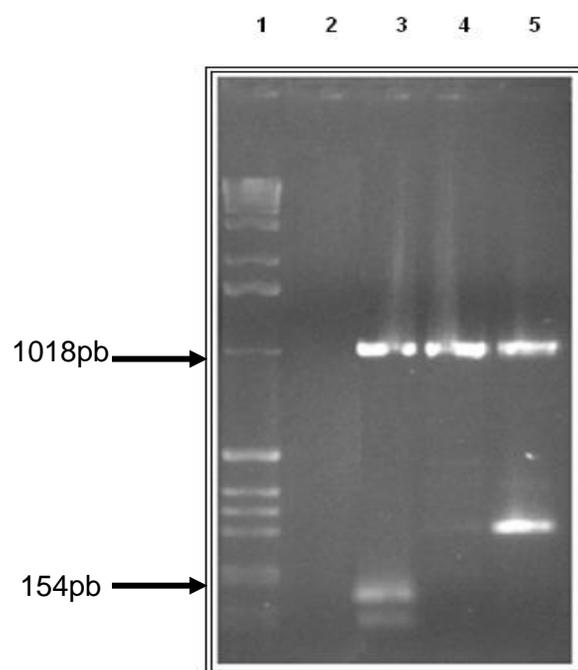


Figura 27: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR obtenido para la amplificación del gen 16S en cepas de bifidobacterias usando la polimerasa *Pfu*. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder; **Carril 2:** Control negativo; **carril 3:** 10Bio; **Carril 4:** 5yog; **Carril 5:** *E.coli* J-62.

7.7 Amplificación de las secuencias repetidas ERIC Y REP en las cepas de Bifidobacterias aisladas de productos lácteos tipo yogurt.

Las secuencias repetidas ERIC y REP han sido descritas en los genomas de una amplia diversidad de géneros bacterianos. Las distancias entre estos segmentos repetidos y las variaciones en el número de repeticiones es lo que ha permitido utilizarlas para determinar las relaciones evolutivas entre diferentes aislados de una misma especie. La amplificación, utilizando PCR, de dichas secuencias es la más utilizada para la caracterización y la tipificación de diversos microorganismos.

7.7.1 ERIC-PCR.

En la **Figura 28** se muestra el producto de la amplificación de la reacción de ERIC-PCR, a la temperatura de hibridación de 38°C y a 72° de extensión. Estas condiciones han arrojado excelentes resultados en otros estudios para enterobacterias y otros microorganismos estudiados en el laboratorio (Rivas , 2006; Rivas y col., 2006; Machiste, 2007; Rivas y col.,2008) .

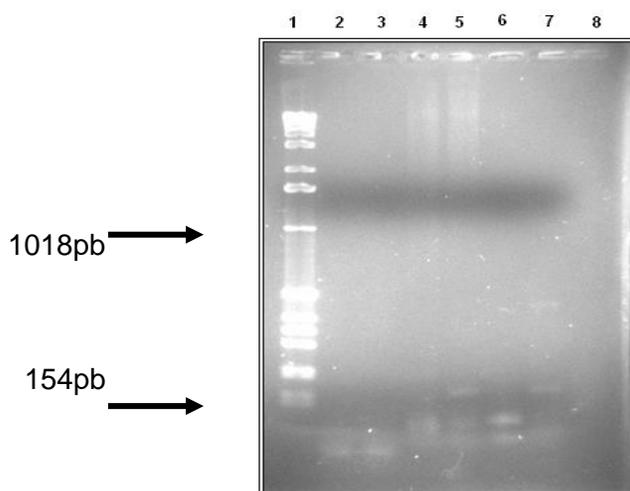


Figura 28: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR obtenido para cepas de bifidobacterias aisladas de productos comerciales, con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 38°C y 72°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen); **Carril 2:** 2Yog; **Carril 3:** 10Bio; **Carril 4:** *Pseudomonas aeruginosa*.; **Carril 5:** *Acinetobacter baumannii*; **Carril 6:** *Stenotrophomonas maltophilia*; **Carril 7:** *E.coli* J-62; **Carril 8:** Control negativo.

Estas condiciones no produjeron resultados satisfactorios para ninguna de las cepas empleadas, ya que dieron bandas muy tenues y menores de 250 pb para los controles colocados en la reacción de cepas de *Pseudomona aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomona maltophilia*, (Carriles 4-7), y no generaron ningún patrón para las dos cepas de estudio empleadas en los (Carriles 2 y 3). Se realizaron modificaciones de la reacción de PCR, aumentando la concentración de $MgCl_2$ hasta 3mM, según lo descrito por Ventura y col., (2003), donde los resultados obtenidos tampoco fueron satisfactorios (Figura 29).

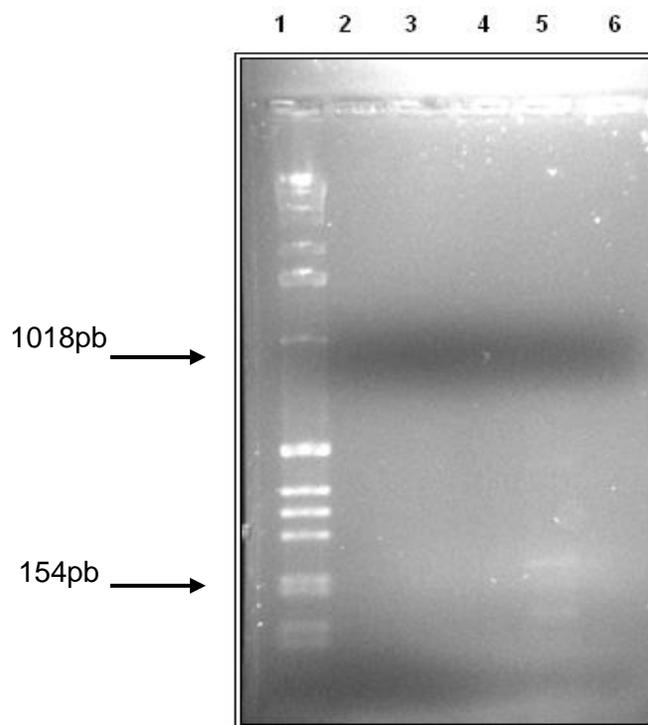


Figura 29: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenido con el uso de los iniciadores $ERIC_1$ y $ERIC_2$ a una temperatura de hibridación de 38°C y 72°C de extensión y 3mM de $MgCl_2$. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen); **Carril 2:** 2Yog; **Carril 3:** 10Bio; **Carril 4:** *B. Lactis* CVCM; **Carril 5:** *E.coli* J-62; **Carril 6:** Control negativo.

Se realizaron nuevos aislamientos de ADN, con el protocolo de Gomes, dejando crecer las bacterias por siete días en lugar de 3. Los resultados se muestran en la **Figura 30**, donde se observa un barrido (smear), el cual nos hizo pensar en un exceso de ADN de las muestras cargadas en el gel, por lo que se realizaron pruebas para estandarizarla cantidad de ADN sustrato de la reacción.

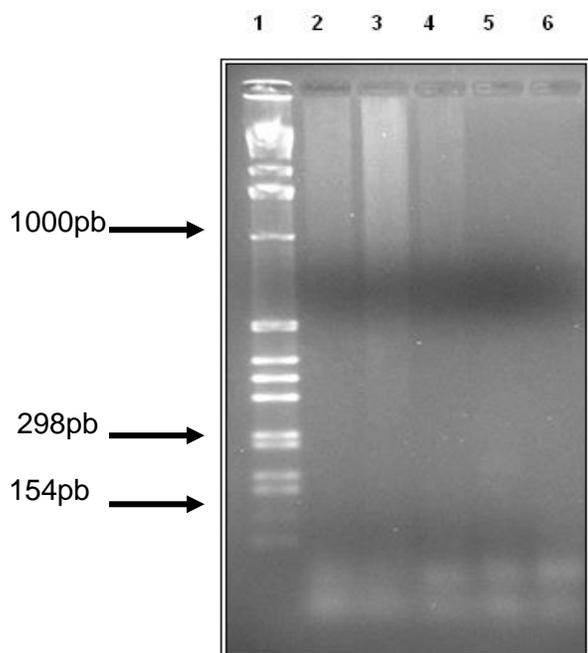


Figura 30: Registro fotográfico de la corrida electroforética del producto de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenido con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 38°C y 72°C de extensión y 3mM de MgCl₂ con aislados de 7días de crecimiento. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen); **Carril 2:** 2Yog; **Carril 3:** 10Bio; **Carril 4:** *B. Lactis* CVCM; **Carril 5:** *E.coli* J-62; **Carril 6:** Control negativo.

En la **Figura 31** se muestran los resultados de las pruebas de la estandarización de la cantidad de ADN sustrato en la mezcla de reacción de PCR. Se ensayaron con 0,5 y 1 µl de ADN de los extractos, excepto para el control positivo que se probó con 1 y 2 µl de ADN. Además se bajó la temperatura de hibridación a 36°C, a fin de determinar la temperatura más adecuada para las bifidobacterias.

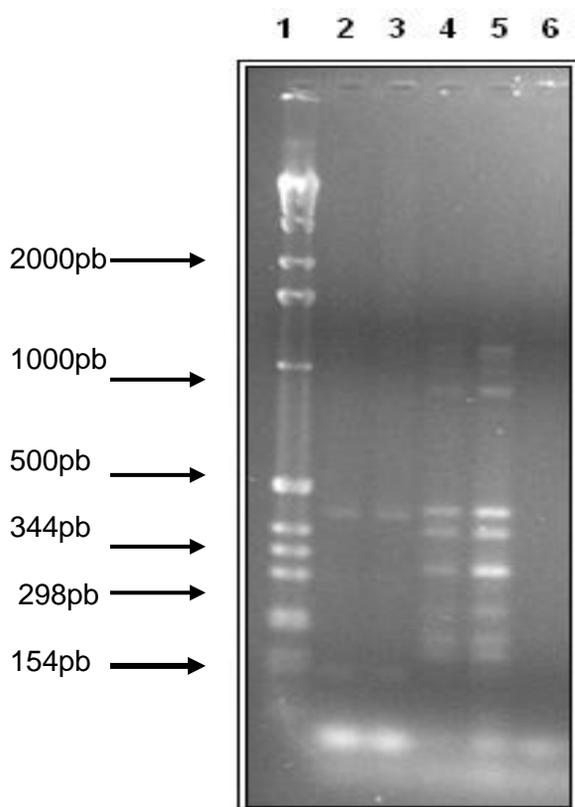


Figura 31: Registro fotográfico de la corrida electroforética para la estandarización de la cantidad de ADN obtenido de cepas de bifidobacterias provenientes de productos lácteos, con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y 72°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen); **Carril 2:** 10Bio con 1µl ; **Carril 3:** 10Bio con 0,5 µl; **Carril 4:** *E.coli* J-62 con 1µl; **Carril 5:** *E.coli* J-62 con 2µl; **Carril 6:** Control negativo.

El ERIC-PCR realizado con los extractos nuevos permitió visualizar unos patrones mucho mas fuertes, pudiendo concluir que para los extractos de las muestra aisladas de los yogures las mejores condiciones son crecimiento de siete días y la cantidad de ADN que debe ser tomada para la reacción de PCR es de 1µl, mientras que para el control positivo aislado por el método de Levesque y col., (1995) fue de 2µl como se menciona en el apartado 6.2.11 de materiales y métodos. Igualmente se determinó una temperatura de hibridación a 36°C, como óptima, a continuación se ensayaron dos reacciones de PCR cambiando las temperaturas de extensión a 68°C y 65°C (**Figura 32**).

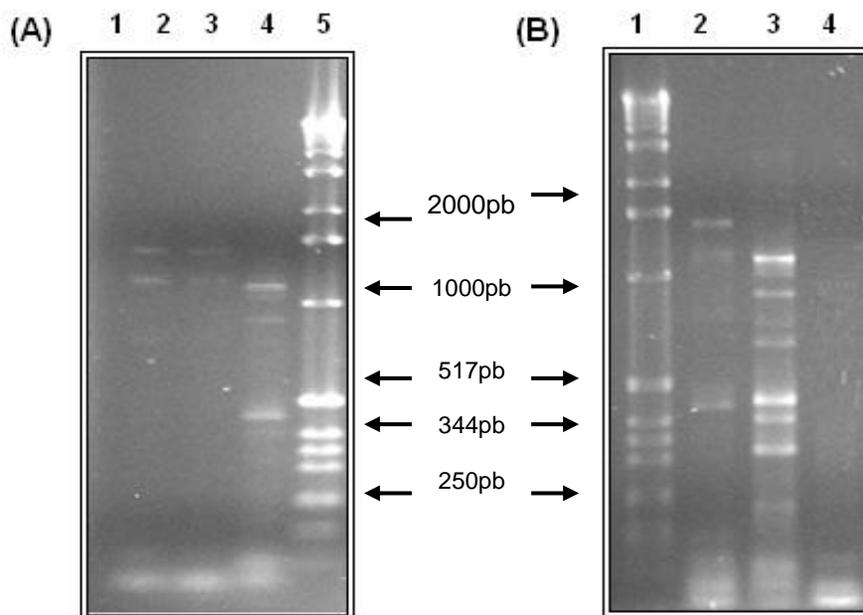


Figura 32: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenidos con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y diferentes temperaturas de extensión. **(A)** Temperatura de extensión a 65°C **Carril 1:** Control negativo; **Carril 2:** 8Yog ; **Carril 3:** 10Bio **Carril 4:** *E.coli* J-62; **Carril 5:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen). **(B)** Temperatura de extensión a 68°C. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (invitrogen); **Carril 2:** 8Yog ; **Carril 3:** *E.coli* J-62; **Carril 4:** Control negativo.

Estos resultados demuestran que para las cepas de bifidobacterias aisladas de los yogures, las condiciones mas adecuadas para la reacción de ERIC-PCR es de una temperatura de hibridación de 36°C y para la extensión de los iniciadores una temperatura de 68°C. Estas condiciones fueron utilizadas para la amplificación del resto de las muestras. Los resultados de dichos ensayos se muestran en las **Figuras 33 y 34.**

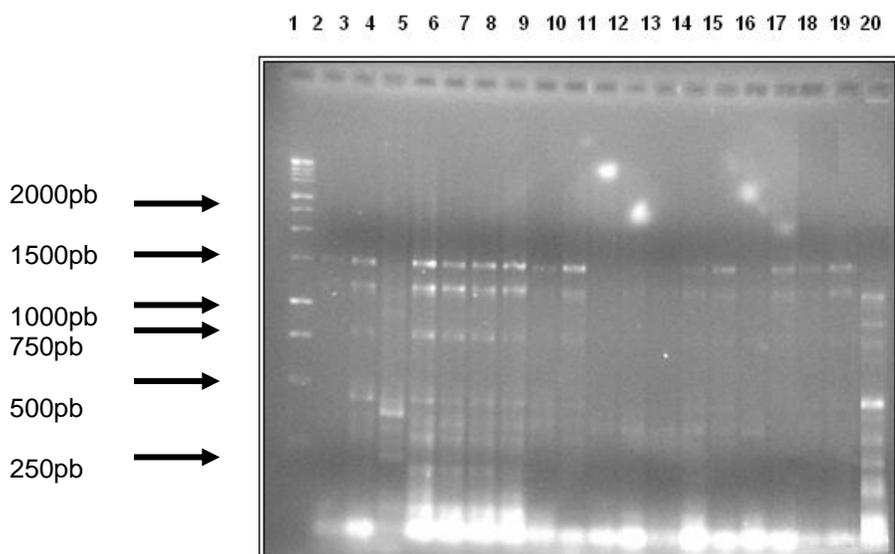


Figura 33: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y 68°C de extensión, a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** 23Bio; **Carril 3:** 8Yog; **Carril 4:** 22Bio; **Carril 5:** 19Bio; **Carril 6:** 11Bio; **Carril 7:** 4Bio; **Carril 8:** 5Bio; **Carril 9:** 17Bio; **Carril 10:** 4Yog; **Carril 11:** 5Yog; **Carril 12:** 21Bio; **Carril 13:** 12Bio; **Carril 14:** 1Bio; **Carril 15:** 2Bio; **Carril 16:** 14Bio; **Carril 17:** 3Bio; **Carril 18:** 3Yog; **Carril 19:** *B. Lactis* CVCM; **Carril 20:** *E.coli* J-62.

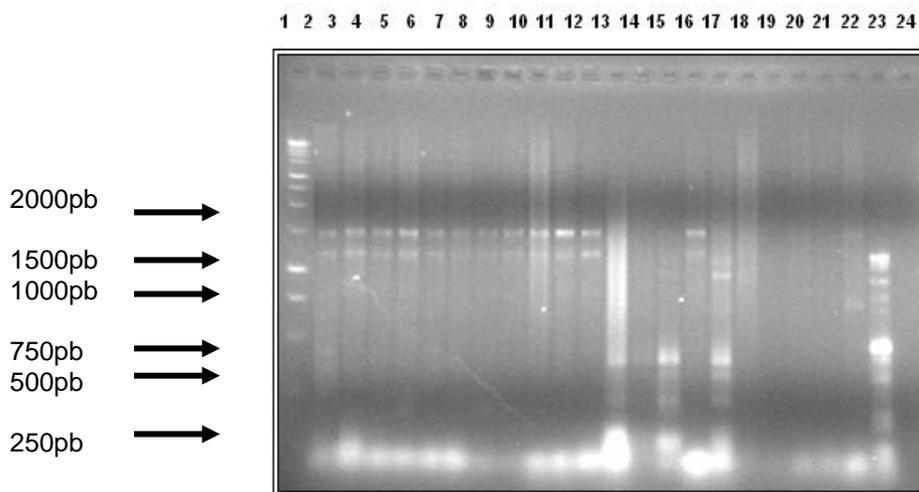


Figura 34: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂ a una temperatura de hibridación de 36°C y 68°C de extensión, a las cepas de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** 20Bio; **Carril 3:** 7Yog; **Carril 4:** 9Yog; **Carril 5:** 15Bio; **Carril 6:** 26Bio; **Carril 7:** 2Yog; **Carril 8:** 18Bio; **Carril 9:** 24Bio; **Carril 10:** 10Yog; **Carril 11:** 25Bio; **Carril 12:** 10Bio; **Carril 13:** 6Yog; **Carril 14:** 7Bio; **Carril 15:** 1Yog; **Carril 16:** 8Bio; **Carril 17:** 9Bio; **Carril 18:** 11Yog; **Carril 19:** 16Bio; **Carril 20:** 13Bio; **Carril 21:** 27Bio; **Carril 22:** 6Bio; **Carril 23:** *E.coli* J-62; **Carril 24:** Control negativo.

En ambas figuras se observan los patrones obtenidos para la reacción de ERIC-PCR obtenidas para las 38 muestras y la cepa control *B. lactis*. Los patrones generados en su mayoría presentan más 7 bandas y poseen variaciones en el tamaño que oscilan de las 1500pb y las 100pb aproximadamente. Además se pueden observar que en ambas figuras los patrones obtenidos en su mayoría se repiten (Patrón “A”) a excepción de cuatro cepas, la 22Bio mostrada en el carril 4 de la **Figura 33** y las 6Yog, 7Bio y 1Yog mostradas en los carriles 13, 14 y 15 de la **Figura 34** (Patrón “B”).

7.7.2 REP-PCR.

Para la reacción de REP-PCR se realizó una prueba con las mismas condiciones de temperatura que arrojaron resultados satisfactorios para el ERIC-PCR. Los resultados se muestran en la **Figura 35**.

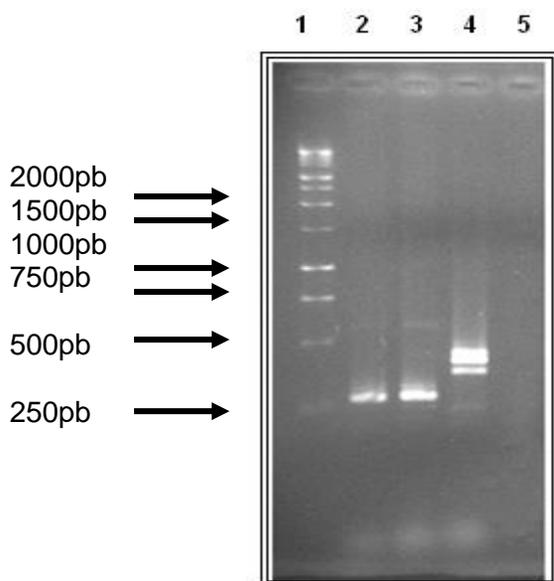


Figura 35: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenidos con el uso del iniciador REP₁ a una temperatura de hibridación de 36°C y 68°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** *B. lactis* CVCM; **Carril 3:** 3Yog; **Carril 4:** *E.coli* J-62; **Carril 5:** Control negativo.

Se observa el patrón obtenido para las muestras aisladas de ambos yogures, el cual consta de una banda intensa de 250pb y otra muy débil de 600pb aproximadamente, por lo que se decidió modificar las condiciones bajando la temperatura de extensión de los iniciadores a 65°C, condición que ya se había estandarizado en el laboratorio y dejar la temperatura de hibridación en 36°C.

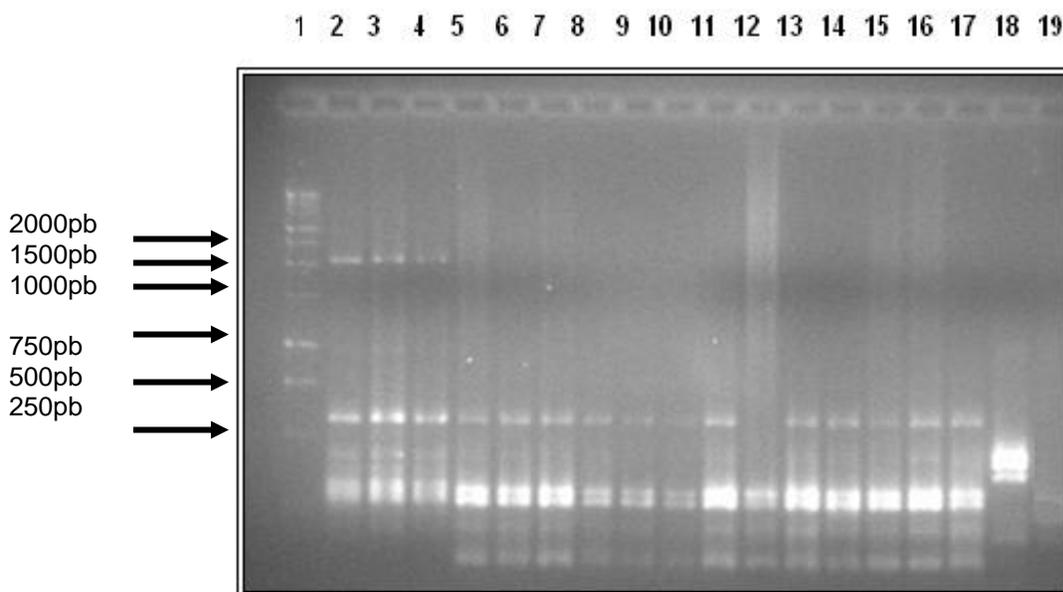


Figura 36: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR aplicado al ADN de bifidobacterias aisladas de dos productos comerciales tipo yogurt, obtenidos con el uso del iniciador REP₁ a una temperatura de hibridación de 36°C y 65°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** 25Bio; **Carril 3:** *B. Lactis* CVCM; **Carril 4:** 3Yog; **Carril 5:** 6Bio; **Carril 6:** 11Yog ; **Carril 7:** 4Bio; **Carril 8:** 23Bio; **Carril 9:** 7Yog; **Carril 10:** 2Yog; **Carril 11:** 19Bio; **Carril 12:** 17Bio; **Carril 13:** 11Bio ; **Carril 14:** 20Bio; **Carril 15:** 16Bio; **Carril 16:** 2Bio; **Carril 17:** 5Bio; **Carril 18:** *E.coli* J-62; **Carril 19:** Control negativo.

En la **Figura 36** se muestran los resultados de dicha modificación y como se evidencia en la figura, resultó ser adecuada para obtener variación en los patrones de banda, obteniendo fragmentos que oscilan en tamaño entre los 100 y 1500pb aproximadamente. Los resultados de resto de las cepas se muestran en la **Figura 37**.

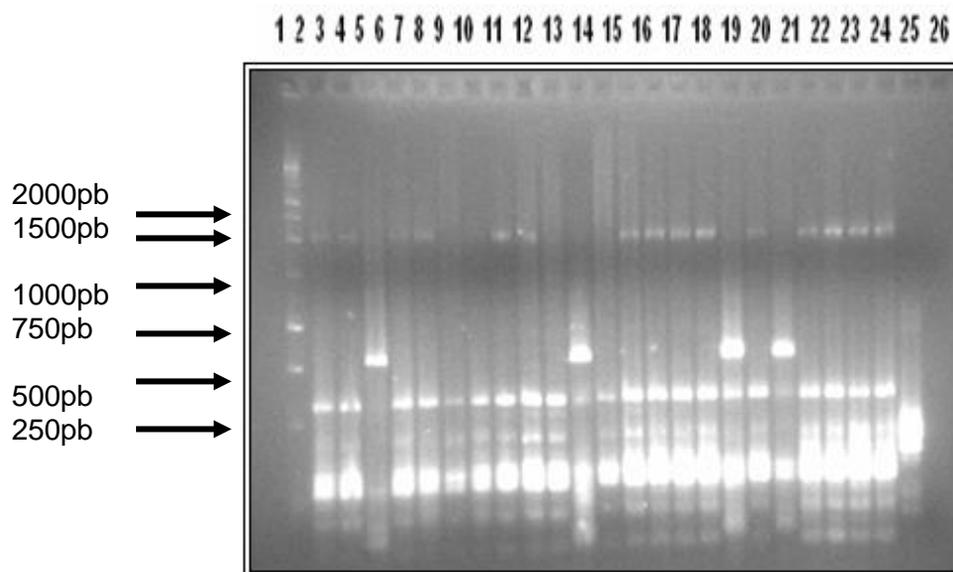


Figura 37: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR obtenidos para las cepas de bifidobacterias aisladas de productos comerciales tipo yogurt, con el uso del iniciador REP₁ a una temperatura de hibridación de 36°C y 65°C de extensión. **Carril 1:** 1Kb DNA Ladder (Promega); **Carril 2:** 3Bio; **Carril 3:** 10Yog; **Carril 4:** 22Bio; **Carril 5:** 9Bio; **Carril 6:** 8Bio ; **Carril 7:** 10Bio; **Carril 8:** 9Yog; **Carril 9:** 27Bio; **Carril 10:** 4Yog; **Carril 11:** 26Bio; **Carril 12:** 1Yog; **Carril 13:** 15Bio ; **Carril 14:** 24Bio; **Carril 15:** 1Bio; **Carril 16:** 12Bio; **Carril 17:** 21Bio; **Carril 18:** 6Yog; **Carril 19:** 14Bio; **Carril 20:** 7Bio; **Carril 21:** 18Bio; **Carril 22:** 13Bio; **Carril 23:** 8Yog; **Carril 24:** 5Yog; **Carril 25:** *E.coli* J-62; **Carril 26:** Control negativo.

Finalmente pudimos observar que la gran mayoría de los patrones, (denominados con la letra “A”), obtenidos por la reacción de REP-PCR las cepas aisladas de los yogures posee un patrón similar el cual se corresponde con la cepa *B. Lactis* usada como control positivo y que sólo cuatro cepas muestran nuevamente un patrón diferente como lo son 22Bio, 1Yog, 6Yog, 7Bio, mostradas en los carriles 4, 12, 18 y 20 respectivamente de la **Figura 37**, a dicho patrón se le denominó con la letra “B”. Donde dichas cepas también muestran un patrón diferente a las demás en los patrones de ERIC-PCR

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Desde hace mucho tiempo se conoce que la adición de algunos gérmenes vivos en ciertos productos, representa una manera de reconstituir la flora intestinal, ejerciendo algunas acciones a nivel del intestino que pueden incidir de forma favorable a la salud de las personas que ingieren estos alimentos, los cuales son conocidos como probióticos. El género *Bifidobacterium* esta formado por bacterias que tienen esos efectos beneficiosos en el humano y que se encuentran entre las más usadas recientemente en muchos países para el suplemento de productos alimenticios. Los beneficios para la salud constituyen uno de los temas que más han influido en la industria de alimentos en los últimos años, siendo ésta la razón por la cual los alimentos funcionales se han convertido en uno de los sectores más prometedores de la industria alimentaria.

En los últimos años a aumentado el interés por parte de la comunidad científica hacia el papel que estos microorganismos pueden desempeñar en el mantenimiento de la salud, tratamiento y prevención de enfermedades; y se han generado diversos estudios para mejorar el aislamiento, la identificación y la caracterización que permitan obtener mas información sobre este grupo bacteriano.

En este estudio se evaluaron diferentes métodos como técnicas para obtener resultados rápidos, en relación al aislamiento e identificación de las bifidobacterias en dos productos lácteos nacionales. Las colonias aisladas en nuestro estudio concuerdan con lo reportado por Scardovi (1986), de forma circular, elevación convexa y margen entero y colores blancos y beige. En la **Figura 14** de la sección de resultados se mostró el registro fotográfico de las mismas.

De las colonias aisladas de los yogures de las marcas comerciales estudiadas se obtuvieron cultivos bacterianos frescos, a los cuales se le realizaron diversas pruebas bioquímicas características del género (**Tablas 10 y 11**). En el caso de las muestras del yogurt “Bio” se obtuvo un 90% de cepas que concuerdan con este género bacteriano, mientras que para el caso de los aislados provenientes del yogurt “Yogurtin” solo se obtuvo 36,6%. Todos los aislados presentaban formas de bacilos bifurcados, según lo reportado por diversos autores.

El uso de medios sólidos (cuñas) es una forma conveniente, adecuada y segura para preservar las cepas aisladas, ya que se reoxigenan más lentamente. Los microorganismos durante su metabolismo en fase exponencial excretan al medio externo, ciertos metabolitos que permiten mantener bajo el potencial Redox del medio de crecimiento, ayudando así al crecimiento de microorganismos anaerobios como las bifidobacterias (Medina-Gutiérrez, 2002).

Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron verificados con pruebas de fermentación de diversos azúcares empleadas para diferenciar fenotípicamente especies y biotipos del género *Bifidobacterium* (Mitsuoka y Kaneuchi, 1977). Como se muestra en la **Figura 18**, el 100% de las cepas (38 colonias) fermentan la lactosa, la rafinosa, el manitol y la glucosa, el 92% fermenta sorbitol, y el 10,52% la ramnosa, y ninguna cepa posee capacidad alguna de fermentar el dulcitol.

A pesar que algunas colonias dieron positivas para la fermentación de la ramnosa, la cual naturalmente no puede ser utilizada por estos microorganismos, por no poseer la batería enzimática para ingresar estos sustratos a su metabolismo fermentativo, no fueron descartadas del estudio. Existen muchos factores que pueden hacer posible la fermentación de este tipo de carbohidratos, tales como las mutaciones que puedan presentarse en el genoma, o principalmente la presencia de elementos genéticos, como los plásmidos, los cuales se han reportado presentes en las bifidobacterias, y según la especie se han encontrado grandes variedades, otorgándoles diversas propiedades que hacen a las bacterias más versátiles para permanecer en el ambiente donde estas se desarrollan (Álvarez-Martín y col., 2007) .

Los elementos genéticos móviles pueden exhibir una amplia dispersión y un amplio espectro entre células bacterianas, contribuyendo a la plasticidad del genoma. Los análisis comparativos han revelado la complejidad de la genética plasmídica, la capacidad de estos elementos de replicarse autónomamente en células bacterianas permisivas y la presencia de genes claramente distintos a los típicamente encontrados en el cromosoma bacteriano (Sorensen y col., 2005).

Las características que pueden estar codificadas en los plásmidos se pueden dividir en 4 grupos según Kado (1998):

a. Funciones asociadas a resistencias a los agentes antimicrobianos, como antibióticos, bacteriófagos, bacteriocinas, metales.

b. Funciones asociadas a energía y metabolismo de compuestos diversos, como carbohidratos, aminoácidos, nucleasas, enzimas, entre otras funciones anabólicas y catabólicas.

c. Factores de virulencia, patogenicidad y simbiosis, tales como toxinas y factores de colonización.

d. Funciones asociadas a la diseminación y la perpetuación.

Con frecuencia, en una misma célula residen plásmidos diferentes, capaces de coexistir. Además, estos plásmidos no solo portan un gen de resistencia, sino que en muchos casos, pueden codificar diversas resistencias en uno mismo (Kado, 1998).

Estos determinantes genéticos favorecen la sobrevivencia de las bacterias que los portan en un ambiente adverso o le proporcionan una ventaja competitiva frente a otros microorganismos de la misma o diferentes especies, que comparten su nicho ecológico. Eventualmente, en ambientes con una alta presión selectiva, estos determinantes pueden convertirse indispensables para la viabilidad celular (Alonso y col., 2005; Narváez y col., 2005; Redondo y Alonso, 2007).

El análisis de los resultados señala que entre las 60 colonias de los dos yogures, 38 (63,33%) son cepas de bifidobacterias, dado que las pruebas bioquímicas y de fermentación concuerdan totalmente con lo esperado para el género estudiado. Estos resultados permiten afirmar la presencia de estas bacterias en los yogures nacionales analizados. Estos organismos están en esos productos en conjunto con otras bacterias, las cuales no fueron identificadas en este trabajo. Sin embargo, según los resultados obtenidos en las pruebas de fermentación de azúcares sólo fue posible llegar hasta nivel de género, por lo que en estudios posteriores se deberán realizar pruebas de fermentación con un mayor número de carbohidratos, como los señalados en la **Tabla 3** (sección de antecedentes), para obtener una identificación hasta nivel de especie.

En nuestro estudio se trató de implementar la identificación microbiológica mediante el uso de pruebas automatizadas. Se ensayo con la galería disponible (Rapad ID 32 para anaerobios). Al ser incubadas por el tiempo señalado, las lecturas realizadas en el equipo no arrojaron ningún perfil de identificación, a pesar que las lecturas son iguales a

las del género, a excepción de dos, que según el catálogo de identificación solo una no concuerda con el género y que no fue verificada por pruebas de microbiología tradicional.

Dado esos inconvenientes, decidimos aplicar de nuevo esta metodología pero incrementando el tiempo de exposición que era de 4 horas, hasta un tiempo de 24 horas de contacto del lisado de las células en las cápsulas con los medios deshidratados, y luego realizar el revelado. Al realizar de nuevo las lecturas, a pesar que el perfil seguía siendo dudoso, colocó al género *Bifidobacterium* como la primera opción de identificación, como se muestra en la **Figura 20**.

Estas variaciones pueden ser debidas a que el tiempo de lectura no esté bien ajustado para el desarrollo de las reacciones de este microorganismo, quizás debido a que este tipo de galerías fueron diseñadas para la identificación de cepas de interés clínico. Las cepas de nuestro estudio generalmente no son microorganismos causantes de patologías, lo que no la hace una cepa de interés clínico para la casa comercial y para la identificación rápida con este tipo de pruebas. Se recomienda para estudios posteriores el uso de un modelo diferente de prueba automatizada, y verificar si es posible la identificación de este microorganismo con el uso de estas pruebas rápidas. En estudios futuros se podrían diseñar galerías con pruebas adecuadas para bacterias de interés en la ciencia de los alimentos.

En cuanto al crecimiento obtenido en los medios selectivos, los resultados indican que las colonias aisladas de los yogures se desarrollan mejor en el medio MRS que el medio RCA, y además este crecimiento puede optimizarse si la siembra se realiza en los tubos caras planas (Miller - Pricket). Estos resultados fueron confirmados mediante los títulos bacterianos obtenidos para cada caso, lo cual se muestra de forma gráfica en la **Figura 21** y en la **Figura 22**. Son diversos los autores que han demostrado y utilizado para el aislamiento este medio, suplementado con HCl-cisteína y soluciones de antibióticos, y aseguran que así se generan las condiciones apropiadas para el desarrollo de este tipo de microorganismos, entre una diversidad de otros medios de cultivo (Dinakar y Mistri, 1994; Collins y Hall, 1984; Payne y col., 1999; Temmerman y col., 2003; Shah, 2000; Tharmaraj y Shah, 2003; Zamfir y col., 2006, Álvarez-Martín y col., 2007).

Los tubos Miller – Pricket resultaron ser sistemas bastante eficientes, ya que la forma plana de dichos tubos, unido a la doble capa de agar, mejoran las condiciones anaeróbicas y reductoras. Sin embargo, a pesar del excelente crecimiento que les ofrecen estos tubos a este tipo de microorganismos, tiende a ser muy complicados si lo que se busca es aislar el microorganismo. Esta metodología de siembra es recomendada para el recuento y enumeración. El aislamiento de los mismos es recomendable realizarlo del crecimiento en placas, a pesar que igualmente es complicada su extracción por las dos capas de agar, pero el deterioro que sufre el microorganismo es mucho menor al que sufre cuando se tratan de extraer de los tubos.

Otra información de interés que pudimos obtener con los valores de los títulos bacterianos, es si realmente estos productos pueden ser considerados probióticos. El yogurt Bio, el único que reporta ser un alimento probiótico, cumple con los requisitos necesarios de la cantidad de microorganismos que debe poseer en su composición para ser considerado un alimento funcional, el cual debe de ser de un valor mayor o igual a 1×10^6 ufc/g ó ml de producto (Kurman y Rasic, 1991; Shah, 2000, Corry y col., 2003). Nuestros resultados se encuentran por encima de dicho valor (**Tabla 14**). El yogurt Yogurtin demostró también poseer en su composición a este grupo de microorganismos de bifidobacterias, pero en una cantidad mucho menor. El promedio de los títulos bacterianos osciló entre valores de $1,04 \times 10^5$ a $4,40 \times 10^5$ ufc/ml, el cual es mucho menor al exigido para considerar un alimento como probiótico (**Tabla 14**).

Samona y Robinson (1991) señalan que para conferir beneficios para la salud a los humanos, el recuento viable de bifidobacterias en el momento del consumo debe ser de 10^6 UFC/g. Otro reporte señala que debe existir una población viable de bifidobacterias de 5 ciclos log UFC/g en el producto final, como el mínimo terapéutico para obtener los beneficios mencionados (Naidu y col., 1999).

Para complementar los estudios microbiológicos, en este trabajo decidimos comenzar a implementar métodos moleculares de identificación. Actualmente, los métodos basados en la PCR se han convertido en una herramienta de incalculable valor para los estudios microbiológicos. Sus potencialidades como metodología están avaladas por su alta especificidad y sensibilidad.

La extracción de ADN se realizó mediante dos métodos. El primero utiliza una modificación de la técnica de Levesqué y col., (1995), el cual fue diseñado específicamente para el aislamiento de ADN de manera rápida y sencilla. Por otro lado, utilizamos el método de Gomes y col., (1999), el cual a pesar de ser más laborioso, presentó excelentes resultados para otra serie de microorganismos de difícil crecimiento que han sido aislados en el laboratorio.

La evaluación de la cantidad y calidad de ADN inicialmente fue visualizada en geles de agarosa, ya que en estos se puede detectar cantidades de 10ng aproximadamente al estar tratados con bromuro de etidio.

En la **Figura 23** se pudo observar que la cantidad de ADN aislada por el método de Levesque y col. (1995), no pudo ser visualizada en el gel de agarosa, mientras que en los aislados realizados por el método de Gomes fue que pudimos observar la presencia del ADN a pesar de presentar un cierto grado de degradación. Estos resultados indican que el método de Gomes fue el que permitió concentrar y purificar mejor el ADN extraído de las muestras, mientras que en el caso de las muestras tratadas por el método de Levesque y col. (1995), el ADN pudo quedar diluido por los volúmenes utilizados, y bastante impuro evitando así su visualización en el gel. Según estos resultados se decidió evaluar el ADN extraído por el método de Gómez y col. (1999), mediante el uso del método espectrofotométrico (**Tabla 15**), donde los resultados nos permiten concluir que el ADN obtenido por dicho método realmente está en suficiente cantidad como para generar la reacción de PCR.

Dichos métodos espectrofotométricos no fueron probados con los aislados provenientes del método de Levesque y col. (1995), ya que al no visualizar el ADN en los geles de agarosa fue un indicio de que la cantidad de ADN obtenida por ese método no fue la suficiente, y dado que este método no posee etapas de purificación, es muy probable que las lecturas generaran una sobreestimación de la muestra, por lo que decidimos únicamente trabajar con los lisados obtenidos por Gómes y col. (1999).

En la literatura no existe un estudio comparativo que señale cual método de extracción de ADN sea el más adecuado para las bifidobacterias. Las metodologías reportadas en la bibliografía son sumamente variadas, y la gran mayoría utilizan estuches comerciales especializados para su aislamiento, o protocolos que incluyan etapas para la limpieza y purificación del ADN, utilizando lavados con cloroformo-fenol y centrifugaciones, similares a las del método de Gomes y col. (1999) utilizado en nuestro estudio. Nuestros resultados nos permiten sugerir este método para la purificación de ADN de aislados de bifidobacterias. Esta es una metodología no muy costosa, lo que permitiría su uso a nivel de control en la industria de alimentos.

La amplificación del ADN que codifica para la subunidad ribosomal pequeña 16S, mediante PCR, es una de las formas más apropiadas para verificar la calidad y cantidad del ADN extraído, basándonos en la hibridación específica de los iniciadores utilizados (Arnheim y Erlich, 1992). Además, estos resultados permiten reconocer el organismo dentro del dominio taxonómico bacteria.

Los ARN ribosomales están presentes en todos los microorganismos. En bacterias, el gen que codifica para la subunidad ARN-16S está altamente conservado y presenta muy pocas variaciones. Por estas razones, esta reacción fue utilizada en este trabajo para verificar la calidad e integridad del ADN extraído en todas las cepas aisladas que se desean analizar.

En las **Figuras 24, 25 y 26** se muestran los resultados preliminares generados por esta reacción de PCR. Para las cepas aisladas de los yogures solo se observa la banda correspondiente a las 150pb, a diferencia de la cepa control *E.coli*, que si amplificó la banda de las 996pb. Este resultado nos permitió sugerir que la cantidad o la calidad del ADN extraído era insuficiente. En la **Figura 27** se muestra una clara diferencia en la pureza obtenida en el aislamiento de ADN por el método de Gomes y col. (1999) con la polimerasa *Pfu*. No solamente se generaron ambos fragmentos de 150 y 996pb para las bifidobacterias, sino que además los amplificados generados poseían una mayor intensidad. Sin embargo, el estudio se siguió desarrollando con la *Taq* polimerasa, dado a que también generó los patrones de banda en la reacción del PCR-16S en las cepas de estudio, y además por ser mas económica, siempre en la búsqueda de un método fácil, no laborioso y económico para implementación de rutina.

Los estudios de genotipificación tienen entre sus objetivos establecer las relaciones clonales entre diferentes aislados de una misma especie bacteriana. Esta información permite detectar cepas que ocasionen brotes infecciosos en clínica, variaciones en aislados que pierden funciones metabólicas, entre otras (Rivas y col., 2006; Rivas y col., 2008).

Las regiones repetidas del genoma, como ERIC y REP entre otras, han sido utilizadas en los últimos tiempos para la discriminación y caracterización molecular de diferentes cepas y especies de Bifidobacterias tanto en productos alimenticios como en otros ambientes (Ventura y col., 2003; Ward y Roy, 2005; Masco y col., 2003; Briczinski y Roberts, 2006).

En la **Figuras 28, 29, 30, 31 y 32** se muestran los resultados de la estandarización para la obtención de los patrones generados con el uso de los iniciadores ERIC₁ y ERIC₂. Los mejores resultados se obtuvieron con una temperatura de hibridación de 36°C y una temperatura de extensión de 68°C y con un total de ADN en la reacción de 1µl. En las **Figuras 33 y 34** se muestran los patrones generados una vez encontradas dichas condiciones mencionadas. Al visualizar las corridas electroforéticas obtenidos por ERIC-PCR pareciera que hubiéramos encontrado más de dos patrones (**Figuras 33 y 34**). Sin embargo sólo cuatro cepas de las 38 poseen un patrón diferente al del control positivo *B. lactis* del CVCM. Los patrones se designaron como “A” (34 cepas de 38) y “B” (4 cepas de 38).

Estos resultados eran esperados, ya que a pesar que los aislados provienen de diferentes yogures, estos productos son de la misma casa comercial y seguramente dicha empresa utiliza una sola cepa de bifidobacterias en el preparado de los productos.

La **Figura 38** muestra los patrones de bandas obtenidos por Ventura y Zink, en el 2002, para cepas de *B. lactis* y *B. animalis*. En la **Figura 39** se muestra los patrones de bandas generados por diferentes cepas de referencia del género *Bifidobacterium* reportadas por Ventura y colaboradores, en el 2003. Estos patrones guardan concordancia con los obtenidos en el presente trabajo (**Figuras 33 y 34**), a pesar de no haber utilizado las mismas condiciones de amplificación que dichos autores (temperatura, calidad de ADN molde, enzima, etc). Al realizar la comparación de los perfiles se observa una mayor similitud en los tamaños de algunas bandas generadas en nuestro trabajo, con las cepas comerciales *B. lactis* DSM 10140 (Carril 1, **Figura 39**), que además coinciden con los patrones de variedades comerciales de *B. lactis* mostradas en la **Figura 38** (Carriles 1, 2, 3, 9, 10, 11). El patrón “A” obtenido por nosotros, que se repite en la mayoría (34 Cepas), posee un grado mayor de similitud que el patrón “B”, que fue generado por solo 4 de las cepas aisladas. Los tamaños de las bandas se muestran en la **Tabla 16**. Realizando la comparación de nuestros resultados con la literatura se observa que en ambos trabajos citados se obtuvieron bandas de hasta 1900pb aproximadamente. Estos valores no fueron obtenidos en este estudio, ya que las condiciones ensayadas en el laboratorio y la enzima utilizada fueron distintas, lo cual pudo crear las diferencias de los patrones obtenidos en nuestro estudio (**Tabla 16**).

Tabla 16: Comparación de los tamaños aproximados de los diferentes patrones obtenidos con otros patrones reportados en estudios de identificación molecular de bifidobacterias usando las secuencias ERIC.

Tamaño de los patrones de <i>B. lactis</i> (pb) (Ventura, 2003)	Patrón "A" obtenido en el estudio (pb)	Patrón "B" obtenido en el estudio (pb)
1857		
1783		
1709		
1635		
1598	1537	
1487		
	1377	
1265		1271
1228	1297	1191
1080		
969	845	
710		
	445	
340		312
		232
	152	179
		167

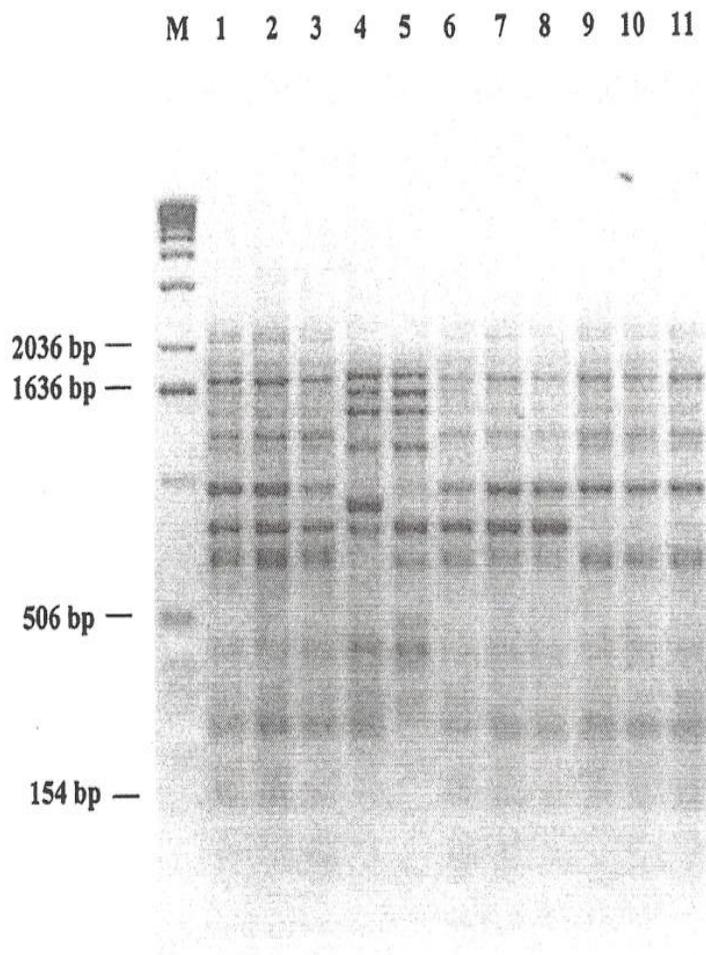


Figura 38: Análisis de los patrones de cepas *B. lactis* y *B. animalis* generados por ERIC-PCR. 239 **Carril M:** 1-kb DNA ladder (Gibco BRL); **Carril 1:** *B. lactis* DSM 10140; **Carril 2:** *B. lactis* NCC 363; **Carril3:** *B. lactis* NCC311; **Carril 4:** *B. animalis* ATCC 25527; **Carril 5:** *B. animalis* ATCC27672; **Carril 6:** *B. animalis* ATCC 27674; **Carril 7:** *B. animalis* ATCC 27536; **Carril 8:** *B. animalis* ATCC 27673; **Carril 9:** *B. lactis* NCC 383; **Carril 10:** *B. lactis* NCC 402; **Carril 11:** *B. lactis*. Tomado de Ventura y Zink (2002).



Figura 39: Patrones de cepas de referencia de diferentes especies de Bifidobacterias generados por ERIC-PCR. **Carril 1:** *B. lactis* DSM 10140; **Carril 2:** *B. animalis* ATCC 25527; **Carril3:** *B. pseudocatenulatum* DSM 20438; **Carril 4:** *B. catenulatum* ATCC 27539; **Carril 5:** *B. subtile* DSM 20096; **Carril 6:** *B. thermophilum* DSM 20212; **Carril 7:** *B. minumum* DSM 20102; **Carril 8:** *B. coryneforme* DSM 20216; **Carril9:** *B. angulatum* DSM 20098; **Carril 10:** *B. choerinum* ATCC 27686; **Carril 11:** *B. gallinarum* DSM 20670; **Carril12:** *B. boum* DSM 20432; **carril 13:** *B. mericycum* DSM 6492; **Carril 14:** *B. suis* ATCC 27533 **Carril 15:** *B. pullorum* DSM 20433; **Carril 16:** *B. pseudolongum* DSM 20099; **Carril 17:** *B. infantis* ATCC 15697; **Carril 18:** *B. bifidum* ATCC 29521; **Carril 19:** *B. breve* ATCC 15700; **Carril 20:** *B. cuniculi* ATCC 27916; **Carril 21:** *B. dentium* ATCC 27534; **Carril 22:** *B. asteroides* DSM 20089; **Carril 23:** *B. ruminantium* DSM 6489; **Carril 24:** *B. magnum* ATCC 27540; **Carril 25:** *B. adolescentis* ATCC 15703; **Carril26:** Control negativo; **Carril 27:** *B. longum* ATCC 15707; **Carril M:** 1-kb DNA ladder (Gibco BRL). **Tomado de Ventura y colaboradores (2003).**

Las posibles diferencias que podrían verse por la nitidez de la corrida en los patrones de ERIC-PCR para los aislados de Bifidobacterias fueron discernidos con los obtenidos con las reacciones de REP-PCR. Se obtuvieron patrones más definidos y con una mayor intensidad. Además, esta reacción no generó retardo en la estandarización a pesar que la temperatura de hibridación para dicha reacción puede ser bastante variable (Masco y col., 2003).

Los resultados de la genotipificación, tanto por REP como por ERIC PCR, permiten afirmar que 34 de los 38 aislados generaron patrones que permiten agrupar los aislados como clones indistinguibles y estrechamente relacionados, a diferencia de las cuatro cepas que presentaban el patrón designado como “B” (22Bio, 1Yog, 6Yog, 7Bio). A pesar de estas diferencias, ambos patrones poseen cierta similitud con los reportados por Ventura y col., (2003), para las cepas comerciales de *B. lactis*.

En Venezuela no se han desarrollado estudios de identificación y caracterización molecular de este tipo de microorganismos que son de interés en la industria alimentaria. Este estudio representa el primer trabajo que demuestra que las técnicas moleculares basadas en secuencias repetidas ERIC y REP son una clave para la detección y caracterización microbiológicas de especies de bifidobacterias de una forma rápida, sin descartar los métodos tradicionales de identificación. Sin embargo, el poder discriminatorio es altísimo ya que por los estudios microbiológicos los 38 aislados parecieran ser indistinguibles y por los resultados moleculares se aprecian dos cepas genotípicamente diferentes. Nuestro estudio establece las condiciones de investigar y mejorar las técnicas del aislamiento e identificación de este tipo de microorganismos probióticos, para incrementar su uso por parte de la industria alimentaria y farmacéutica, así como permitir mantener un control para corroborar la existencia de estos productos probióticos y la calidad de las cepas utilizadas en el país. Igualmente este estudio puede abrir caminos a otros campos de la ciencia, que generen estudios basados en modificaciones genéticas que mejoren los efectos de este tipo de microorganismos, o permitir el seguimiento molecular de dichos efectos una vez establecidas estas cepas en el tracto gastrointestinal.

9. CONCLUSIONES

1. El medio de cultivo MRS con adición de HCL-cisteína y una solución de antibióticos, constituye un medio selectivo apropiado para el crecimiento de las bifidobacterias proveniente de los productos lácteos tipo yogurt analizados.
2. Los títulos bacterianos obtenidos de los productos lácteos analizados arrojaron resultados superiores en el medio MRS suplementado que en el medio RCA.
3. La siembra en doble capa en tubos Miller -Pricket resultó más eficiente que la siembra en doble capa en placas para las cepas de bifidobacterias provenientes de los productos lácteos tipo yogurt analizados, con el sistemas anaerobio utilizado.
4. Las pruebas microbiológicas tradicionales permitieron la identificación de todas las cepas aisladas, hasta el nivel de género *Bifidobacterium*
5. Los resultados de la galería automatizada API concuerdan con las pruebas microbiológicas implementadas, a pesar de no arrojar perfiles de identificación. Se recomienda la aplicación de otro estuche comercial para corroborar la identificación.
6. El método de Gomes y col. (1999) resultó el más eficiente para el aislamiento de ADN de bifidobacterias.
7. Los patrones de banda generados por ERIC-PCR en nuestro estudio presentan cierta similitud con la cepa *B. lactis* según lo reportado en la literatura.
8. Los patrones de REP-PCR permitieron agrupar 34 de las cepas aisladas como clones indistinguibles.
9. El uso conjunto de las técnicas microbiológicas y moleculares representan una herramienta fundamental para los estudios a estos microorganismos de interés para la industria alimentaria.

10. RECOMENDACIONES.

1. Se deben utilizar una mayor cantidad de carbohidratos diferentes en las pruebas de fermentaciones, para obtener una identificación hasta el nivel de especie.
2. Para ratificar los resultados de la identificación microbiológica se recomienda realizar la detección de la enzima Fructosa-6 fosfato-fosfocetolasa (F6PPK), usada tradicionalmente para asegurar la correcta identificación de bifidobacterias.
3. Dado a que la galerías Rapid ID 32 no generó un perfil aceptable de identificación, se recomienda utilizar en conjunto con la galería 50CHL recomendada por varios autores
4. Se recomienda la implementación de otra reacción de PCR con iniciadores específicos para el género de estudio.
5. Este tipo de microorganismos augura un futuro promisorio desde el punto de vista médico. Se espera que este trabajo sea retomado en busca de nuevas respuestas que permitan aportar información necesaria en el campo del uso e identificación de microorganismos con propiedades probióticas, como las bifidobacterias, y mejorar de esta forma su implementación en gran variedad de productos alimenticios y farmacéuticos en nuestro país.

11. BIBLIOGRAFÍA:

1. Alonso, G., Malaver E., Guzmán, M. y Rodríguez-Lemoine V. (2005). **Caracterización de plásmidos e integrones presentes en bacterias multi-resistentes aisladas en diferentes ambientes de Venezuela.** Memorias del Instituto de Biología Experimental.
2. Álvarez- Martin P., Bélen A., Mayo B. (2007). **Screening for plasmids among human bifidobacteria species: Sequencing and analysis of pBC1 from *Bifidobacterium catenulatum* L48.** Plasmid. 57: 165-174.
3. Amores R., Calvo A., Maestre J.R.y Martínez- Hernández D. (2004). **Probióticos.** Revista Española de Quimioterapia. 17 (2): 131-139
4. APHA (1992). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Third edition. American public health Ass. U.S.A
5. Araki T., Shinozaki T., Irie Y., Miyazawa Y. (1999). **Trial of oral administration of *Bifidobacterium breve* for the prevention of rotavirus infection.** Japan Journal Association Infectious Diseases. 73: 305-310.
6. Arnheim N., Erlich E. (1992). **Polimerase chain reaction strategy.** Annual Reviews Biochemistry. 61: 131-156.
7. Arany C., Hackney C., Duncan S., Kator H., Webster J., Pierson M., Boling J., Eigel W. (1995). **Improved recovery of stressed *Bifidobacterium sp.* from water and frozen yogurt.** Journal of Food Protection. 58 (10): 1142-1146.
8. Arroyo, L., L. N. Cotton, and J. H. Martin. (1994). **Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture.** Cultured Dairy Products Journal. 29:2-24
9. Barreda P. (2005). **Desarrollo de la flora intestinal normal.** Disponible en: www.pediatraldia.cl
10. Baron S. (1996). **Medical Microbiology.** 4^{ta} Edición. The University of Texas Medical Branch at Galvesto. Disponible en: <http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=books>.
11. Bezkorovainy A., Miller-Catchpole R. (1989). **Biochemistry and physiology of bifidobacteria.** CRC Press.

12. Black F., Einarsson K., Lidbeck A. (1991). **Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 23: 247-254.
13. Bezkorovanny A., Miller-Catchpole R. (1989). **Biochemistry and Physiology of bifidobacteria.** CRC Press. 103-115.
14. Bonjoch X., Ballesté E., Blanch A.R. (2004). **Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution.** Applied and Environmental Microbiology. 70(5): 3171-3175.
15. Briczinski E. P., Roberts R. F. (2006). **A rapid Pulsed-Field gel electrophoresis method for analysis of bifidobacteria.** Journal Dairy Science. 89: 2424-2427.
16. Calicchia M., Wang C., Nomura T., Yotsuzuka F., Osato D. (1993). **Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and streptomycin-resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product.** Journal of Food Protection. 56: 954-957.
17. Charteries, P., P.M. Kelly., L. Morelli., K Collins. (1997). **Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations.** International Journal of Food Microbiology. 35: 1-27.
18. Charteries P., Kelly P.M., Morelli L., Collins K. (1998). **Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract.** International Journal of Food Microbiology. 84: 759-768.
19. Chevalier P., Roy D., Vuilleumard J.C. (1990). **Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods.** Journal Applied Bacteriology. 68: 619-624.
20. Chouraqui J.P., Van Egrood L.D., Fichot M.C. (2004). **Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings.** Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition. 38: 288-292.
21. Clydesdale F.M. (1997). **A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods.** Nutrition Reviews. 55(12), 413-422.

22. Collins E.B y Hall B.J (1984) **Growth of Bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct.** Journal of Dairy Science. 67: 1376-1380.
23. Contardo M.V., Bustamante G., Rodríguez J. (2005). **Probióticos en niños con diarrea aguda.** Revista Pediatría Electrónica. 2(3): 0718-0918.
24. Correa N.B., Peret Filho L.A., Penna F.J., Lima F.M., Nicoli J.R. (2005). **A randomised formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic associated diarrhea in infants.** Journal of Clinical Gastroenterology. 39:385-389.
25. Corry J., Curtis G., Baird R. (2003). **Handbook of cultures media for food microbiology.** Second impression. Chapter 10. Volume 34. Published in Progress in Industrial Microbiology.
26. Costa J. (2004). **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 22 (5): 299-305.
27. Dave R., Shah N. (1996). **Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria.** Journal of Dairy Science. 79:1529-1536.
28. Davinson R., Duncan S., Hackney C., Eigel W., Boling J. (2000). **Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics.** Journal of Dairy Science. 83: 666-673.
29. De Vries W. y Stouthamer A. H.(1968) **Fermentation of glucose, lactosa, galactosa, manitol y xylose by Bifidobacteria.** Journal of Bacteriology. 96 (2):472-478.
30. Deeth H. C. y Tamine A. (1981). **Yogurt: nutritive and therapeutic aspects.** Journal of Food Protection. 40 (1):78-86
31. Del Campo R., Bravo D., Cantón R., Ruiz-Garbajosa P., García-Albiach R., Montesi-Libois A., Yustel F.J., Abairal V., Baquero F. (2003). **Escasas evidencias de las bacterias lácticas del yogurt en heces humanas tras consumo diario de Yogurt en voluntarios sanos.** Disponible en:
<http://www.institutotomas Pascual.es/publicaciones/000007/000007.pdf>.

32. Delcenserie V., Bechoux N., China B., Daube G., Gavini F. (2005). **A PCR method for detection of Bifidobacteria in raw milk and raw cheese: comparison with culture-based methods.** Journal of Microbiological Methods 61: 55– 67.
33. Delcenserie V., Gavini F., Beerens H., Trece O. Franssen C., Daule G. (2007). **Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolates from raw milk and raw milk cheeses.** Systematic and Applied Microbiology. 30:381-389.
34. Delroisse J.M, Boulvin A., Parmentier I., Dauphin R.D., Vandebol M., Portetelle D. (2006). **Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal sample by real-time PCR.** Microbiological Research. Disponible en: 10.1016/j.micres.2006.09.004: 1-8.
35. Dinakar P., y Mistri V. (1994) **Growth and viability of *B. bifidum* in cheddar cheese.** Journal of Dairy Science. 77: 2854-2864.
36. Doyle M. P. (2001). **Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras.** Editorial Acribia. Zaragoza. España.
37. Fernández-Cuenca F. (2004). **Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas.** Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 22 (6): 355-60.
38. Gevers D., Huys G., Swings J. (2001). **Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species.** FEMS Microbiology Letters. 205:31-36.
39. Gibson G., Fuller R. (2000). **Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use.** American Society for Nutritional Sciences. 130: 391S-395S
40. Gimeno E. (2004). **Alimentos probióticos y prebióticos. Ámbito farmacéutico.** Nutrición. 23: 90-98.
41. Gómez L. H., Roncato K.M., Andrino F. M., Almeida F.C. (1999). **A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp.** Scientia Agricola. 57:553-555.
42. Hernandez H. (2006). **Productos lácteos funcionales.** Alfa Editores Técnicos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de Ayala. México.

43. Helderich W. y Westhoff D. (1980). **All about yogurt**. Editorial Prentice Hall. U.S.A
44. Hill M.; B. Drasar; V. Aries; J. Crowther; G. Hawksworth; R. Williams. (1971). **Bacteria and etiology of cancer of large bowel**. Lancet. 1: 95-100.
45. Hoover D. (1993). **Bifidobacteria: research and development in Japan**. Food Technology. 47(6): 126-135.
46. Hugo E, (2006). **Estudio de la incidencia de los genes de β - lactamasas en aislados bacterianos venezolanos**. Trabajo Especial de Grado. Universidad Central de Venezuela. Instituto de Biología Experimental.
47. Ingham S. (1999). **Used of modified *Lactobacillus* selective medium and *Bifidobacterium* iodoacetate medium for diferencial enumeration of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. in powered nutritional products**. Journal of Food Protection. 62 (1): 77-80.
48. Ñíguez C., Acedo E. (2006). **Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium***. Revista Salud Pública y Nutrición. 7(2). Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/ensayos/bifidiobacterium.htm>.
49. Kado, C. (1998). **Origin and evolution of plasmid**. Antonie Van Leeuwehoek. 73:117-126.
50. Kheadr E., Dabour N., Le Lay C., Lacroix C., Fliss I. (2006) **Antibiotic suceptibility profile of bifidobacteria as Affected by Oxagal, Acid, and Hydrogen Peroxide Stress**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy .51(1):169-174
51. King E., Bachoon D., Gates K. (2007). **Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis***. Journal of Microbiological Methods. 68: 76-81
52. Ko E.J., Goh J.S., Lee B.J., Choi S.H., Kim P.H. (1999). ***Bifidobacterium bifidum* exhibits a lipopolysaccharide-like mitogenic activity for mureine-B-Lymphocytes**. Journal of Dairy Science. 82 (9): 1869-1876.
53. Kurman, J.A. y Rasic, J.L. (1991). **The health potential of products containing bifidobacteria**. In: RK Robinson, editor. **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier Applied Food Sciences. pp.17-158.

54. Laurentin A. (2005). **Pirodextrinas de almidón. Producción, digestibilidad y fermentación colónica in vitro.** Memorias del Instituto de Biología Experimental. 4: 221-224.
55. Lee M.C., Lin L.H., Hung K.L. (2001). **Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children.** Acta Pediatric Taiwan. 42: 301-305.
56. Levesque C., Pichel L., Larose C., Roy P. (1995). **PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39: 185-191.
57. Lim K.S., Huh C.S., Baek J. (1993). **Antimicrobial susceptibility of Bifidobacteria.** Journal of Dairy Science. 76: 2168- 2174.
58. Lu J, Perng C, Lee S, Wan C. (2000). **Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid.** Journal of Clinical Microbiology. 38: 2076-2080.
59. Luque J. y Herráez. (2001). **Biología Molecular e Ingeniería Genética.** Editorial Harcourt. Madrid-España
60. MacFaddin, J. (2003). **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** 3ra Edición. Editorial Médica Panamericana.
61. Macfarlane G.T, Cummings J.H. (1999). **Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?.** Medical Research, 318: 999-1003.
62. Maguiña G. 2001. **Incorporación de *Bifidobacterium sp* como componente fisiológicamente activo en una matriz vegetal.** Proyecto de tesis de Maestría. Universidad Simón Bolívar. Caracas- Venezuela.
63. Machiste M. (2007). **Tipificación de cepas de *Streptococcus agalactiae* (EGB) aisladas de mujeres embarazadas.** Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela.

64. Malinen E. (2002). **Molecular methods for detection of probiotics and intestinal microbiota, and evaluation of *Lactobacillus brevis* as a potential probiotic dietary adjunct.** PhD Tesis. Disponible en:
<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/beasley/isolatio.pdf>
65. Martín-Hernández D., Cámara M. (2000). **Alimentos Funcionales (nutraceuticos).** Alimentos y Salud. VI: 265-308.
66. Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R., Rodellar C. (2001). **Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Revista Aqua TIC. (15): 1-10. Disponible en: <http://aquatic.unizar.es/n3/art1501/basespqr.htm>. 2001.
67. Masco L., Huys G., Gevers D., Verbruggen L., Swings J. (2003). **Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting.** Systematic and Applied Microbiology. 26: 557-563.
68. Mayer H.K., Amtmann E., Philippi E., Steinegger G., Mayrhofer S., Kneifel W. (2007). **Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactis from reference strains and commercial probiotic strains.** International Dairy Journal 17: 565–573.
69. Medina-Gutiérrez I. (2002). **Aislamiento, identificación y caracterización de Bifidobacterias presentes en heces de lactantes.** Trabajo especial de grado. Universidad de Los Andes. Mérida.
70. Mejía J. (2001). **Obtención de cepas de lactobacilos, su caracterización (in vitro) como potenciales prebióticas.** Proyecto de Tesis de Maestría. Universidad de los Andes. Mérida.
71. Mitsuoka T., Kaneuchi C.H. (1977). **Ecology of the Bifidobacteria.** American Journal Clinical Nutrition. 30: 1799-1810.
72. Moreno J. (2006). **Flora bacteriana intestinal.** Anales de Pediatría. 4 (1): 12-19.
73. Morin K.H; (2007). **Funcional Foods: and they are?.** American Journal of Maternal Child Nursing. 32(3):192.
74. Naidu, A.S., Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. (1999). **Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB).** Critical Review of Food Science and Nutrition. 38(1):13-126.

75. Narváez P., Pedroza R., Alonso G., Rodríguez Lemoine V. (2005). **Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas.** Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 25:29-34
76. Norma Venezolana COVENIN 2393. (2001). **Yogurt** (Tercera revisión). Fondonorma.
77. Olive D.M., y Bean P. (1999). **Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms.** Journal of Clinical Microbiology. 37(6): 1661 – 1669.
78. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2001) **Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales.** Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9253055138_spa.pdf.
79. Payne J., Morris A., Beers P. (1999). **Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk.** Journal Applied Microbiology. 86:353-358.
80. Phuapradit P, Varavithya W, Vathanophas K, Sangchai R, Podhipak A, Suthutvoravut U. (1999). **Reduction of rotavirus infection in children receiving bifidobacteria-supplemented formula.** Journal of the Medical Association of Thailand. 82(1): S43-S48.
81. Poupas J., Husain I., Norris R. (1973). **Biology of the Bifidobacteria.** Bacteriological Reviews. 37 (2): 136-165.
82. Redondo C., y Alonso G. (2007). **Plásmidos conjugativos aislados de cepas multiresistentes de pacientes de cuatro centros de salud del área metropolitana de Caracas.** Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.27:100-107.
83. Rivas, J. (2006). **Genotipificación de cepas de enterobacterias causantes de infecciones nosocomiales en diferentes centros de salud del Área Metropolitana de Caracas.** Trabajo de Grado de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Centro de Estudios Avanzados.
84. Rivas J., Redondo C., Alonso G. (2006) **Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de caracas.** Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas. 9 (2):3-7.

85. Rivas J., Guzman M., Redondo C., Moncada L., Rahn K., Machiste Ma. A., Fernández S. Alonso G. (2008). **Genotipificación de cepas bacterianas aisladas de diferentes centros de salud de Venezuela.** Memorias del Instituto de Biología Experimental. 5:105-108.
86. Roberfroid MB. (2000). **Concepts and strategy of functional foods science: the European perspective.** American Journal of Clinical Nutrition. 71: 1660S-1664S.
87. Rodríguez I., Barrera H. 2004. **La Reacción en Cadena de la Polimerasa a dos décadas de su invención.** Ciencia UANL. VII (003):323-335.
88. Ross T.L, Merz W. G, Farkosh M, Carroll K. C. (2005). **Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Journal of Clinical Microbiology; 43 (11): 5642-5647.
89. Saavedra J.M., Bauman N.A. (1994). **Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus.** Lancet. 344: 1.046-1.049.
90. Salminen S., Isolauri E., Salminen E. (1993). **Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier; succesful strains and future challenges.** Antonie van Leewenhoek 70:347-358.
91. Salvatierra M., Molina A., Gamboa M. (2004). **Evaluación del efecto de cultivos prebióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 54 (3): 298-302.
92. Samona A. y Robinson, R.K. (1991). **Enumeration of bifidobacteria in dairy products.** Journal of the Society of Dairy Technologists. 44:64-66
93. Sambrook I., y Rusell D. (2001). **Molecular cloning. A laboratory manual.** 3th Edition. Cold Spring Harbor, New York.
94. Sánchez, Doneyla. (2002). **Incorporación por impregnación a vacío de *Bifidobacterium sp* en melón (*Cucumis melo* L).** Tesis de Linceciatura. Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela.

95. Sanz B., Morillo J. (2000). **Alimentación probiótica y bacterias lácticas**. Alimentos y Salud. Bernabé. Instituto de España. Real Academia de Farmacia. Monografía VIII :309-341.
96. Sanz Y., Collado M.C., Dalmau J. (2006). **Contribución de la microbiota intestinal y del género <Bifidobacterium> a los mecanismos de defensa del Huésped frente a patógenos gastrointestinales**. Acta Pediátrica de España. 64: 74-78.
97. Scardovi V. (1986). **The genus Bifidobacterium**. In “Bergey’s Manual of Systematic bacteriology”. 2: 1418-1434. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
98. Shah, N. P. (1997). **Bifidobacteria: characteristics and potential for application in fermented milk products**. Milchwissenschaft. 52 (2): 72-75.
99. Shah, N. P. (2000). **Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods**. Journal of Dairy Science. 83 (4): 894-907.
100. Sorensen, S. Bayle, M., Hanse, L., Kroer, N. y Wuertz, S. (2005). **Studing plasmid horizontal transfer in-situ: a critical review**. Nature. 3: 700-710
101. Sundman V., Björkstén K., Gyllenberg H.G.(1959) **Morphology of the Bifid bacteria (organisms previously designated Lactobacillus bifidus) and some related genera**. Journal of General Microbiology. 21:371-384.
102. Tamime A., V. Marshall, R. Robinson. (1995). **Microbiological and technological aspects of milk fermented by bifidobacteria**. Journal of Dairy Research. 62:151-187.
103. Tapia M.S, Rojas-Graü M.A, Ramirez J., Carmona A., Martín- Belloso O. (2007). **Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits**. Journal of Food Science. 72(4): E190-E196.
104. Tharmaraj N., Shah N.P. (2003). **Selective enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus and Propionibacteria**. Journal of Dairy Science. 86: 2288-2296
105. Taranto M., Médici M., Font de V. G. (2005). **Alimentos funcionales probióticos**. Revista Química Viva, 1: 26-34.

106. Temmerman R., Pot B, Huys G., Swings J. (2003). **Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products.** International Journal of Food Microbiology.81:1-10.
107. Tenover F.C, Arbeit R.D, Goering R.V, Mickelsen P.A, Murray B.E, Persing D.H, Swaminathan B. (1995). **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing.** *Journal of Clinical Microbiology*; 33: 2233 – 2239.
108. Venema K., Maathuis A. (2003). **A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level.** FEMS Microbiology Letters. 224 (1): 143-149.
109. Ventura M., y Zink R. (2002). **Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*.** Applied and Environmental Microbiology. 68 (12): 6429-6434.
110. Ventura M., Meylan V., Zink R. (2003). **Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of Enterobacterial Repetitive Consensus Sequences.** Applied and Environmental Microbiology. 69 (7): 4296-4301.
111. Vitali B., Candela M., Matteuzzi D. y Brigidi P. (2003). **Quantitative detection of probiotic *Bifidobacterium* strain in bacterial mixtures by using real-time PCR.** Systematic and Applied Microbiology. 26: 269-276.
112. Vlková E., Medková J., Rada V. (2002). **Comparison of four methods for identification of Bifidobacteria to the genus level.** Journal of Food Sciences. 20 (5):171-174.
113. Vlkova E., Rada V., Trojanová I. (2004). **Enumeration, isolation and identification of bifidobacteria from dairy products.** Acta Agriculturae Slovenica.84:31-36.
114. Ward P., Roy D. (2005). **Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria.** Lait. 85: 23-32.
115. Zanfiri M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J. y De Vuyst L. (2006) **Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products.** Systematic and Applied Microbiology. 29:487-495.

11.1 Consultas en línea:

1. <http://www.activia.com/espanol/about.asp>. (**Julio, 2008**)
2. <http://neofronteras.com>. (**Noviembre, 2007**)
3. <http://www.sbgalgae.com>. (**Noviembre, 2007**)
4. <http://www.yoguractivia.com.ar/>. (**Noviembre, 2007**)
5. <http://www.pt.livra.com>. (**Agosto, 2008**)
6. http://www.pa.ipw.agrl.ethz.ch/courses/sem_dipl/current.html. (**Julio,2008**)
7. <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture8/Lecture8.html>.
(**Spetiembre,2008**)