

## Artículo original

# Aislamiento e identificación de cepas del género *Bifidobacterium* presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur

Indira Pérez<sup>a,b</sup>, Aura Falco<sup>a</sup>, María Soledad Tapia<sup>b</sup>, Guillermina Alonso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos, Instituto de Biología Experimental. <sup>b</sup>Laboratorio de Nuevas Tecnologías, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Recibido 22 de agosto de 2011; aceptado 10 de febrero de 2012

**Resumen:** La identificación de microorganismos probióticos del género *Bifidobacterium* es de gran importancia por su uso como suplemento que favorece la salud del consumidor. En Venezuela son pocos los estudios sobre caracterización microbiológica de estas bacterias y no existen métodos oficiales para su estudio en alimentos. Esta investigación reporta la estandarización de técnicas microbiológicas y moleculares para el aislamiento e identificación de bifidobacterias aisladas de dos productos tipo yogur, I con probiótico y II sin probiótico. Se analizaron 10 muestras de cada yogur, una por semana, aislando 3 colonias por muestra. Los resultados mostraron que de los 60 aislados analizados, 27 colonias del Yogur I y 11 del Yogur II concordaron con las características de bifidobacterias. Se comparó el crecimiento bacteriano en dos medios de cultivo (MRS-m, RCA), sembrando por profundidad en placas y en tubos Miller-Prickett, obteniéndose mejores resultados con el medio MRS-m y las siembras por profundidad en tubos. De las extracciones de ADN se obtuvieron los patrones de ERIC-PCR y REP-PCR, determinándose que 34 aislados eran clones indistinguibles, mostrando el patrón de *B. lactis* utilizado como control positivo. Esta metodología puede ser utilizada por la industria y los entes encargados del control de la calidad de los productos probióticos.

**Palabras clave:** *Bifidobacterium*, probióticos, yogur, caracterización microbiológica, ERIC-PCR, REP-PCR.

## Isolation and identification of strains belonging to the *Bifidobacterium* genus found in fermented yoghurt type milk products

**Abstract:** The identification of probiotic microorganisms belonging to the *Bifidobacterium* genus is very important due to their use as supplements favorable for consumer's health. In Venezuela there have been few studies of the microbiological characterization of these bacteria and there are no official methods for their study in food. This investigation reports the standardization of microbiological and molecular techniques for the isolation and identification of bifidobacteria isolated from two yoghurt type products: I with probiotic and II without probiotic. Ten samples from each yoghurt type product were analyzed, one per week, and 3 colonies were isolated per sample. Results showed that of the 60 isolates analyzed, 27 colonies of Yoghurt I and 11 of Yoghurt II coincided with the characteristics of bifidobacteria. Bacterial growth was compared in two culture media (MRS-m, RCA), inoculating in-depth in plates and Miller-Prickett tubes; the best results were obtained with MRS-m medium and in-depth inoculations in tubes. By DNA extraction we obtained ERIC-PCR and REP-PCR patterns, determining that 34 isolates were indistinguishable clones, showing the same pattern of the *B. lactis* used as positive control. This methodology can be used by the industry and the institutions in charge of quality control of probiotic products.

**Keywords:** *Bifidobacterium*, probiotic, yoghurt, microbiological characterization, ERIC-PCR, REP-PCR.

\* Correspondencia:

E-mail: guillermina.alonso@ciens.ucv.ve

### Introducción

El concepto de alimento funcional fue introducido en Japón, en los años 80, y es definido como un alimento modificado que posea algún ingrediente que proporcione un efecto positivo de forma dirigida, en la salud de un individuo, más allá del valor nutricional tradicional [1-3].

En los últimos años este concepto ha despertado el interés en la industria alimentaria debido a la preocupación que la sociedad ha demostrado tener por los aspectos relacionados con la salud, la nutrición y la dieta. Existe una gran variedad de componentes que pueden generar dichos efectos en este tipo de alimentos, destacándose los probióticos, los cuales representan uno de los ejemplos más estudiados, no sólo para

desarrollar una mayor variedad de este tipo de productos, sino para ampliar el conocimiento de las consecuencias que estos tienen sobre la salud humana. Los probióticos son definidos como suplementos alimenticios conformados por microorganismos vivos, que una vez ingeridos, influyen beneficiosamente en la salud del consumidor al mejorar su equilibrio microbiano intestinal [4,5]. Entre los géneros bacterianos utilizados para este fin se encuentran *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* [6].

En muchos países, los cultivos de bifidobacterias son cada vez más utilizados en la elaboración de productos fermentados, porque además de favorecer el equilibrio de la microflora intestinal, ayudan a evitar el riesgo de diarreas por rotavirus, aumentan la síntesis de algunos anticuerpos y su presencia puede ayudar a disminuir los riesgos de cáncer, etc [7-9]. Sin embargo, a pesar de todos estos beneficios, son pocos los estudios realizados en Venezuela dirigidos a la caracterización de estos microorganismos. Además, la recuperación de este grupo bacteriano requiere de condiciones especiales de crecimiento para mantener una buena viabilidad al momento de su aislamiento [10], y la identificación con base a sus características fenotípicas, no siempre proporciona resultados confiables, puesto que las células pueden variar dependiendo de las condiciones y los medios de cultivo utilizados [6, 11].

Los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos, debido a que la expresión de un carácter fenotípico es el resultado de la interacción del genotipo con el ambiente y, por tanto, es susceptible de modificarse cuando las condiciones ambientales varían. El extraordinario avance de la biología molecular en los últimos años ha permitido desarrollar nuevos métodos genotípicos de tipificación, los cuales se basan en la amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y son útiles para diferenciar grupos de cepas relacionadas o no clonalmente. Por lo general, las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y permiten trabajar con un mayor número de muestras [12]. La REP-PCR es una técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con secuencias de ADN repetidas (*rep*) que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchos organismos, tales como enterobacterias y algunas bacterias grampositivas e incluso hongos [12]. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias repetidas, por lo que el polimorfismo resulta tanto de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias como de la distancia entre copias contiguas [13]. Las secuencias repetitivas palindrómicas extragenéticas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragenéticas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias *rep* que se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes bacterianos infecciosos [13,14]. Ambas metodologías involucran el uso de oligonucleótidos

que hibriden en dichas secuencias dispersas a lo largo del cromosoma bacteriano, y cuya ubicación en el genoma permite la discriminación a nivel de género, especie y cepas, basándose en el patrón electroforético de los productos de amplificación [12,13]. Aun cuando estas técnicas tienen menor poder de resolución que el análisis por electroforesis de campo pulsado (PFGE), son ampliamente utilizadas, en especial en estudios que involucren un número alto de muestras, ya que resultan sumamente sencillas, poseen alta sensibilidad y especificidad, no dependen del uso de enzimas de restricción, ni de técnicas electroforéticas especiales, son rápidas, de relativo bajo costo, los patrones son fáciles de analizar y de excelente reproducibilidad [13]. Todas estas razones las colocan en una posición privilegiada a la hora de seleccionarlas como la técnica de tipificación genética a elegir para ser utilizada en estudios de sondeos de control de calidad.

La combinación de ensayos microbiológicos tradicionales, automatizados y moleculares han sido utilizados con éxito en nuestro país para la caracterización de muestras bacterianas, aplicados fundamentalmente al estudio de muestras hospitalarias [14,15]. En este estudio nos propusimos aplicar esta combinación de metodologías en muestras de interés para la industria alimenticia, para verificar la presencia de *Bifidobacterium* spp. en el único alimento tipo yogur declarado probiótico que se comercializaba en Venezuela para ese momento, y si estaba presente, realizar su caracterización por los métodos microbiológicos y moleculares.

## Materiales y métodos

El propósito general de este trabajo fue realizar una investigación bajo un diseño experimental descriptivo, en el cual se reportan datos que contribuyan al estudio, aislamiento e identificación de bifidobacterias presentes en productos tipo yogur, sin la manipulación de alguna variable, y que este sirva de base para investigaciones futuras en distintas ramas de la ciencia de la salud y los alimentos.

*Medios de cultivos y condiciones de crecimiento:* El aislamiento bacteriano inicial se realizó empleando el medio Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid, LTD). Se seleccionaron las presuntas colonias pertenecientes al género *Bifidobacterium*, las cuales se reaislaron tanto en medio MRS (suplementado con una solución de HCl-cisteína al 0,5%) como en Agar Reinforced Clostridium (RCA) (Oxoid, LTD, Cambridge, UK) [16,17]. Ambos medios fueron suplementados con una solución de antibióticos, constituida por: cloruro de litio 2 g/L, propionato de sodio 3 g/L, ácido nalidíxico 0,02 g/L, sulfato de polimixina B 0,0085 g/L, sulfato de kanamicina 0,050 g/L, yodoacetato 0,0125 g/L y 2,3,5 trifeniltetrazolio 0,025 g/L, todos recomendados como constituyentes necesarios para generar un medio selectivo para el género *Bifidobacterium* [16]. Para determinar el crecimiento celular óptimo, se ensayó la siembra en profundidad, tanto en placas de Petri como en tubos Miller-

Pricket. La incubación se realizó a 37 °C durante 72 horas en anaerobiosis, empleando jarras Gas-Pak, y la eficiencia de la atmósfera generada fue comprobada usando indicadores comerciales (Oxoid Ltd, Basingtoke, England). Además, se mejoró el proceso de anaerobiosis utilizando tanto velas como tabletas del producto comercial Alka-Seltzer (Bayer Health Care), diluidas en 5 mL de agua [18,19]. La selección de las colonias se realizó según la morfología característica del género *Bifidobacterium* spp. [20].

*Cepas bacterianas:* Se recolectaron 60 aislados bacterianos a partir de dos marcas de yogures elaborados por la misma empresa, comercializados en los mercados del área metropolitana de Caracas, denominados en este trabajo como Yogur I, el cual era el único declarado por los comerciantes como probiótico para el momento de estudio en Venezuela, a pesar de no identificar las cepas que lo constituían, y Yogur II, el cual no es declarado como producto probiótico, ambos de consistencia líquida y del mismo sabor para evitar variaciones en los resultados reportados. Se analizaron 10 yogures de cada marca, a razón de uno por semana, durante dos meses, con el fin de asegurar el análisis de lotes diferentes; además se verificó que los productos se encontraran dentro del rango de vida útil, y que estuvieran alejados de la fecha de vencimiento. Los productos fueron elegidos al azar y adquiridos en un supermercado de gran tamaño ubicado al suroeste del área metropolitana de Caracas, el cual posee una alta afluencia de consumidores. Se aislaron 3 colonias de presuntas bifidobacterias por muestra (la raíz cuadrada del número de muestras a analizar), obteniéndose un total de 30 aislados por cada marca de yogur. Las cepas bacterianas controles utilizadas fueron *Escherichia coli* J-62 (CVCVM# 131), de fenotipo: F-, His, Lac, Pro, Trp, Rif, y la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb12 (CVCVM#1298), ambas obtenidas del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos [21].

*Identificación de los aislados:* La identificación de las colonias aisladas se realizó mediante la aplicación de pruebas que permitieron verificar si las características metabólicas y fisiológicas concordaban con el perfil de las bifidobacterias. Estas pruebas incluyen: tinción Gram, catalasa, gelatina nutritiva, producción de indol, motilidad, reducción de nitrato, rojo de metilo y Voges-Proskauer (MR/VP), formación de esporas, prueba de producción de gas a partir de glucosa y fermentación de azúcares como lactosa, rafinosa, sorbitol, manitol, dulcitol y ramnosa [22]. Para complementar la identificación se empleó la galería API® Rapid ID32A (bioMérieux, Francia), y los resultados fueron obtenidos empleando el equipo ATB Expression Vitek Systems (bioMérieux, Francia), en el cual se utilizó como control positivo la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb12 (CVCVM#1298).

*Extracción de ADN genómico:* La extracción de ADN total se realizó empleando una modificación del método de ebullición o el método de lisis alcalina rápida. Brevemente,

se cultivaron las células en 2 mL de caldo MRS durante 72 horas a 37 °C. Se mezclaron 200 µL del cultivo con 800 µL de agua estéril. La mezcla fue sometida a ebullición durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 xg durante 3 minutos. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso. Para el método de lisis alcalina rápida se partió de un cultivo bacteriano en 5 mL de caldo MRS durante 7 días a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota del cultivo y se centrifugó a 12.000 xg por 5 minutos. La extracción se realizó resuspendiendo una alícuota del sedimento en 200 µL de Tris-HCl 0,1M, se agregó 200 µL de solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y 700 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó 10 minutos a 12.000 xg, y a la fase acuosa se le agregaron 700 µL de etanol absoluto, se centrifugó a 12.000 xg por 5 minutos y el sedimento fue lavado con etanol al 70%. El ADN fue resuspendido en 50 µL de agua destilada estéril.

*Amplificación de la subunidad 16S del ARN ribosomal:* La calidad del ADN extraído de los aislados previamente identificados se realizó empleando los iniciadores U1 (5' CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3') y U2 (5' ATC GG(C/T) TAC CTT GTT ACG ACT TC 3') [23], que amplifican una región del gen que codifica para el ARNr 16S. Las condiciones de reacción fueron 94 °C durante 5 min, 94 °C por 1 min, 50 °C durante 1 min, 72 °C por 2 min durante 35 ciclos, con una extensión final de 72 °C por 10 min. Se empleó como control negativo una mezcla de todos los componentes sin ADN molde, utilizando agua para completar el volumen (control de reactivos). El control positivo de la reacción se realizó empleando la cepa de *E. coli* J-62 (CVCVM#131), y cuya extracción de ADN fue realizada por el método de ebullición. Los productos de la PCR fueron analizados en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, tratado con bromuro de etidio y visualizado en un equipo de fotodocumentación GelDoc (Bio-Rad, USA).

*ERIC-PCR y REP-PCR:* La caracterización molecular de las bifidobacterias se realizó empleando las técnicas ERIC-PCR y REP-PCR. Para el ERIC-PCR se utilizaron las secuencias de iniciadores ERIC1 (5' ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C 3') y ERIC2 (5' AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G 3') [24,25]. Para este ensayo, las condiciones de reacción fueron: 94 °C durante 5 min, 94 °C por 1 min, 36 °C durante 1 minuto y 68 °C por 2 minutos durante 40 ciclos, con una extensión final de 68 °C por 10 min. Para llevar a cabo la identificación empleando REP-PCR, se empleó el oligonucleótido único REP1 (5' GCG CCG ICA TGC GGC ATT 3') [26]. Para este ensayo, las condiciones de reacción utilizadas fueron 94 °C durante 5 minutos, 94 °C por 1 min, 36 °C durante 1 minuto y 65 °C por 2 minutos durante 40 ciclos, con una extensión final de 65 °C por 10 min. El control positivo de cada una de las reacciones utilizadas fue la cepa de *E. coli* J-62, además de utilizar un control positivo de identificación empleando la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb12 (CVCVM#1298) la cual

es una de las más utilizadas en este tipo de productos. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%, visualizados como se describió previamente.

**Análisis estadístico:** Se empleó la prueba de análisis de varianza multifactorial (ANOVA) con un ( $p < 0,05$ ), con el fin de verificar si existían diferencias significativas en el crecimiento de las colonias aisladas en los dos medios de cultivo utilizados y para determinar si las metodologías de siembra utilizadas eran las más adecuadas para obtener un crecimiento óptimo. Se analizaron cuatro muestras de cada uno de los yogures y se realizaron siembras en profundidad y por triplicado, en ambos medios de cultivo tanto en placas de Petri como tubos Miller-Prickett. Los cálculos se realizaron empleando el software Statgraphics Plus (versión XV15).

## Resultados

**Identificación fenotípica:** Entre los 60 aislados analizados, se seleccionaron las colonias que presentaban una forma circular y convexa, con bordes enteros y de colores crema o blanco [20]. A las colonias aisladas se les realizó la tinción Gram y se tomaron solo las colonias de forma bacilar bifurcada característica del género *Bifidobacterium* (resultados no mostrados) y seguidamente se les realizaron las pruebas bioquímicas descritas [22]. Los resultados obtenidos indicaron que el 90% (27/30) de las colonias aisladas del Yogur I y el 36,66% (11/30) de las colonias aisladas del Yogur II, pertenecen a este género. Estos resultados fueron corroborados empleando una galería comercial, la cual no determinó un perfil de identificación exacto a pesar de arrojar a *Bifidobacterium* spp. como primera opción de identificación, lo que sucedió también para la cepa *B. lactis* (CVCM#1298) usada de control. Es importante resaltar que las lecturas del sistema según el patrón de reacción generado concuerdan con el esperado para el género en estudio.

**Determinación del título de bifidobacterias a partir de muestras de yogur:** Se determinó el título bacteriano a partir de 4 muestras de cada uno de los yogures, por triplicado, con el fin de establecer cuál de los dos medios de cultivo utilizados, reportados como selectivos para el género y cuál, de las dos metodologías de siembra empleadas, era la más eficiente para el crecimiento óptimo de este microorganismo. Los resultados indican que se obtienen títulos bacterianos mayores cuando las siembras son realizadas en el medio MRS suplementado con antibióticos y HCl-cisteína (0,5%), siempre utilizando la siembra en profundidad, tanto en placas de Petri como en tubos Miller-Prickett (Figura 1). Igualmente, se obtuvieron títulos bacterianos mayores cuando las células son cultivadas en tubos Miller-Prickett, que cuando se siembran en placas de Petri (Figura 1). Los resultados de los análisis estadísticos realizados revelaron que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los

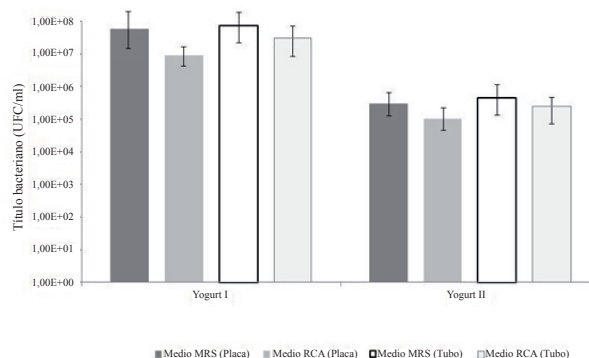


Figura 1. Título de las bifidobacterias aisladas de dos tipos de yogur comercializados en Venezuela, sembradas en los medios de cultivo MRS y RCA, empleando placas de Petri y tubos Miller-Prickett. Se expresa el valor de UFC/mL obtenido del crecimiento en ambos medios de cultivo y con dos metodologías alternativas de siembra.

títulos bacterianos obtenidos en los diferentes medios de cultivo y con los métodos de siembra.

**Identificación molecular:** A las colonias identificadas como bifidobacterias, se les purificó el ADN aplicando los dos métodos señalados [27,28]. Los resultados indican que el método de lisis alcalina rápida permitió obtener una mayor concentración de ADN y de mejor calidad. Se realizó la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la

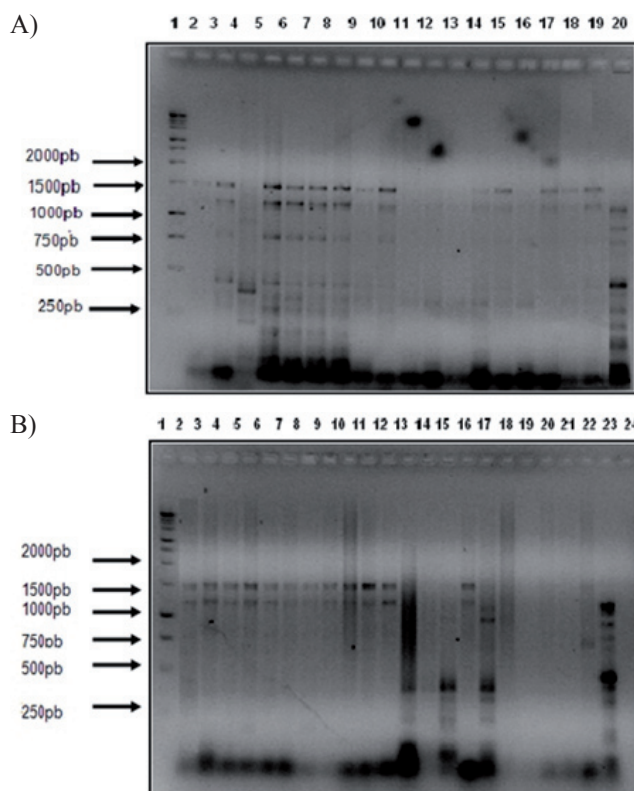


Figura 2. Registro fotográfico de la migración electroforética de los productos de ERIC-PCR de colonias de bifidobacterias aisladas de dos tipos de yogur comercializados en Venezuela. A) Carril 1: 1kb DNA Ladder; Carril 2 al 18: muestras analizadas; Carril 19: *B. lactis* (Control +); Carril 20: *E. coli* J-62. B). Carril 1: 1kb DNA Ladder; Carril 2 al 22: muestras analizadas; Carril 23: *E. coli* J-62; Carril 24: Control negativo.

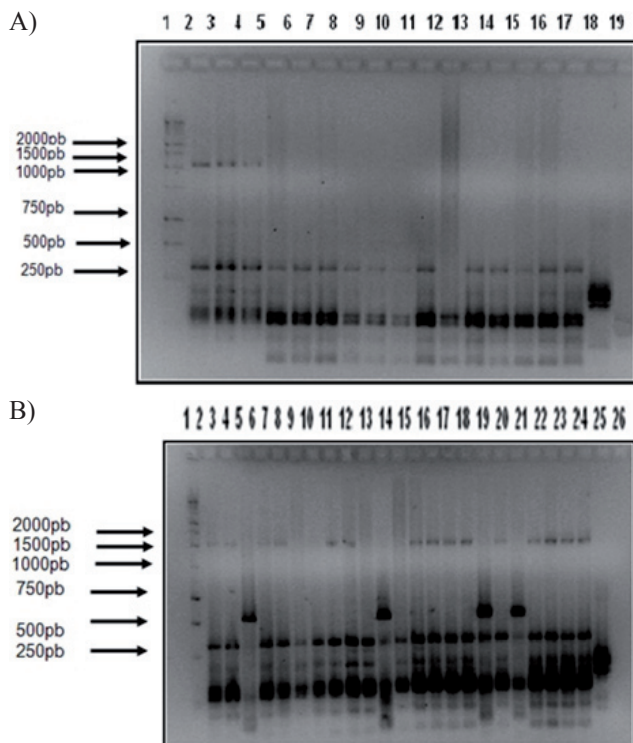


Figura 3. Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de REP-PCR de colonias de bifidobacterias aisladas dos tipos de yogur comercializados en Venezuela. A) Carril 1: 1kb DNA Ladder; Carril 3: *B. lactis* (Control +); Carril 2 y 4 al 17: muestras analizadas; Carril 18: *E.coli* J-62; Carril 19: Control negativo. B) Carril 1: 1kb DNA Ladder; Carril 2 al 24: Muestras; Carril 25: *E.coli* J-62; Carril 26: Control negativo.

subunidad ribosomal 16S, obteniendo el patrón esperado de 996pb y 150pb (resultados no mostrados), según lo reportado previamente para otros géneros bacterianos [23], asegurando la calidad del ADN para las pruebas moleculares posteriores.

Se realizaron reacciones de PCR para obtener los patrones de las secuencias repetidas ERIC y REP, a fin de determinar las relaciones clonales entre los diferentes aislados de una misma especie. En la figura 2, se muestran los resultados de la reacción de ERIC-PCR para 38 aislados de bifidobacterias obtenidas a partir de los dos productos evaluados. Se obtuvieron dos patrones principales de bandas, el primero se denominó patrón “a” y presenta bandas cuyos tamaños varían entre 100 pb y 1.500 pb, aproximadamente. El segundo, patrón “b” con bandas de menor tamaño, se puede observar en las muestras del carril 4 de la figura 2A y en los carriles 13, 14 y 15 de la figura 2B. Los resultados de la REP-PCR, también generó un patrón “a” (Figura 3), y un patrón “b” el cual se observa en los carriles 4, 12, 18 y 20 de la figura 3B. Los patrones “a”, que se obtuvieron mayoritariamente con ambas pruebas, son similares al patrón obtenido con la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb12 usada como control positivo.

## Discusión

Desde hace mucho tiempo se conoce que agregar algunos microorganismos vivos a ciertos productos, representa una

manera de reconstituir la microflora intestinal, ejerciendo algunas acciones a nivel del intestino que generan efectos beneficiosos en la salud de las personas que ingieren estos alimentos probióticos. Diferentes especies del género *Bifidobacterium* ejercen estos efectos en el humano, lo cual ha constituido en los últimos años un sector prometedor dentro de la industria alimenticia, que ha llevado a la elaboración de este tipo de alimentos funcionales que posean en su composición este grupo microbiano, representando un reto para la comunidad científica la responsabilidad de generar estudios relacionados con el papel que desempeñan estos microorganismos en el mantenimiento de la salud, tratamiento y prevención de enfermedades.

En este estudio se verificó la presencia de organismos de este género en dos productos lácteos nacionales, además de evaluar diferentes métodos que permiten obtener resultados rápidos, en el aislamiento e identificación de bifidobacterias. Las colonias aisladas fueron de forma circular, de elevación convexa, margen entero, de colores blancos o beige y todos los aislados presentaron formas de bacilos bifurcados, lo cual concuerda con lo reportado por distintos autores [20,29,30]. La atmósfera anaerobia obtenida usando la solución de Alka-Seltzer proporcionó buenos resultados para el desarrollo de estos aislados, al igual que los sobres comerciales, demostrando que este sistema puede constituir una alternativa económica y de fácil adquisición.

Los cultivos bacterianos fueron sometidos a pruebas bioquímicas características del género. Para las muestras del Yogur I, se obtuvo un 90% de concordancia con este género bacteriano; mientras que para el caso de los aislados provenientes del Yogur II, sólo se obtuvo un 36,6%. Este último producto no reporta en su etiqueta que sea un alimento probiótico, por lo cual no se esperaba un alto contenido de este género bacteriano. Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron verificados con los ensayos de fermentación de diversos azúcares, empleados para diferenciar fenotípicamente especies y biotipos del género *Bifidobacterium* [30]. El análisis de los resultados señaló que de las 60 colonias aisladas de ambas marcas de yogures, el 63,33% fueron bifidobacterias, por la concordancia de las pruebas químicas y de fermentación. Al utilizar las pruebas automatizadas, empleando la galería comercial API Rapid ID32A para bacterias anaerobias de importancia hospitalaria, al ser incubadas durante el tiempo indicado por la casa comercial, los resultados no arrojaron ningún perfil de identificación, aún cuando las lecturas obtenidas coincidieron con las del género en estudio. Igual resultado se obtuvo con el control *B. lactis*. Debido a estos inconvenientes, se incrementó el tiempo de contacto de 4 a 24 horas, entre el lisado celular y los medios deshidratados. Al realizar de nuevo las lecturas los resultados señalaron al género *Bifidobacterium* spp. como la primera opción de identificación. Estos resultados pueden deberse a que este tipo de galerías fueron diseñadas para la identificación de aislados de interés clínico o que la especie que está presente en estos productos es distinta a la indicada en la base de datos de la galería identificación, dificultando así su identificación

hasta el nivel de especie.

Los resultados de los ensayos de crecimiento indican que las colonias se desarrollaron 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 (Figura 1). Son diversos los autores que han utilizado previamente este medio suplementado con HCl-cisteína y soluciones de antibióticos, reportando que se generan las condiciones apropiadas para el desarrollo de este tipo de microorganismos [20,16,31-37]. Los tubos Miller-Pricket resultaron ser sistemas bastante eficientes, ya que la forma plana y 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 su aislamiento, motivo por el cual esta metodología de siembra es recomendada solo para recuento y enumeración. El aislamiento de las colonias se recomienda realizarlo por siembra en profundidad en placas, ya que aun cuando es complicada la extracción por las dos capas de agar, el deterioro que sufre el microorganismo es mucho menor al que sufre cuando se tratan de extraer de los tubos.

Los valores de los títulos bacterianos permiten reportar que el Yogur I, 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, según distintos autores debe de ser igual o mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/mL o g de producto para conferir beneficios a la salud de los humanos [4,38-40]. Otro reporte señala que debe existir una población viable de bifidobacterias de 5 ciclos log UFC/g en el producto final, como el mínimo para obtener los beneficios mencionados [41]. El Yogur II también demostró poseer en su composición este grupo de microorganismos, pero en una cantidad mucho menor, oscilando el título bacteriano entre  $1,04 \times 10^5$  a  $4,40 \times 10^5$  UFC/mL, siendo un valor menor al exigido para considerar un alimento como probiótico.

Para complementar los estudios microbiológicos, se implementaron métodos moleculares para la identificación y la tipificación de las colonias aisladas. En la literatura no existen estudios que señalen cual método de extracción de ADN es el más adecuado para bifidobacterias, sin embargo muchas referencias utilizan estuches comerciales especializados para su aislamiento o protocolos que incluyan etapas para la limpieza y purificación. Los resultados obtenidos permiten sugerir que para la purificación de ADN de aislados de bifidobacterias, se utilice el método de lisis alcalina rápida [28], como una metodología relativamente económica y rápida, lo que permitiría su uso a nivel de control en la industria de alimentos. La amplificación por PCR del ADN que codifica para la subunidad ribosomal pequeña 16S, es apropiada para comprobar la calidad del ADN extraído [42], y confirmar su uso potencial para obtener resultados en las pruebas de PCR. Los resultados

de este PCR-16S ratificaron la buena calidad como sustrato del PCR del material genético aislado. Los patrones encontrados con ERIC-PCR y con REP-PCR, demostraron la presencia de dos patrones de bandas diferentes. Sólo 4 de los 38 aislados exhibieron un patrón diferente al del control positivo *B. lactis*. Aún cuando los aislados provienen de diferentes yogures, estos productos son de la misma casa comercial, por lo que seguramente utilizan la misma cepa de bifidobacterias para elaborar ambos productos. Los patrones encontrados concuerdan con los patrones generados para cepas de *B. lactis* y *B. animalis* en reportes previos, siendo de mayor similitud con la cepa comercial *B. lactis* DSM 10140 [24,25]. Estos resultados nos indican que estas especies presentan muy poca variabilidad genética, lo cual se evidencia en el escaso polimorfismo de los patrones, acorde con los resultados del proyecto genoma [43]. Los resultados de la genotipificación, tanto por REP-PCR 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, y los 38 aislados exhibieron una similitud con los reportados para las cepas comerciales de *B. lactis* [24].

En Venezuela son pocos los estudios de identificación y caracterización molecular de este tipo de microorganismos que son de interés en la industria alimentaria. Este trabajo representa el primer aporte nacional 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. 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. Este estudio estableció las condiciones para investigar y mejorar las técnicas del aislamiento e identificación de este tipo de microorganismos, que permiten incrementar su uso por parte de la industria alimentaria y farmacéutica y por los entes encargados del control de la calidad de los productos probióticos y de las cepas utilizadas en el país. Igualmente, esta investigación aportó las bases para estudios futuros basados en modificaciones genéticas que mejoren los efectos de este tipo de microorganismos.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH), PG-03-7327-2008, coordinado por Guillermina Alonso del Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos del Instituto de Biología Experimental, y por el proyecto del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT G-200001538), coordinado por María Soledad Tapia del Laboratorio de Nuevas Tecnologías del Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos.

## Referencias

- Clydesdale FM. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr Rev.* 1997; 55:413-22.
- Roberfroid MB. Concepts and strategy of functional foods science: the European perspective. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71 Suppl 6:S1660-4.
- Morin KH. Functional Foods: and they are?. *MCN Am J Matern Child Nurs.* 2007; 32:192.
- Shah NP. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci.* 2000; 83:894-907.
- 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](http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9253055138_spa.pdf). Acceso 2 de agosto 2011.
- Sanz B, Murillo JJ. Alimentación probiótica y bacterias lácticas. En: *Alimentos y Salud. Monografía VI. España: Real Academia Nacional de Farmacia; 2000. p. 309-41.*
- Russell D, Ross R, Fitzgerald G, Stanton C. Metabolic activities and probiotic potencial of bifidobacteria. *Int J Food Microbiol.* 2011; 149 :88-105.
- Liong M. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and *in-vivo* evidence. *Int J Mol Sci.* 2008; 9: 854-63.
- Sanz Y, Collado M, Dalmau J. Contribución de la microbiota intestinal y del género *Bifidobacterium* a los mecanismos de defensa del huésped frente a patógenos gastrointestinales. *Acta Pediatr Esp.* 2006; 64: 74-8.
- Medina V, Blanca B, García T. Comparación del efecto de los suplementos reductores de oxígeno disueltos sobre el recuento de *Bifidobacterium* spp. *Agrolanía.* 2007; 4:95-102.
- Mayer HK, Amtmann E, Philippi E, Steinegger G, Mayrhofer S, Kneifel W. Molecular discrimination of new isolates of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* from reference strains and commercial probiotic strains. *Int Dairy J.* 2007; 17:565-73.
- Cuenca-Fernández F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22:355-60.
- Vilchez G, Alonso G. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2009; 29:6-12.
- Rivas J, Redondo C, Alonso G. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Act Cient Soc Ven de Bio Espec.* 2006; 9 (2):3-7.
- Araque Y, Vitelli-Flores J, Ramírez A, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Identificación bioquímica y PCR especie-específica de *Burkholderia cepacia* en muestras de origen hospitalario y ambiental en Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2008; 28:82-9.
- Payne J, Morris A, Beers P. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. *J Appl Microbiol.* 1999; 86:353-8.
- Arroyo L, Cotton LN, Martin JH. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture. *Cult Dairy Prod J.* 1994; 29:2-24.
- Mercado P, Rubio G. Efecto del probiótico *Bifidobacterium* BLC sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* en helado. *Rebiol.* 2009; 29 :1-10.
- Majalca C, Rivera J, Ochoa S, Giono S. Transporte, asilamiento y conservación de cepas de *Helicobacter pylori*. *Bioquímica.* 2009; 26:105-10.
- Scardovi V. The genus *Bifidobacterium*. In: Sneath PH, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1986. p. 1418-34.
- Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). 2006. Catálogo digital. Sexta edición. Disponible en <http://www.pfizer.net.ve/cvcm/colecc.html>. Acceso 18 julio 2007.
- MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003.
- Lu J, Perng C, Lee S, Wan C. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2076-80.
- Ventura M, Zink R. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68:6429-34.
- Ventura M, Meylan V, Zink R. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive consensus sequences. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69:4296-301.
- Masco L, Huys G, Gevers D, Verbruggen L, Swings J. Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Syst Appl Microbiol.* 2003; 26:557-63.
- Levesque C, Pichel L, Larose C, Roy P. PCR mapping of integron reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39:185-91.
- Gómes LH, Roncato KM, Andriano FM, Almeida FC. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp. *Sci Agri.* 1999; 57:553-5.
- Poupar J, Husain I, Norris R. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev.* 1973; 37:136-65.
- Mitsuoka T, Kaneuchi CH. Ecology of the bifidobacteria. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30:1799-810.
- Dinakar P, Mistri V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. *J Dairy Sci.* 1994; 77:2854-64.
- Collins EB, Hall BJ. Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. *J Dairy Sci.* 1984; 67:1376-80.
- Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int J Food Microbiol.* 2003; 81:1-10.
- Tharmaraj N, Shah NP. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and propionibacteria. *J Dairy Sci.* 2003; 86:2288-96.
- Zanfir M, Vancanneyt M, Makras L, Vaningelgem F, Lefebvre K, Pot B *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Syst Appl Microbiol.* 2006; 29:487-95.
- Álvarez-Martin P, Belén A, Mayo B. Screening for plasmids among human bifidobacteria species: sequencing and analysis of pBC1 from *Bifidobacterium catenulatum* L48. *Plasmid.* 2007; 57:165-74.
- Mayorga L, Bustamante C, Gutierrez A, Barranco E, Azaola A. Crecimiento sobrevivencia y adaptación de *Bifidobacterium infantis* a condiciones ácidas. *Rev Mex Ing Quím.* 2009;

- 8:259-64.
38. Kurman JA, Rasic JL. The health potential of products containing bifidobacteria. In: Robinson RK, editor. Therapeutic properties of fermented milks. London: Elsevier Applied Food Sciences; 1991. pp. 17-158.
  39. Corry J, Curtis G, Baird R, editors. Handbook of cultures media for food microbiology. 2nd edition. Progress in Industrial Microbiology. UK: Stratford Books; 2003.
  40. Samona A, Robinson RK. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. Int J Dairy Tech. 1991; 44:64-6.
  41. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci Nutr. 1999; 38:13-126.
  42. Arnheim N, Erlich E. Polymerase chain reaction strategy. Ann Rev Biochem. 1992; 61:131-56.
  43. Sun Z, Chen X, Wang J. Complete genome sequence of probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis strain V9. J Bacteriol. 2010; 192:4080-1.