

Mtra. María Elena Contreras Garfias
 Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
 PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre :	
Matrícula :	Licenciatura :
Domicilio :	
Teléfono :	Celular :
Correo Electrónico :	CURP :

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :							
Lugar donde se realizó el Servicio Social :							
Dependencia :							
Entidad Federativa :							
Municipio :				Localidad :			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: _____ Tipo: _____

Orientación: _____

FIRMAS

Asesor Interno
 Nombre, firma y No. Económico

Alumno
 Nombre, firma

Asesor Externo
 Nombre, firma y No. Económico

Vo. Bo. de la Comisión
 Nombre y firma de la persona que autoriza

Ciudad de México., a 17 de febrero de 2021.

MTRA. MARÍA ELENA CONTRERAS GARFIAS
DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que la alumna: **Clarissa Fabiola Acosta Ovando** con matrícula: 2153060927 concluyó el proyecto de Servicio Social: "Identificación molecular de bifidobacterias". Qué se realizó en el laboratorio de Ecología Microbiana ubicado en el Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco del 02 de septiembre de 2020 al 03 de marzo del 2021 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE



Dra. María Angélica Gutiérrez Nava
Profesor Investigador Titular
No. Económico 34568



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Informe de servicio social

Identificación molecular de bifidobacterias.

Alumna: Clarissa Fabiola Acosta Ovando – 2153060927
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Laboratorio de Ecología Microbiana

Asesor: Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Contenido

Resumen.	4
Introducción.	5
<i>Bacterias.</i>	6
<i>Probióticos.</i>	8
<i>Bifidobacterias.</i>	12
<i>Identificación de bacterias.</i>	14
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa.</i>	16
<i>Electroforesis en gel de agarosa.</i>	19
<i>Secuenciación.</i>	20
Antecedentes.	24
Objetivos.	28
<i>Objetivo general.</i>	28
<i>Objetivos específicos.</i>	28
Metodología.	29
1. <i>Activación de cepas en medio de cultivo TPY con inulina.</i>	29
2. <i>Extracción de ADN de bifidobacterias provenientes de diversos orígenes por el método fenol-cloroformo y por kit QIAamp QIAGEN.</i>	30
3. <i>Cuantificación de ADN proveniente de diversas muestras.</i>	32
4. <i>Amplificación e identificación de las muestras por medio de la técnica PCR.</i>	32
5. <i>Análisis de ADN y reacciones de PCR por medio de electroforesis en geles de agarosa.</i>	34
6. <i>Secuenciación de muestras seleccionadas.</i>	34
Resultados y discusión.	36
1. <i>Activación de cepas en medio de cultivo TPY con inulina.</i>	36
2. <i>Extracción de ADN de bifidobacterias provenientes de diversos orígenes por el método fenol-cloroformo y por kit QIAamp QIAGEN.</i>	36
3. <i>Cuantificación de ADN, por medio de espectrofotometría, proveniente de diversas muestras.</i>	36
4. <i>Amplificación e identificación de las muestras por medio de la técnica PCR.</i>	39
5. <i>Análisis de ADN y reacciones de PCR por medio de electroforesis en geles de agarosa.</i>	41

6. <i>Secuenciación de muestras seleccionadas.</i>	56
Conclusiones.	60
Bibliografía.	61

Resumen.

Las bifidobacterias son microorganismos Gram positivos anaerobios, son el grupo más importante de bacterias sacarolíticas del intestino grueso con presencia del 25% en adultos y 95% en recién nacidos alimentados con leche materna. Estas bacterias se relacionan con múltiples beneficios para el organismo humano como mejoramiento del proceso de digestión, prevención del desarrollo de determinados tumores, disminución de la incidencia de alergias, control de diarrea, entre muchos otros.

Debido a la gran importancia que tienen las bifidobacterias en la salud, este trabajo tuvo como objetivo optimizar su identificación molecular para facilitar su estudio en diversas pruebas. La optimización se llevó a cabo por medio de tres pasos principales: extracción de ADN, amplificación por PCR, secuenciación y alineamiento de secuencias en BLAST.

Se encontró que el método fenol-cloroformo permite obtener muestras de pureza óptima a aceptable en la mayoría de las muestras analizadas para poder llevar a cabo la posterior amplificación por medio de PCR siguiendo las condiciones de desnaturalización a 94°C / 5 minutos; 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C / 1 minuto, alineamiento a 57°C / 1 minuto, extensión a 72°C / 1 minuto y una extensión final a 72°C / 5 minutos. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados, lo que permitió conocer la especie por medio de un alineamiento en BLAST.

Introducción.

Los probióticos son microorganismos vivos que tras ser ingeridos en una adecuada cantidad, pueden ejercer efectos benéficos para la salud. Debido a que existen cepas y dosis distintas para cada especie de estas bacterias, las propiedades entre cada una puede variar. ^[1]

A lo largo de la historia, se ha descrito el uso y consumo de probióticos para mantener el equilibrio microbiano intestinal, producir sustancias antimicrobianas, aumentar la producción de interferón gamma por parte de los linfocitos, aumentar la producción de interferón alfa por parte de los macrófagos, estimular las células T helper 1 (Th1) productoras de citocinas y causantes de la inmunidad celular, inducir una inmunidad secretora específica, entre otros muchos beneficios. ^[2]

Dentro de las cepas más utilizadas de probióticos, están las que pertenecen al género *Bifidobacterium* como *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. animalis*, las cuales constituyen el grupo más importante de bacterias sacarolíticas del intestino grueso. Estas bacterias también tienen diversas funciones sobre el organismo como mejorar el proceso de digestión, disminuir la incidencia epidemiológica de alergias, prevenir el desarrollo de tumores, producir vitaminas, tener función antibacteriana, intervenir en el metabolismo hepático, reducir el estreñimiento, modular la inmunidad, entre otras funciones. Es así que el estudio de bifidobacterias es importante en el descubrimiento de nuevas funciones y beneficios para el organismo humano, pero para poder llevar a cabo un estudio adecuado, se debe realizar la identificación genotípica de la cepa que se esté estudiando y para esto, las técnicas moleculares para la identificación de bifidobacterias ofrecen múltiples ventajas para la identificación de todas las cepas con alta especificidad, sensibilidad, confiabilidad y velocidad de obtención de los resultados durante la detección. ^[2, 3]

Por lo que en este trabajo se propuso llevar a cabo la optimización de la extracción de ADN de bifidobacterias provenientes de diferentes cultivos y muestras, así como de la identificación molecular por la técnica de PCR y posterior secuenciación.

Marco teórico.

Bacterias.

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariontes con un tamaño entre 0.5 y 5 μm de largo. Existen diversas bacterias que pueden vivir en todos los medios y ambientes existentes, se ha podido comprobar que incluso pueden vivir en desechos radioactivos y se estima que existen aproximadamente 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón en un mililitro de agua dulce. [1]

Las bacterias pueden clasificarse de distintas maneras: por su tinción (Gram positivas y Gram negativas), por su forma (esferas o cocos, bastones o bacilos y espirales o hélices o espiroquetas), su necesidad de oxígeno (aerobias, anaerobias y facultativas) o por su porcentaje de moles G+C, ya que caracteriza el genoma y su límite de variación en este contenido entre cepas de la misma especie. [1, 4]

Pueden jugar un papel importante dentro o fuera del organismo humano al ofrecer ciertos beneficios en el funcionamiento, produciendo enfermedades, mejorando procesos de fermentación o putrefacción en seres vivos o materia orgánica y pueden tener muchas formas para auto defenderse como: [1]

- **Biofilm o biopelícula:** capa adherente formada por una sustancia segregada que se combina con la bacteria para fijarse a otras bacterias, células u objetos. Por ejemplo, la placa dental que atrapa partículas de alimentos para ser procesadas y utilizadas por ellas mismas.
- **Cápsulas:** existen bacterias que se encuentran envueltas en una cápsula protectora para evitar ser ingeridas por leucocitos o glóbulos blancos, llamadas bacterias encapsuladas.
- **Membrana externa:** bajo la cápsula, bacterias Gram negativas tienen una membrana externa que las protege contra determinados antibióticos y la

cual, al deteriorarse, libera endotoxinas que aumentan los síntomas de las infecciones producidas por éste tipo de bacterias.

- Esporas: son una forma inactiva o latente de las bacterias que contienen el material genético y las sustancias necesarias para sobrevivir y al presentarse el ambiente propicio, cada espora liberada anteriormente germina y se transforma en una bacteria activa.
- Flagelos: son filamentos largos y delgados que permiten el movimiento independiente por el medio en donde se encuentran.
- Resistencia a los antibióticos: esta resistencia puede generarse por la adquisición de genes de otras bacterias resistentes, por la mutación de éstos o simplemente ser resistentes naturalmente al pasar los genes de una generación a otra.

Muchas bacterias, denominadas flora saprófita o microbioma, viven en el cuerpo humano o en el de los animales (piel, vías respiratorias, boca, sistemas digestivo, reproductor y urinario) sin causar algún daño. En 1907, Ellie Metchnikoff afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la microbiota de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles” y desde entonces, la ciencia ha trabajado para conocer más acerca de los microorganismos llamados probióticos, los cuales fueron definidos en 1989 como microorganismos vivos (principalmente bacterias y levaduras) que benefician al huésped para mejorar su balance microbiano intestinal. ^[1, 4]

Probióticos.

Los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization) como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. Esta palabra proviene del griego pro-bios que significa a favor de la vida. En los últimos 20 años, la investigación sobre los probióticos ha evolucionado considerablemente y se han realizado avances notables en la selección y caracterización de cultivos probióticos concretos y en sus propiedades saludables en relación con su consumo. [4]

Las bacterias más comunes que se relacionan con la actividad probiótica son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus salivaris* subespecie *thermophilus* y algunas variedades de levaduras como *Saccharomyces boulardii*. Debido a que existen cepas y dosis distintas para cada especie de bacteria, las propiedades entre cada una puede variar. [2]

En 1908, Iliá Mechnikov sugirió que la ingesta de yogur de Kéfir o leche búlgara con lactobacilos disminuía el número de bacterias que producen toxinas en el intestino y que contribuían a la longevidad de los campesinos búlgaros. En 1965 se citó por primera vez el término probiótico por Lilly y Stillwell para describir cualquier sustancia u organismo que contribuye a mantener el equilibrio intestinal en los animales. En 1989, Fuller los consideró como un suplemento microbiano alimenticio que beneficia al huésped animal proveyendo una mejoría del balance microbiano intestinal. [2]

Existen diversos criterios que deben ser considerados para poder llamar a un microorganismo como probiótico, siguiendo a Teitelbaum, son: [2]

- Ser de origen humano.
- No ser patógenos por naturaleza.
- Ser resistentes a la destrucción por procedimientos tecnológicos.

- Ser resistentes a la destrucción por las secreciones gástricas y por la bilis.
- Poder adherirse al epitelio intestinal.
- Ser capaces de colonizar el tracto gastrointestinal, incluso por cortos períodos.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Modular las respuestas inmunitarias.

Las cepas más utilizadas de bifidobacterias han sido *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. animalis*, las cuales constituyen el grupo más importante de bacterias sacarolíticas del intestino grueso y dentro de los lactobacilos se encuentran las cepas *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. reuterii*, *L. plantarum*, *L. casei* y *L. rhamnosus*, el cual fue seleccionado originalmente por su resistencia a los jugos gástricos, a la digestión biliar y a su capacidad de colonizar el colon humano. No posee plásmidos, lo que le permite tener una resistencia estable ante los antibióticos. Produce solamente ácido láctico y en su membrana expresa factores adhesivos que permiten su interacción con los enterocitos humanos. Así mismo, se usan varias cepas distintas para obtener distintos beneficios. ^[2]

Los probióticos pueden presentar diversos mecanismos de acción: ^[2]

- Inducción de un pH ácido por debajo de 4: por una parte, debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta que pueden llegar a unas concentraciones que impidan el crecimiento de gérmenes, ya que el pH ácido favorece el crecimiento de bacterias tolerantes. Algunos probióticos generan peróxido de hidrógeno que reduce el pH luminal y el potencial redox y produce bactericinas que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas y en algunas ocasiones, mediante la disminución de la presión de oxígeno favorecen el crecimiento de anaerobios.
- Restablecimiento de la microbiota normal tras una gastroenteritis aguda, que disminuye la permeabilidad intestinal y potencia el efecto barrera inmunológico.

- Disminución a la intolerancia a la lactosa e incrementan la actividad lactásica intestinal, con la mejora del trofismo del intestino.
- Ejercer influencia en la transferencia de plásmidos y en el establecimiento de transconjugados en el intestino.
- Poseer la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos y afectan a la composición del ecosistema intestinal, incrementando el efecto barrera no dependiente del sistema inmunológico.
- Ejercer un efecto competitivo con otras bacterias, ocupando sus lugares de nidación e inhibiendo el crecimiento de especies de enteropatógenos.
- Tienen la capacidad de aumentar la expresión de las mucinas ileocolónicas MUC2 y MUC3, coadyuvando al recubrimiento del intestino de una capa de moco, mecanismo eficaz de la lucha antibacteriana.
- Pueden competir con nutrientes de la microbiota intestinal patógena.

Además, los probióticos tienen determinadas funciones sobre el organismo como su acción sobre el sistema inmune al aumentar la producción de interferón gamma por parte de los linfocitos, aumentar la producción de interferón alfa por parte de los macrófagos, estimular las células T helper 1 (Th1) productoras de citocinas y causantes de la inmunidad celular, modificar las relaciones entre las Th1 y las Th2 y de esta forma influir en la evolución de las alergias, activar directamente las células linfocíticas, incrementar la producción de inmunoglobulina A secretora (IgAs) mediante diversas interacciones entre los constituyentes de la microbiota intestinal, las células epiteliales y las células inmunes y enviar señales de activación para las células del sistema inmune. ^[2]

Perdigon y colaboradores, demostraron que determinadas bacterias productoras de ácido láctico eran capaces de inducir una inmunidad secretora específica o aumentar la respuesta inflamatoria inmune del intestino, además de que estas bacterias inducían el aumento de las células B, la interacción de la IgA con las

células M de las placas de Peyer y el aumento de las células IgM. También demostró un aumento de los linfocitos CD4, lo que indica un incremento en la migración de las células T y B. [2, 8]

Otras de las funciones de los probióticos han sido colonizar el intestino de niños con VIH desencadenando una respuesta sistémica inmunitaria mediante la administración de *Lactobacillus plantarum*, brindar protección contra candidiasis orales debidas a inmunodeficiencias graves usando lactobacilos acidófilos y *Lactobacillus casei* inactivados mediante tratamiento térmico, Matzusaki y colaboradores, demostraron una mejoría de la evolución y predisposición alérgica tras la administración de *L. casei shirota* a ratones BALB/c preinyectados con ovoalbúmina intraperitonealmente comparado con un grupo control no suplementado con este lactobacilo y consiguieron inhibir la producción de IgE y disminuir los niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad hasta en un 31% probablemente por la disminución de la actividad de la betahidroximetil glutaril-CoA hepática o por el aumento de los ácidos biliares en heces al convertir el colesterol en éstos mismos. [2, 9]

La relación entre los probióticos y la prevención del cáncer ha sido relevante en diversos estudios que demuestran una relación inversa entre la aparición de cáncer de mama en Francia y los Países Bajos con el consumo de probióticos, donde en pacientes con bajo riesgo se ha encontrado un mayor número de lactobacilos y eubacterias en heces. El cáncer de colon también ha sido estudiado, éste se presenta como parte de la etapa final de una serie de episodios que se inician como una hiperproliferación de células en el interior de las criptas del colon (criptas aberrantes) que se consideran preneoplásicas y evolucionan, sólo unas pocas, a pólipos y posteriormente a tumores. Se ha demostrado que con la administración de leche fermentada se ha disminuido hasta en un 50% el número de criptas aberrantes en ratones tratados con sustancias oncogénicas; sin embargo, los mecanismos que producen las acciones antioncogénicas no están claros y se han especulado sobre diversos funcionamientos como la unión de lactobacilos a compuestos mutagénicos, la competición entre las bacterias

benéficas y las patógenas por los procarcinógenos para producir o no carcinógenos, entre otras muchas teorías. [2]

Bifidobacterias.

La taxonomía del género *Bifidobacterium* es la siguiente: [10]

- Dominio: *Bacteria*.
- Linaje: *Firmicutes*
- Clase: *Actinobacteria*
- Subclase: *Actinobacteridae*
- Orden: *Bifidobacteriales*
- Familia: *Bifidobacteraceae*

La familia *Bifidobacteraceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*. Existen hasta la fecha 78 especies válidas y publicadas de *Bifidobacterium* y su morfología consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Son Gram positivas y anaerobias, algunas especies de bifidobacterias pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO₂. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35-39°C. [10, 11]

Las bifidobacterias se encuentran normalmente en el tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas concentraciones de acuerdo a la edad. Son un grupo grande de bacterias saprófitas (conjunto de bacterias que viven en el intestino) que se relacionan con la mejora del proceso de digestión, con una disminución de la incidencia epidemiológica de alergias, con la prevención en el desarrollo de algunos tumores, entre otras funciones. Fueron conocidas hasta 1960 como *Lactobacillus bifidus*. [3,

10]

Algunas bacterias son utilizadas como probióticos debido al conjunto de efectos benéficos que se han podido observar mediante varios experimentos. Por esta razón, junto con los lactobacilos, son los dos tipos de bacterias que se encuentran con más frecuencia en los alimentos probióticos, medicamentos y suplementos alimenticios. [3]

Algunas investigaciones sugieren que los microorganismos probióticos, específicamente las bifidobacterias, pueden tener múltiples y distintas ventajas sobre el organismo humano que aún se encuentran en investigación. La Universidad de Parma en Italia ha descubierto recientemente el modo de anclaje de la bacteria *Bifidobacterium bifidum* en nuestro sistema digestivo mediante apéndices proteicos que le permiten anclarse a los enterocitos (células epiteliales del intestino). Existen principalmente tres tipos de apéndices con diferentes funciones, los flagelos, las fimbrias y los pili. Los primeros son los más largos y son utilizados para el desplazamiento o para generar corrientes y atraer los nutrientes, los segundos junto con los terceros son estructuras más cortas y finas que los flagelos, pero las fimbrias tienen una función de adhesión y los pili son utilizados para la conjugación bacteriana (método de intercambio de información genética entre bacterias); sin embargo, en éste descubrimiento se ha visto que los pili son utilizados por ésta bacteria para adherirse a los intestinos y comenzar la colonización y además, se han descubierto hasta 3 tipos diferentes de pili, cada uno con una determinada función y con diferentes patrones de expresión. [4]

Se ha clasificado la eficacia de las bifidobacterias por la Natural Medicines Comprehensive Database como posiblemente eficaz para tratar problemas del organismo como estreñimiento, infección por *Helicobacter pylori*, síndrome del intestino irritable, enterocolitis necrotizante (tipo de infección en el revestimiento del intestino causada por bacterias), pouchitis (complicación posterior a la cirugía por colitis ulcerosa), infecciones pulmonares, diarrea por rotavirus, diarrea del viajero y colitis ulcerosa. También se han clasificado dentro de insuficiente evidencia para hacer una determinación a lo relacionado con el tratamiento de diarrea causada por antibióticos, eccema (picazón e inflamación de la piel),

infecciones relacionadas con el tratamiento quimioterapéutico, colesterol alto, desarrollo infantil, alergia al polen del cedro japonés, prevención de las infecciones después de la exposición a la radiación, resfriado común, gripe, problemas del hígado, intolerancia a la lactosa, mastitis, paperas, cáncer, problemas estomacales, reemplazo de bacterias benéficas que han sido eliminadas por la diarrea, enfermedad de Lyme, envejecimiento y entre otras afecciones. ^[5]

Un estudio efectuado en Francia evaluó la eficacia de *B. animalis ssp lactis* Bb12 en la prevención de diarrea aguda en 90 lactantes menores de 8 meses de edad, De ellos, 46 lactantes recibieron la fórmula con el probiótico y los otros 44 sirvieron de control. Se obtuvo que de los lactantes que recibieron el probiótico, 28.3% experimentaron episodios de diarrea con número de días por episodio de 1.2 ± 2.5 y de los lactantes que no recibieron el probiótico, 38.7% experimentaron episodios de diarrea con duración en número de días por episodio de 2.3 ± 4.5 . Estos resultados apoyan la hipótesis de que *B. animalis ssp lactis* Bb12 otorga protección frente a la diarrea aguda. ^[6]

Existen algunas interacciones moderadas con medicamentos como los antibióticos, al reducir las bacterias patógenas, también pueden llegar a disminuir las bacterias benéficas o al administrarse los dos juntos, la eficacia de las bifidobacterias se puede reducir. No existe interacción alguna con hierbas y suplementos alimenticios ni con alimentos. ^[5]

Identificación de bacterias.

Es una labor importante de la microbiología, la aplicación de una metodología precisa que permita la identificación de los microorganismos implicados en procesos clínicos asociados a infecciones o de aquellos con tienen alguna relación con el humano.

Existen tres tipos principales de identificación que son los métodos fenotípicos, los moleculares y los proteómicos. Los primeros se basan en la comparación de las

características fenotípicas de bacterias desconocidas con las de cultivos tipo, la fiabilidad de la identificación está en proporción directa al número de características similares. Dentro de este método se encuentran las pruebas de catalasa, oxidasa, hidrólisis del hipurato, β -galactosidasa, aminopeptidasa, LAP, ureasa, indol, óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, agar hierro de Kligler, Fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, ADNasa, hidrólisis de la esculina, lipasa, prueba de CAMP, entre otras. [3]

Los métodos moleculares se han considerado como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos. En la década de los 80, comenzó una búsqueda de candidatos que permitieran establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S y sus espacios intergénicos. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada, útil para la detección de bacterias, proporciona información relevante y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas; de esta forma, la identificación mediante el ARNr 16S se fundamenta en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. [3]

Finalmente, la proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas y las más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas. Dependiendo del objetivo de estudio, las técnicas pueden agruparse en tres grupos principales que consisten en las técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas, las técnicas usadas para analizar individualmente las proteínas y las técnicas que se usan para estudiar interacciones entre proteínas. [3]

En muchos países, las bifidobacterias son cada vez más utilizadas en la elaboración de productos fermentados; sin embargo, se requiere de estudios dirigidos a la caracterización de estos microorganismos pero la recuperación de

este grupo bacteriano requiere de condiciones especiales para su crecimiento y aislamiento y la identificación con base a sus características fenotípicas, no muestra resultados confiables debido a que son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos, los cuales han podido ser desarrollados y mejorados gracias a la biología molecular. [12]

Los métodos genotípicos de tipificación 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 relacionados clonalmente debido a la rapidez para obtener resultados en 24 horas, a su alta especificidad, sensibilidad y fiabilidad en la detección. [12]

El descubrimiento de la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas moleculares. [12]

Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada para copiar un fragmento de ADN *in vitro* varias veces haciendo uso de la enzima polimerasa. La primer polimerasa termoestable y la más utilizada en la actualidad, fue la proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*, la cual puede trabajar a elevadas temperaturas debido a los medios en donde vive (79°C a 85°C). De ahí su nombre, *taq* polimerasa. [13]

Existen otras polimerasas termoestables, termoactivas y de alta fidelidad provenientes de bacterias del dominio *Archaea*: [14]

- Enzima *rTth* del organismo *T. thermophilus*.
- Enzima *Tft* del organismo *T. flavus*.
- Enzima *Tbr* del organismo *T. Brockianus*.

- Enzima *U/Tina* del organismo *Thermotoga marítima*.
- Enzima *rBst* del organismo *Bacillus sterothermophilus*.
- Enzima *Pwo* del organismo *Pyrococcus woesei*.
- Enzima *Tli* del organismo *Thermococcus litoralis*.
- Enzima *DeepVent* del organismo *Pyrococcus strain* GB-D.
- Enzima *Pfu* del organismo *Pyrococcus furiosus*.

Generalmente, para la identificación de microorganismos, un fragmento de ADN que será amplificado codifica para una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1500 pares de bases. El ARN ribosómico 16S es un polirribonucleótido que permite establecer las relaciones filogenéticas y taxonómicas entre las procariotas y puede revelar la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, son secuencias específicas cortas que aparecen en todos los miembros de un determinado grupo filogenético y nunca (o raramente), estarán presentes en otros grupos. ^[15]

Existen algunas características relevantes del ARNr 16S que permiten su utilización como herramienta filogenética: ^[15]

1. Es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, lo que la vuelve un diana universal para su identificación.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan cambios aleatorios.
3. Estos cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todas las procariotas.
4. El tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nucleótidos), minimiza las fluctuaciones estadísticas.
5. La conservación en su estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
6. Existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento debido a la relativa facilidad para su secuenciación.

La técnica de PCR permite la amplificación del fragmento del ADNr 16S gracias a la reacción en cadena de la polimerasa. Para esto, se requiere tener en un tubo todos los ingredientes necesarios para llevar a cabo esta reacción: la polimerasa, el ADN con el fragmento deseado, los oligonucleótidos iniciadores o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfato, magnesio en forma de $MgCl_2$, y las condiciones óptimas para que la enzima pueda llevar a cabo su función (pH, KCl y otras sales o reactivos dependiendo de la polimerasa). Se debe considerar que para poder llevar a cabo el experimento de amplificación, es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte del gen, una región no codificadora, etc.). [3, 16, 17]

Una vez que los tubos se encuentran preparados, se colocan en un termociclador que básicamente funciona variando la temperatura de forma precisa para lograr la desnaturalización, la cual se consigue elevando la temperatura del tubo entre $94^{\circ}C$ y $95^{\circ}C$ y consiste en la separación de las dobles cadenas de ADN obteniendo cadenas sencillas. Posteriormente, en la etapa de alineamiento, el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo de $40^{\circ}C$ - $60^{\circ}C$ para formar y romper constantemente los puentes de hidrógeno entre los primers y el ADN y aquellas uniones más estables (las complementarias), durarán mayor tiempo dejando los primers alineados formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa (polimeriza 1000 bases en un minuto), se unirá a este fragmento de ADN y comenzará a copiar en sentido 5' a 3' donde se agregan las bases faltantes y los puentes de hidrógeno se forman entre las bases. Después la temperatura sube a $72^{\circ}C$ para que la polimerasa alcance su máxima actividad y continúe la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los primers que ya se habían alineado; esta etapa se conoce como elongación o extensión. Estos tres pasos conforman un ciclo y varios ciclos permitirán obtener millones de copias del fragmento de interés. [13, 16]

Las regiones con alto contenido de guanina /citosina (GC) representan un desafío en técnicas de PCR convencional, ya que las secuencias ricas en GC son más estables que las secuencias con menor contenido de GC debido a que la guanina

y la citosina se unen mediante tres puentes de hidrógeno y la timina y la adenina se unen mediante dos puentes de hidrógeno. Además, las secuencias ricas en GC tienden a formar estructuras secundarias, tales como bucles. Esto da como resultado que las cadenas dobles ricas en GC sean difíciles de separar por completo durante la fase de desnaturalización y en consecuencia, la ADN polimerasa tendrá impedimentos para sintetizar las nuevas hebras. Aumentar la temperatura de desnaturalización puede ayudar a mejorar esto y hacer ajustes hacia una temperatura de unión más alta y un tiempo de unión más corto pueden evitar la unión inespecífica de primers ricos en GC. Ciertos reactivos adicionales pueden mejorar la amplificación de secuencias ricas en GC. El DMSO, el glicerol y la betaína ayudan a interrumpir las estructuras secundarias que son causadas por las interacciones GC y por lo tanto, facilitan la separación de las cadenas dobles. [17]

Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis permite analizar de manera eficaz los fragmentos obtenidos en PCR, ya que permite la separación de los fragmentos en función de su carga, tamaño y forma. Es un método de separación especialmente eficaz para las biomoléculas cargadas como el ADN, el ARN y las proteínas. [16]

La agarosa es un polisacárido lineal de galactosa y 3,6-anhidrogalactosa que se deriva del agar que se utiliza en conjunto con hidrocoloides que favorecen la transparencia del gel y lo vuelven resistente. El gel preparado, contiene capilares microscópicos que actúan como un tipo de tamices moleculares y van a determinar la velocidad de migración de las moléculas, siendo de esta forma que las moléculas de menor tamaño tendrán una mayor velocidad de migración en comparación con las moléculas de mayor tamaño que van a migrar a menor velocidad. La velocidad de migración se encuentra también afectada por la forma de las moléculas, ya que aquellas con forma más compacta (redondeada) van a migrar más rápidamente. [18]

Para preparar las muestras para electroforesis, se mezclan con componentes que les agregan densidad como el glicerol o la sacarosa y así las muestras pueden colocarse por medio de una micropipeta o pipeta de transferencia en las rendijas visibles en el gel con la ayuda de una plantilla y debido a la densidad, las muestras se sumergen en la solución tampón y permanecen en los pocillos. La solución tampón utilizada, además servirá para conducir la electricidad y para controlar el pH, el cual tiene influencia sobre la carga y estabilidad de las moléculas biológicas. ^[18]

El equipo se conecta a una fuente de corriente continua directa y se somete a tensión. Las moléculas cargadas contenidas en las muestras, penetran en los capilares del gel y aquellas moléculas cargadas negativamente, van a migrar hacia el electrodo positivo (ánodo) y las cargadas positivamente, migrarán hacia el electrodo negativa (cátodo). Así mismo, cuanto más fuerte sea el campo eléctrico, más rápida será la migración de las moléculas. ^[18]

Factores como la carga, el tamaño y la forma de las moléculas, así como las características del tampón de electroforesis, la concentración del gel y la potencia eléctrica, tendrán un impacto sobre la movilidad de las moléculas en el gel de electroforesis. Además, distintas moléculas de las muestras pueden interactuar de manera distinta con la agarosa y así, cuanto menos simple sea la interacción, más lenta será la migración de las moléculas. ^[18]

Para poder llevar a cabo el proceso de electroforesis en gel de agarosa, será necesario contar con el equipo necesario: cámara para electroforesis, fuente de poder, un transiluminador de luz UV y un equipo de fotografía para guardar la imagen del gel. ^[16]

Secuenciación.

La secuenciación del ADN implica determinar el orden de nucleótidos que conforman esta molécula para conocer la información relacionada con el

fragmento de ADN que se está secuenciando, como la similitud o variación genética entre especies, mapeo genético o estudios filogenéticos. ^[19]

Con todos los hallazgos que se dieron a lo largo de la historia, se pudieron desarrollar nuevos métodos como la secuenciación denominada NGS o de segunda generación que es un tipo de secuenciación masiva paralela que permite obtener información genómica de cientos de moléculas de ADN en un solo ensayo y a menor costo, además tiene la capacidad de detectar todos los tipos de variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones y variantes estructurales tanto equilibradas como desequilibradas. ^[20, 21]

El esquema principal de trabajo es: el ADN se fragmenta y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos, posteriormente, los fragmentos de ADN se amplifican clonalmente y se agrupan juntos para ser utilizados como entidades a secuenciar. La secuenciación se realiza así alternando ciclos de terminación reversible cíclica que utiliza terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados con fluorescencia que a continuación son fotografiados y procesados. ^[22]

Actualmente son tres las tecnologías de NGS más utilizadas con los instrumentos: 454 GSFlex de Roche, Genome Analyzer o HiSeq de Illumina y SOLiD de Life Technologies. La primera plataforma se basaba en la técnica de pirosecuenciación y conseguía inicialmente lecturas simples de 100/150 pares de bases hasta completar 200 Mb de secuencia y después de diversas modificaciones, consiguió alcanzar longitudes de lectura de 700 pb con un volumen total de secuencia de 14 Gb. La segunda plataforma (HiSeq de Illumina) utiliza la tecnología de secuenciación por síntesis y puede conseguir lecturas de 2x300 pb hasta 15 Gb y 25 millones de lecturas o lecturas de 2x150 pb hasta 1800 Gb y 6000 millones de lecturas. La tercera plataforma (SOLiD de Life Technologies) está basada en la tecnología de secuenciación por ligación y codificación por dos bases, inicialmente producía 3 Gb de lecturas de 35 pb pero actualmente consiguen hasta 300 Gb y lecturas pareadas de 2x75 pb con una precisión del 99.9%. ^[21]

En 2010, Ion Torrent de Thermo Fisher comercializó su sistema que incorporaba la tecnología de semiconductores y no dependía del uso de fluorescencia, sino de los cambios de pH producidos cuando se libera un protón al incorporarse una molécula de ADN. ^[21]

Una de las ventajas al trabajar con secuencias es que el ADN se encuentra en todas las células de los organismos y se puede recuperar de tejido vivo o muerto. La mayoría de las fuentes de las que es posible extraer ADN, se puede recolectar fácilmente. Además, la molécula de ADN es lo suficientemente estable para permanecer intacta por muchos años bajo las condiciones adecuadas. ^[23]

Una vez que el fragmento de ADN ha sido secuenciado, se procede al alineamiento de secuencias. Este paso consiste en la comparación de distintas secuencias de una base de datos, mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de correspondencias entre secuencias relacionadas, en este paso se hipotetizan relaciones de homología entre los nucleótidos de cada posición y al no ser un término cuantitativo, será una inferencia sobre la relación ancestral hecha a base de comprobar que existe un grado de similitud suficientemente alto entre las secuencias comparadas, ésto será el fundamento para la reconstrucción filogenética. ^[23, 24]

Por otra parte, la similitud de secuencias mide el porcentaje de residuos alineados que son similares en cuanto a propiedades fisicoquímicas como tamaño, carga e hidrofobicidad, éste si es un término cuantitativo al ser un resultado directo del alineamiento de secuencias y se cuantifica utilizando porcentajes. ^[24]

Los alineamientos tienen múltiples aplicaciones como entender la similitud o variación genética entre especies diferentes, conocer la función de los genes, encontrar dominios funcionales, comparar un gen y su producto, entre muchos otros; pero los relacionados con este trabajo son: asegurarse de que dos secuencias son similares y se pueda cuantificar su similitud, verificar si se logró secuenciar el fragmento que se esperaba y si la forma de obtención fue la adecuada. ^[23, 24]

Antecedentes.

El género *Bifidobacterium* es de gran importancia por sus beneficios en el organismo humano y relevancia en el campo de la investigación para el descubrimiento de nuevas aplicaciones; es por esto, que la identificación apropiada constituye un punto de partida importante para poder confirmar la identidad de la cepa y así poder relacionar al microorganismo con la información que ya se conoce y predecir algunas de sus propiedades. Existen diversas técnicas para llevar a cabo la identificación; sin embargo, los análisis de las secuencias del gen 16s rARN son los más utilizados debido a su alta reproducibilidad e intercambio de datos. ^[25]

Bifidobacterias como *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* y *B. animalis* constituyen el grupo más importante de bacterias sacarolíticas del intestino grueso hasta en un 25% en el colon del adulto y un 95% en el del recién nacido alimentado con leche materna. Este grupo de bacterias no forman aminas alifáticas, derivados sulfurosos ni nitritos, producen vitaminas (especialmente del grupo de la vitamina B), enzimas digestivas, ácidos grasos de cadena corta (como acetato y lactato) que ayudan a disminuir el pH intestinal con efectos antibacterianos y además, funcionan éstos, como combustible para el colonocito y para intervenir en el metabolismo hepático. Aproximadamente, un 30% de *Bifidobacterium bifidum* se puede recuperar en las heces. ^[2]

En el año de 1996 fue publicado un artículo en los Países Bajos sobre la investigación de un diseño de primers para PCR que pudieran reconocer específicamente la presencia *Bifidobacterium* sp. cepa LW420 y mediante alineamiento de secuencias, se identificaron tres sitios posibles para los primers. Se probaron dos pares de primers (LW420A/LW420D y LW420C/LW420D) en PCR utilizando ADN aislado de 20 cepas diferentes pertenecientes a 11 especies de bifidobacterias y se observó que sólo cuando LW420 era adicionada, era detectado el fragmento de PCR específico para esta cepa. Con esto se demostró

que el par de primers probados podían ser utilizados para reconocer específicamente la cepa LW420 en muestras heterogéneas de heces de niños. [26]

En 1997, en Suiza, se publicó un artículo en el cual se diseñó un oligonucleótido específico para el género *Bifidobacterium* mediante alineamiento de secuencias y se seleccionaron dos sitios posibles para los primers. Así, se diseñaron los pares de primers Im3/Im26 y fueron alineados con todas las secuencias bacterianas obtenidas de EMBL/GenBank y se reveló que los genes 16S rRNA de todas las especies de *Bifidobacterium* no mostraron discrepancia con la secuencia del primer Im3. Por medio de PCR, se identificaron bifidobacterias con los primers Im3/Im26 al obtener una banda distintiva de 1.35 kb, el cual representa el tamaño del fragmento 16S rDNA amplificado por PCR. [27]

En Irlanda, en el año 1997 se publicó un review en donde se menciona que Frothingham *et al.* propusieron sitios potenciales para una sonda género específico en las posiciones 1277-1293 pb en 16S rRNA para hibridar específicamente con bifidobacterias. Langendijk *et al.* desarrollaron sondas género específicas 16S rRNA de hibridación para bifidobacterias, en donde la sonda Bif164 que fue diseñada se utilizó para determinar la población de especies de *Bifidobacterium* en heces humanas independientes de la forma de cultivo utilizada. [28]

En 1999, ya se habían hecho múltiples investigaciones sobre la identificación de miembros del género *Bifidobacterium* utilizando los primers diseñados por Kok y colaboradores (Bif164) para alimentos principalmente y por Kaufmann y colaboradores (Im3) para muestras de heces principalmente. Estos primers amplifican regiones de 523 pb o 1.35 kb del 16S rRNA, respectivamente. [29]

Para el año 2000, se publicó un artículo en China sobre el desarrollo de un método que no sólo trabajaba rápidamente sino que también era muy preciso. Este método se desarrolló mediante el diseño de 5 primers especie-específicos aislados de intestino humano para las especies *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. breve* y *B. longum*. Cada primer era único para reconocer sólo una

especie en diferentes posiciones del 16S rRNA. Los primers diseñados fueron PB1245f, PBR442f, PIN710f, PAD805f y PLO965f. Cada primer difería en especificidad, siendo el más específico el primer PBR442f que no produjo ningún producto inespecífico, mientras que el primer PIN107f producía señales bandas muy débiles aún incrementando la concentración del primer y también producía reactividad cruzada con ADN de *B. adolescentis* y *B. longum*.^[30]

En el año 2006 en la República Checa, se evaluó la técnica de PCR para identificación y caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* en humanos junto con las especies *B. lactis* y *B. animalis* mediante el uso de los primers género-específicos PbiF1/PbiR2 y Bif164/Bif662 dirigidos a la región del 16S rRNA. Con esto se obtuvo que 16 cepas diferentes de bifidobacterias mostraron productos como resultado de una PCR género-específica pero se observó reactividad cruzada con los primers PbiF1/PbiR2 para la identificación de *B. catenulatum* y *B. pseudocatenulatum* con *B. adolescentis* CCM 3761. Los primers Bif164/Bif662 fueron incapaces de amplificar productos de PCR con *B. animalis*, *B. lactis* y *B. gallicum*.^[31]

En el Departamento de Alimentación y Nutrición del Instituto de Investigación de Ecología Humana de Corea, en el año 2007 se publicó un artículo donde se evaluaron 37 pares de primers para PCR previamente reportados y diseñados para amplificar 16S rRNA, 23S rRNA, regiones intergénicas y secuencias de ADN repetitivo de varias especies del género *Bifidobacterium* y se obtuvo que 10 de 37 primers probados para 8 especies diferentes, mostraron especificidad para *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. longum* biovar *infantis* y *B. dentium* mostrando amplicones del tamaño esperado y así se sugiere que los primers publicados para la identificación del género *Bifidobacterium* deberían ser re evaluados en cuanto a reproducibilidad y especificidad.^[32]

El uso de métodos moleculares ha permitido avances significativos en la detección e identificación de bifidobacterias en heces humanas y otros entornos. Dado que la secuencia del gen del ARNr 16S está altamente conservada entre los géneros,

no siempre permite una distinción clara entre las especies. Por lo que también se ha utilizado el gen *xfp* que codifica para la enzima xilulosa-5-fosfato / fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa.^[33, 34]

Objetivos.

Objetivo general.

Establecer condiciones de PCR para optimizar la identificación molecular de especies del género *Bifidobacterium* presentes en diferentes muestras de laboratorio.

Objetivos específicos.

1. Optimizar el método de extracción de ADN de bifidobacterias, presentes en medios de cultivo líquidos y sólidos.
2. Estandarizar condiciones de PCR para identificar bifidobacterias utilizando primers específicos de género.
3. Purificar y secuenciar los fragmentos obtenidos.

Metodología.

1. Activación de cepas en medio de cultivo TPY con inulina.

En este paso se llevó a cabo la activación de 6 especies diferentes del género *Bifidobacterium* marcadas con los siguientes códigos:

Tabla 1. Cepas del género *Bifidobacterium* que fueron activadas en medio de cultivo TPY con inulina.

Código
Cepa A
Cepa B
Cepa C
Cepa D
Cepa E
Cepa F
Cepa G

El medio de cultivo TPY con inulina tenía siguiente composición (g/L):

- Inulina 5
- Peptona de soya 5
- Peptona de caseína 10
- Extracto de levadura 2.5
- Tween 80 1 mL
- L.cisteína.HCl 0.5
- $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ 0.5
- $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0.25
- $FeCl_3$ 0.003
- K_2HPO_4 2
- $CaCl_2$ 0.15

Se utilizaron viales para adicionar 40 mL de medio TPY-I a cada uno e incubar a 37°C por 20 horas y posteriormente se hizo tinción de Gram de cada uno de los cultivos. Se procedió a la identificación molecular de las cepas que presentaron las mejores características morfológicas durante la tinción y las cepas con morfología dudosa, se sembraron en placas de petri para aislar una colonia y con ella volver a inocular el medio de cultivo

2. Extracción de ADN de bifidobacterias provenientes de diversos orígenes por el método fenol-cloroformo y por kit QIAamp QIAGEN.

Se llevó a cabo la lisis celular de bifidobacterias para la extracción y purificación de su material genético, utilizando muestras de diversos orígenes:

- Contenido intestinal de Ratas Wistar con daño hepático y administradas con probióticos y prebióticos.
- Bifidobacterias obtenidas de cultivos sólidos.
- Bifidobacterias obtenidas de cultivos líquidos.

Para la extracción de ADN de diversas especies del género *Bifidobacterium*, se utilizaron 2 métodos diferentes: extracción de ADN por medio del método fenol-cloroformo y extracción de ADN por medio de un kit QIAamp QIAGEN.

Para el método fenol-cloroformo, se ensayaron dos diferentes concentraciones de lisozima para seleccionar la que haya presentado mejores resultados (bandas nítidas, definidas e intensas) en cuanto al análisis por medio de electroforesis en gel de agarosa. El procedimiento utilizado es el que se presenta a continuación:

A partir de un cultivo en agar MRS-C de 2 diferentes orígenes (cultivo puro y producto entérico) se tomaron aproximadamente 2 colonias con un asa bacteriológica estéril para cada uno de los 2 tubos que se tenían y se resuspendieron en 1 mL de regulador TE pH 8.0, posteriormente se centrifugaron a 5,000 rpm/5 minutos.

El paquete celular se resuspendió en 250 μ L del mismo regulador, se agitó en vórtex y se procedió a la lisis celular agregando 100 μ L de SDS al 10% + 40 μ L de proteinasa K [20 mg/mL] + 50 μ L lisozima [20 mg/mL] para el primer tubo (marcado posteriormente como L1 FA) y 50 μ L lisozima [50 mg/mL] para el segundo tubo (marcado como L2 FA), se incubó 1 hora a 37°C (mezclando la solución cada 20 minutos aproximadamente).

Después de la incubación, se centrifugó a 12,000 rpm/15 minutos, el sobrenadante se recuperó en 2 tubos nuevos, se agregó 1 μ L de RNAsa y se incubó a 37°C por 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se agregó 1 volumen de fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0, se mezcló por inversión 5 veces y se centrifugó a 5,000 rpm/5 minutos, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se agregó 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 5,000 rpm/5 minutos.

Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto frío + 1/10 de acetato de sodio 3M, se incubó a -20°C al menos 30 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm/20 minutos a 4°C, el pellet se lavó con etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm/5 minutos a 4°C, se evaporó el etanol durante 5 minutos y por último el ADN se resuspendió en 50 μ L de agua inyectable.

Para la extracción de ADN por medio del kit QIAamp QIAGEN, se utilizaron los pasos establecidos en el manual "QIAamp ADN mini kit and QIAamp ADN blood mini kit":

Se tomaron 1.5 mL y se centrifugaron a 5000 rpm/10 minutos, se agregaron 50 μ L lisozima [20 mg/mL] + 130 μ L de regulador TE y se incubó a 37°C/30 minutos. Posteriormente se agregaron 20 μ L de proteinasa K + 200 μ L de buffer AL, se mezclaron con vórtex y se incubó a 56°C/30 minutos e inmediatamente después a 95°C/15 minutos y al finalizar, se centrifugó por unos segundos. Se agregaron 200 μ L de etanol absoluto frío y se mezcló en vórtex por 15 segundos, se pasó la mezcla a una columna del kit, se centrifugó a 8000 rpm/1 minuto, se retiró el tubo de recolección y se cambió por uno nuevo para añadir 500 μ L de buffer AW1, se

centrifugó a 8000 rpm/1 minuto y el tubo de recolección se vació para poder añadir 500 μL de buffer AW2 y centrifugar a 12000 rpm/3 minutos. Posterior a ésto se desechó el líquido del tubo de recolección, se centrifugó a 12000/3 minutos, la columna se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se añadieron 150 μL de buffer AE y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto para centrifugar después a 8000 rpm/1 minuto.

3. Cuantificación de ADN proveniente de diversas muestras.

La cuantificación del ADN, se llevó a cabo por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000, con el cual se obtuvieron los siguientes valores:

- Concentración de ADN en la muestra en $\text{ng}/\mu\text{L}$.
- Pureza del ADN de acuerdo a la relación A260/A280

Para que una muestra pueda considerarse de “pureza óptima”, el valor en la relación A260/280 debe ser entre 1.8-2.0, para que sea considerada de pureza aceptable debe tener una relación >1.6 y un valor <1.6 indica posible contaminación por compuestos como fenoles y proteínas. Un valor >2.1 podría deberse a la presencia de ARN en la muestra. ^[16]

4. Amplificación e identificación de las muestras por medio de la técnica PCR.

Para la identificación de bifidobacterias, se utilizaron los primers específicos de género (Im3 y Im26) y para amplificar un fragmento del gen de la enzima xilulosa-5-fosfato / fructosa-6-fosfato fosfocetolasa (xfp1 y xfp2) (Tabla 2).

Se prepararon diluciones de cada muestra a analizar en agua inyectable para obtener 50 μL totales con concentración de 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de cada muestra de ADN.

Tabla 2. Primers utilizados en este trabajo. [27, 35]

Primers	Secuencia 5'-3'
Im3	CGG GTG CTI CCC ACT TTC ATG
Im26	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG
xfp1	ACC TAT GCC AAC ATC AAA CCC TGA ATG CA
xfp 2	ATG TGC TGC CGT CCG ACT TGC ATG

Se utilizaron los siguientes componentes y cantidades para todas las reacciones de amplificación:

- 25 µL de PCR Master Mix (0.05 U/µL de *Taq* ADN polimerasa, buffer de reacción, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP).
- 1 µL primer forward
- 1 µL primer reverse
- 1 µL de ADN molde
- 22 µL agua inyectable

Los ensayos de PCR fueron realizados utilizando diversas condiciones y ciclos de amplificación. (Tabla 3).

Tabla 3. Diferentes condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de ADN de bifidobacterias.

	Condiciones 1	Condiciones 2	Condiciones 3
Desnaturalización	94°C / 5 minutos	94°C / 5 minutos	94°C / 5 minutos
Desnaturalización	94°C / 1 minuto	94°C / 1 minuto	94°C / 1 minuto
Alineamiento	57°C / 1 minuto	57°C / 1 minuto	57°C / 3 minutos
Extensión	72°C / 1 minuto	72°C / 1 minuto	72°C / 5 minutos
Extensión	72°C / 5 minutos	72°C / 5 minutos	72°C / 5 minutos
Número ciclos	35	30	25

5. Análisis de ADN y reacciones de PCR por medio de electroforesis en geles de agarosa.

La integridad del ADN perteneciente a muestras de diversos orígenes se verificó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% así como los fragmentos amplificados por PCR. Cada una de estas muestras tenían la siguiente composición:

- 1 μ L de muestra
- 4 μ L de buffer TAE 1X
- 1 μ L de colorante Blue/Orange 6X (Promega)
- 1 μ L de RedGel[®]

En el primer carril de todos los geles para electroforesis, se colocó 1 μ L de marcador 1 Kb (Invitrogen).

El voltaje para la electroforesis se ajustó a 80 volts y el resultado final se observó en un transiluminador.

6. Secuenciación de muestras seleccionadas.

Se seleccionaron las muestras que una vez amplificadas por PCR, presentaron una sola banda nítida, definida e intensa, las muestras fueron precipitadas con 3 volúmenes de etanol absoluto frío y 1/10 de acetato de sodio 3M y se dejaron reposar por 24 horas. El DNA precipitado se resuspendió en 50 μ L de agua inyectable y se cargó en geles de agarosa preparativos, cada banda se cortó del gel y se llevó a cabo la purificación por medio del kit *QIAquick PCR Purification* con el siguiente procedimiento:

Cada banda cortada del gel se depositó en tubos diferentes con buffer QG en cantidades equivalentes a 3 veces el peso de la banda, se incubó a 50°C por 10

minutos (agitando en vórtex cada 2 minutos) para disolver la banda en el buffer, se adicionaron cantidades de isopropanol equivalentes al peso de la banda, se transfirió la mezcla a una columna para centrifugar a 12000 rpm/1 minuto y desechar los residuos para posteriormente lavar con 750 μ L de buffer PE dejando reposar por 5 minutos, se centrifugó a 12000 rpm/1 minuto, se desechó el residuo y se centrifugó nuevamente. Finalmente se pasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se agregaron 50 μ L de agua inyectable y se dejaron reposar por 4 minutos para centrifugar a 12000 rpm/1 minuto.

La integridad del ADN extraído se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa y se prepararon las muestras para el proceso de secuenciación de acuerdo a las indicaciones establecidas por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México y así poder ser enviadas para el proceso.

Resultados y discusión.

1. Activación de cepas en medio de cultivo TPY con inulina.

Se llevó a cabo la activación de 6 especies diferentes del género *Bifidobacterium* (Tabla 1). Posteriormente, el ADN de cada una de estas muestras fue extraído por el método fenol-cloroformo y cuantificado por espectrofotometría como se muestra en la Tabla 3.

2. Extracción de ADN de bifidobacterias provenientes de diversos orígenes por el método fenol-cloroformo y por kit QIAamp QIAGEN.

Para la extracción de ADN de diversas especies del género *Bifidobacterium*, se utilizaron 2 métodos diferentes: método fenol-cloroformo por medio de un kit QIAamp QIAGEN.

Las muestras que fueron extraídas por el método fenol cloroformo, se muestran en la Tabla 2 y las muestras que fueron extraídas por medio de kit QIAamp QIAGEN, se muestran en la Tabla 4 corregir numeración con sus respectivas concentraciones y pureza (relación A260/A280).

3. Cuantificación de ADN, por medio de espectrofotometría, proveniente de diversas muestras.

La cuantificación del ADN purificado se llevó a cabo por medio de un espectrofotómetro NanoDrop 2000, con el cual se obtuvieron los siguientes valores:

- Concentración de ADN en la muestra en ng/ μ L.
- Pureza del ADN de acuerdo a la relación A260/A280

Las muestras del 1 al 41 son de ADN proveniente del contenido intestinal de ratas sometidas a daño hepático y administradas con probióticos y prebióticos. Se

muestra unicamente el código del grupo experimental por colores (azul cielo, azul marino, rojo, amarillo, verde, café). [36]

Tabla 4. Cuantificación de ADN, por medio de espectrofotometría, de las muestras obtenidas a partir de extracción por el método fenol-cloroformo.

Número de muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza Relación A260/A280	Origen de la muestra
1	42.7	1.78	Grupo azul cielo.
2	32.4	1.79	
3	20.4	1.88	
4	20.7	1.86	
5	28.7	1.77	
6	18.9	1.78	
7	19.1	1.94	
8	0.027	2.42	Grupo azul marino.
9	0.027	4.19	
10	0.044	3.77	
11	0.038	5.23	
12	0.031	3.94	
13	0.036	2.45	
14	0.039	2.25	
15	16.8	1.89	Grupo rojo.
16	15.6	1.78	
17	26.9	1.90	
18	19.3	1.97	
19	22.4	1.91	
20	16.6	1.79	
21	2.7	1.67	
22	2.2	1.69	Grupo amarillo.
23	4.4	2.16	
24	2.8	1.81	
25	2.8	2.40	
26	3.4	2.27	
27	1.9	2.77	
28	19.6	1.87	
29	9.8	1.98	
30	37.0	1.84	
31	9.1	1.95	
32	2.0	1.78	
33	2.6	2.68	
34	2.6	2.68	
35	86.6	0.72	Grupo café.
36	95.1	0.70	
37	96.6	0.66	
38	112.3	0.81	
39	98.2	0.70	
40	121.9	0.79	
41	85.6	0.70	
42	213.4	1.58	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de bifidobacterias empleando para

			la extracción, lizozima con concentración de 20 mg/mL.
43	223.5	1.57	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de bifidobacterias empleando para la extracción, lizozima con concentración de 50 mg/mL.
44	194.9	1.82	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido con recubrimiento o cultivo protegido.
45	266.8	2.08	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido sin recubrimiento o cultivo original.
46	194.9	1.82	Muestra de ADN proveniente de lactobacilos para ser utilizado como control negativo.
47	249.6	1.79	Muestra de ADN proveniente de un cultivo líquido de la cepa G.
48	119.5	1.59	Muestra de ADN proveniente de un cultivo líquido de la cepa A.
49	224.5	1.56	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa A.
50	289	1.54	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa B.
51	405.4	1.57	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa C.
52	315.7	1.92	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa D.
53	344.9	1.56	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa E.
54	202.1	1.54	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa F.
55	389.2	1.72	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa G.

Tabla 5. Cuantificación de ADN, por medio de espectrofotometría, de las muestras obtenidas a partir de extracción por kit QIAamp QIAGEN.

Muestra	Concentración (ng/μL)	Pureza Relación A260/280	Origen de la muestra
56	95.2	2.18	Muestra de ADN proveniente de un cultivo sólido de la cepa G.
57	10.4	1.87	Muestras de ADN purificadas a partir de bandas en geles de agarosa.
58	16.6	1.79	
59	2.6	2.01	

En la Tabla 3 se observa que de 55 muestras analizadas (100%) que fueron cuantificadas por espectrofotometría: 15 (27.3%) fueron de pureza óptima, 11 (20%) de pureza aceptable, 15 (27.3%) posibles contaminadas y 14 (25.4%) con posible presencia de ARN. Estos resultados indican que al momento de realizar la extracción por el método fenol-cloroformo, hubo errores durante el procedimiento que no permitieron obtener más que 47.3% de las muestras con pureza aceptable o mejor. Cabe destacar que las muestras 1 - 41, llevaban varios meses en almacenamiento antes de ser analizadas y esto pudo también afectar tanto su concentración como su pureza; sin embargo, las muestras 42-55 fueron cuantificadas casi al mismo tiempo en que se realizó la extracción del ADN, por eso casi el 100% de las muestras son de pureza aceptable o mejor y sus concentraciones son superiores a los 190 ng/μL pero no mayores a 410 ng/μL.

En la Tabla 3 se observa que de 4 muestras analizadas (100%), cuyo ADN fue extraído por medio de un kit QIAGEN: 1 (25%) fue de pureza óptima, 1 (25%) de pureza aceptable y 2 (50%) con posible presencia de ARN. Estos resultados indican que exactamente el 50% de las muestras son de pureza aceptable o mejor, siendo muy cercanos a los resultados obtenidos con el método fenol-cloroformo.

4. Amplificación e identificación de las muestras por medio de la técnica PCR.

Para la amplificación por PCR, se prepararon diluciones de cada muestra a analizar en agua inyectable para obtener 50 μL totales de una solución con concentración de 20 ng/μL de cada ADN.

Las muestras que fueron amplificadas por medio de la técnica PCR, los primers utilizados y las condiciones de amplificación, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de PCR empleadas para la amplificación de ADN proveniente de diversas muestras.

Muestra	Primers	Ciclos				
		1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
		Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión
42	xfp1/xfp2	94°C/5 min.	94°C/1 min.	57°C/1 min.	72°C/1 min.	72°C/5 min.
	lm3/lm26					
43	xfp1/xfp2					
	lm3/lm26					
44	xfp1/xfp2					
	lm3/lm26					
45	xfp1/xfp2					
	lm3/lm26					
		1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo
		Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión
<i>B. infantis</i>	xfp1/xfp2	94°C/5 min.	94°C/1 min.	57°C/1 min.	72°C/1 min.	72°C/5 min.
42	lm3/lm26					
47						
48						
47 (Dil 1:10)						
47 (Dil 1:100)						
47 (Dil 1:1000)						
M2						
M4						
M7						
M16						
<i>B. longum</i>						
56	xfp1/xfp2					
		1 ciclo	25 ciclos			1 ciclo
		Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión
49	lm3/lm26	94°C/5 min.	94°C/1 min.	57°C/3 min.	72°C/5 min.	72°C/5 min.
50						
51						
52						
53						
54						
55						

De 59 muestras que fueron cuantificadas por espectrofotometría, se seleccionaron 23 muestras diferentes de ADN para ser amplificadas por medio de PCR considerando su concentración (ng/μL) y su pureza (relación A260/A280). Se utilizaron para estas muestras el par de primers lm3/lm26 y el par de primers

xfp1/xfp2, así como 3 condiciones diferentes de amplificación en las que en todas se mantuvo la misma temperatura y sólo hubo variación en los números de ciclos y el tiempo de duración de cada etapa.

Cada muestra amplificada se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la etapa 5 del trabajo.

5. Análisis de ADN y reacciones de PCR por medio de electroforesis en geles de agarosa.

La integridad del ADN perteneciente a muestras de diversos orígenes se verificó por medio de electroforesis en geles de agarosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación, se seleccionaron para análisis por electroforesis las muestras 1-7 (grupo azul cielo) y 15-20 (grupo rojo) de la Tabla 3 por presentar mayor concentración y mejor relación A260/A280 en comparación con las otras muestras de este mismo origen. Así mismo se seleccionaron las muestras 35-41 (grupo café) por presentar altas concentraciones a pesar de tener baja relación A260/A280.

Después de realizar electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras 1-7 del grupo azul cielo, se obtuvieron los resultados para el gel que se observan en la figura 1. El carril del marcador presenta escasa diferencia en la intensidad de sus bandas, en los carriles 1, 2 y 5 se observa el ADN degradado por la presencia de un smear o mancha a lo largo del carril pero se observa alta concentración de la muestra por la intensidad de la banda; en los carriles 3, 4, 6 y 7 se observa poca intensidad de las bandas (apenas perceptible) y degradación del ADN.



Figura 1. Muestras de ADN purificado a partir de contenido intestinal grupo experimental azul cielo. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 1-7: muestras analizadas.

Por las concentraciones observadas en el gel, se decidió hacer diluciones de cada una de las muestras con concentración de 10 ng/μL y con esas diluciones, preparar los geles posteriores para electroforesis.

Los resultados para las muestras 1-7 del grupo azul cielo que se obtuvieron utilizando las diluciones, fueron los que se presentan en la figura 2. En el carril del marcador de peso molecular no se logra observar definición de sus bandas al ser borrosas, en los carriles 4 y 7 se observa una sola banda, un poco degradada pero con buena definición de la misma; en los carriles 2 y 5 se observa una sola banda con mayor integridad del ADN aunque un poco débil la intensidad y en los carriles 1, 3 y 6 se obtuvieron bandas muy débiles y prácticamente imperceptibles.

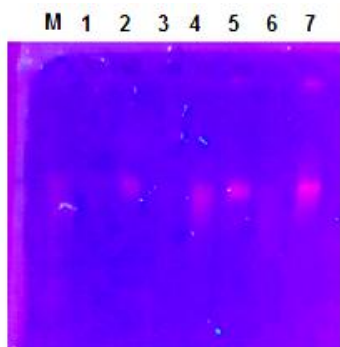


Figura 2. Muestras de ADN purificado a partir de contenido intestinal grupo experimental azul cielo. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 1-7: muestras analizadas.

Se realizó el mismo procedimiento de electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras 15-20 correspondientes al grupo color rojo y los resultados obtenidos en la electroforesis son los presentados en la figura 3. El carril del marcador

presenta bandas curvadas con escasa diferencia de intensidad entre sus bandas, en los carriles 1 y 2 se observan bandas borrosas y extendidas por degradación del ADN pero con alta intensidad de las mismas, lo que indica alta concentración de la muestra; en el carril 3 se observa migración anómala de la muestra pero posible presencia de ADN y en los carriles 4, 5 y 6 no se observa presencia de bandas o son muy débiles para ser perceptibles.

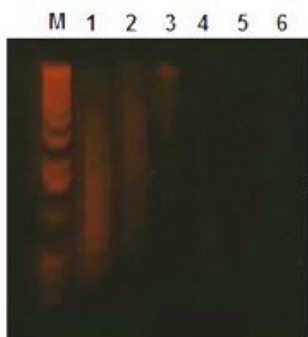


Figura 3. Muestras de ADN purificado a partir de contenido intestinal grupo experimental rojo. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 1-6: muestras analizadas. rojo.

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras 35-41 del grupo café se muestran en la figura 4. El carril del marcador presenta diferencia en la intensidad de sus bandas, en los carriles 3, 4 y 6 se observan bandas borrosas, muy débiles y extendidas por degradación de ADN y en los carriles 1, 2 y 5 se observa migración anómala de las bandas al ser extendidas pero si hay presencia de ADN al tener intensidad de las bandas obtenidas.

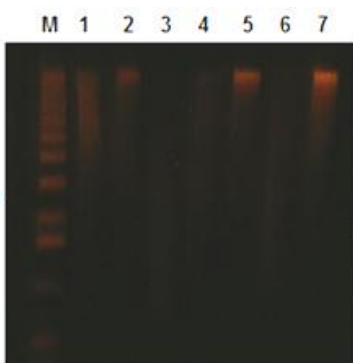


Figura 4. Muestras de ADN purificado a partir de contenido intestinal grupo experimental café. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 1-7: muestras analizadas.

Las muestras 42 y 43 de la Tabla 3, fueron seleccionadas para electroforesis en gel de agarosa al 1% por tener concentración en ng/ μ L alta (superando los 200 ng/ μ L en cada una) y por tener relación A260/280 muy cercana a 1.6, lo que indica que el ADN que se extrajo por el método fenol-cloroformo, es de pureza aceptable.

Los resultados del gel de electroforesis se muestran en la figura 5, donde se observa que las bandas correspondientes al marcador de peso molecular tienen buena definición entre ellas a pesar de ser bandas curvadas, para las muestras 42 y 43 se observa presencia de ADN degradado a pesar de haber migración anómala de las bandas, lo que indica que se logró llevar a cabo extracción de ADN por el método de extracción seleccionado.



Figura 5. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras 42 y 43 de cultivos sólidos. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 1, 2: muestras analizadas 42 y 43 respectivamente.

Se seleccionaron las muestras 44 y 45 (Tabla 3) debido a que su concentración en ng/ μ L fueron altas al superar los 190 ng/ μ L para la muestra 44 y los 250 ng/ μ L para la muestra 45 y con la relación A260/280 obtenida se observa que el ADN extraído fue de pureza óptima, siendo los valores superiores a 1.8. A pesar de haber diferencias (con respecto a la concentración en ng/ μ L y a la relación A260/280) entre las muestras, el método fenol-cloroformo permitió obtener ADN de calidad óptima de los dos cultivos utilizados.

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para estas dos muestras, se muestran en la figura 6. Las bandas correspondientes al marcador de peso molecular son curvadas y no se observa alta definición entre sus bandas, para la muestra 42 del ADN extraído de un cultivo con recubrimiento, se logra observar la presencia de una banda muy débil y borrosa aproximadamente de 12000 pb y otra banda de mayor intensidad y borrosa aproximadamente de 200 pb; para la muestra 43 de ADN extraído de un cultivo sin recubrimiento se observan igualmente dos bandas, una primera intensa con buena definición

aproximadamente de 12000 pb y una segunda intensa y borrosa aproximadamente de 200 pb.

Los resultados obtenidos en la electroforesis en gel de agarosa al 1% para estos cultivos indican que con el método fenol-cloroformo se extrajeron 2 fragmentos de ADN de diferentes tamaños para cada una de las muestras analizadas o que hubo migración anómala de las bandas por degradación del ADN extraído.

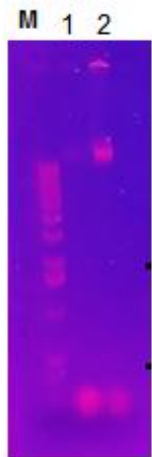


Figura 6. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para el ADN de la muestra 42 de un cultivo con recubrimiento y uno sin recubrimiento (43). Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 1, 2: muestras analizadas 42 y 43 respectivamente.

La muestra 46 fue seleccionada como control negativo al ser una muestra de ADN perteneciente a lactobacilos y al tener concentración alta, siendo de 194.9 ng/ μ L y la relación A260/A280 fue de 1.82, indicando que la muestra de ADN era de pureza óptima y debido a la alta concentración, se preparó una dilución con concentración de 20 ng/ μ L para poder ser analizada en un gel de electroforesis después de la amplificación por medio de PCR de las muestras 42, 43, 44 y 45 como se muestra en la Tabla 5.

En los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrados en la figura 7, se observa que se obtuvieron bandas de un tamaño que no corresponde a los primers utilizados: xfp1/xfp2 con un tamaño en pares de bases de 435 y lm3/lm6 con un tamaño en pares de bases de 1.35 kb. La migración anómala de las bandas pudo deberse a una degradación del ADN en las muestras o a una

concentración errónea de los componentes de reacción en PCR o de la mezcla de electroforesis

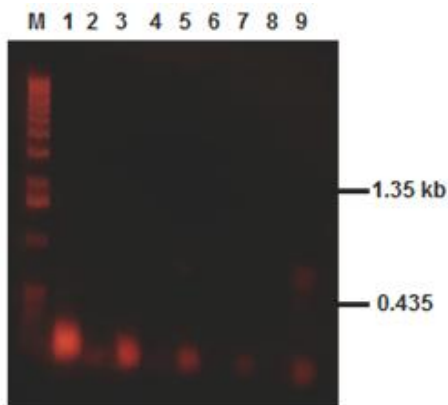


Figura 7. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras 42, 43, 44 y 45 amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles 2-9: muestras analizadas; Carril 1: control negativo.

Debido a esto, se decidió seleccionar un control positivo a partir de ADN previamente extraído de las especies *B. infantis*, *B. adolescentis* y *B. longum*. La selección se hizo por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las tres muestras como se observa en la figura 8, donde se obtuvieron bandas curvadas y levemente borrosas para el marcador de peso de molecular y sólo se logró obtener una banda muy débil y casi imperceptible para la especie *B. infantis* del carril Bi, lo que indica que hay presencia de ADN y por eso fue seleccionada como control positivo para llevar a cabo PCR en los procedimientos siguientes.

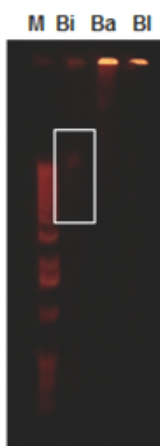


Figura 8. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para el ADN extraído de diversas especies de bifidobacterias. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carriles Bi, Ba, BI: muestras analizadas.

El ADN amplificado por medio de PCR del control positivo *B. infantis* (Tabla 5) fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 9. Se observa que las bandas para el marcador molecular tienen alta definición e intensidad de las bandas y en los carriles 1 y 2, se obtuvieron las bandas correspondientes a los pares de bases de cada par de primers y fueron obtenidas con alta definición e intensidad, sobre todo en la banda del carril 2 correspondientes al par de primers xfp1/xfp2.

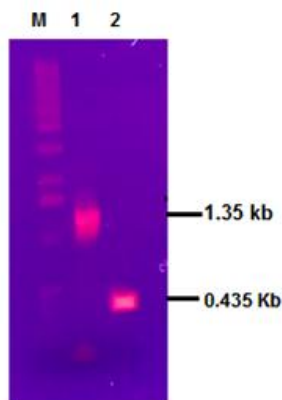


Figura 9. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para el control positivo de *B. infantis* amplificado por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: primers Xfp1/Xfp2; Carril 2: primers Im3/Im26.

Posteriormente, se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% los resultados de la amplificación de la muestra 42 que fue amplificada nuevamente como se muestra en la Tabla 5, junto con el control positivo seleccionado y se obtuvieron los resultados que se observan en la figura 10. Las bandas correspondientes al marcador de peso molecular no tienen alta definición entre ellas y son un poco curvadas pero se distinguen con claridad, para el carril 1 del control positivo de *B. infantis* se observa solamente una banda definida e intensa que muestra presencia de ADN y para el carril 2 de la muestra 42, se observa igualmente una sola banda con menor intensidad y alta definición. A pesar de haber presencia de ADN sin degradar, los pares de bases de la banda obtenida no corresponden con los primers utilizados Im3/Im26, lo que podría indicar presencia de un problema en alguno de los componentes de la mezcla para PCR.

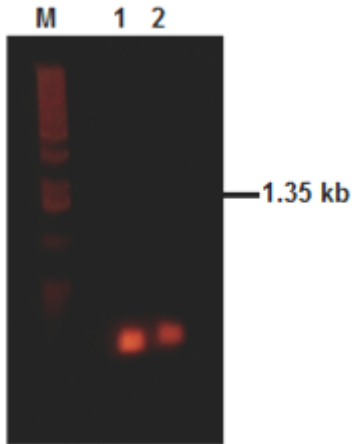


Figura 10. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo de *B. infantis*; Carril 2: muestra 42.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación espectrofotométrica (Tabla 3), las muestras 47 y 48 tuvieron concentraciones altas, siendo más alta para la muestra 47 y menor para la muestra 48. La relación A260/A280 fue cercana a 1.8 para la muestra 47, siendo ADN de pureza óptima y cercana a 1.6 para la muestra 48, lo que indica ADN de pureza aceptable. Estas dos muestras fueron comparadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1% junto con la muestra 42 y el control positivo.

Se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 11, las bandas para el marcador de peso molecular tienen alta definición e intensidad entre ellas. Para el carril 1, se obtuvo una banda definida con un tamaño en pares de bases correspondiente al par de primers utilizados (1m3/1m6), lo que indica que el ADN fue amplificado de manera específica. Para la muestra 42, 48 y 47 de los carriles 2, 3 y 4, respectivamente, se obtuvieron bandas que no corresponden al tamaño en pares de bases que debería amplificar el par de primers 1m3/1m6, lo que indica que la amplificación fue inespecífica.

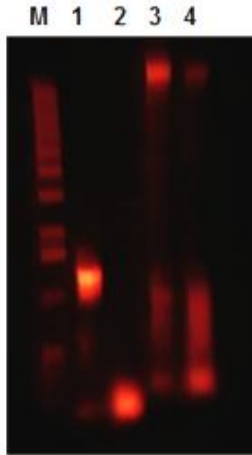


Figura 11. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para diversas muestras. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo *B. infantis*; Carril 2: muestra 42; Carril 3: muestra 48; Carril 4: muestra 47.

Se hicieron diluciones de las muestras 47 y 48 a una concentración de 20 ng/μL para cada una y se utilizaron para amplificación por medio de PCR junto con el control positivo como se muestra en la Tabla 5. Se preparó un gel para electroforesis en gel de agarosa al 1% y se obtuvieron los resultados de la figura 12. Las bandas para el marcador de peso molecular son curvadas pero con buena definición entre ellas; para los carriles 1, 2 y 3 se observa que se obtuvo una banda para cada carril que corresponde al tamaño de pares de bases que amplifica el par de primers Im3/Im6, lo que indica que el ADN fue amplificado de manera específica.

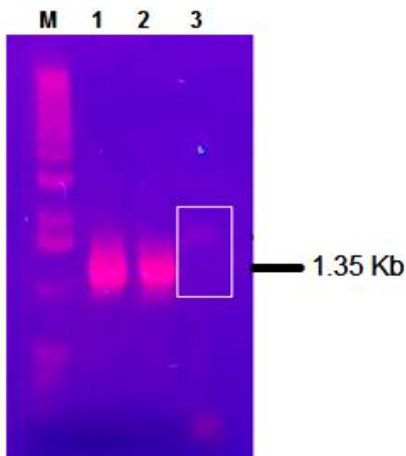


Figura 12. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para diversas muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo *B. infantis*; Carril 2: muestra 47; Carril 3: muestra 48.

Se seleccionó la muestra 47 previamente cuantificada por espectrofotometría y amplificada por PCR debido a su alta concentración de 249.6 ng/μL e integridad

del ADN que logró ser amplificado de manera específica para hacer diluciones seriadas y así poder amplificar cada una de estas diluciones para utilizar una menor cantidad de ADN sin afectar la amplificación. Se tomaron 5 μL de la solución original + 45 μL de agua inyectable. Posteriormente, con otras muestras de ADN provenientes de probióticos (M2, M4, M7, M16), se llevó a cabo amplificación de estas muestras por medio de PCR como se muestra en la Tabla 5 y se analizaron los resultados por electroforesis como se muestra en la figura 13, la cual corresponde a un gel de agarosa al 2% debido a que la concentración que se agregó a cada pozo fue de 15 μL por muestra.

Las bandas para el marcador de peso molecular son intensas y con alta definición entre ellas pero se nota que las bandas no tienen buen espacio entre ellas para distinguir a cuántos pares de bases corresponde cada una. En los carriles 2, 4 y 6 se observan 2 bandas, la primera es menos intensa que las segundas bandas obtenidas y el tamaño de ambos fragmentos es de aproximadamente los mismos pares de bases; en los carriles 1, 3, 5 y 7-9 se obtuvo solamente una sola banda con alta definición e intensidad pero entre ellas no coincide con la distancia recorrida en el gel la muestra del carril 1 correspondiente al control positivo.

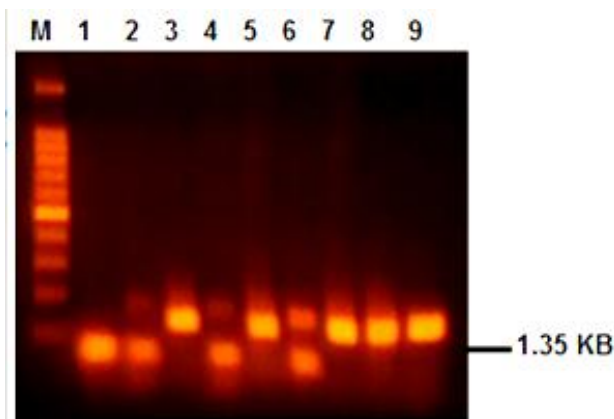


Figura 13. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2% para diversas muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo *B. infantis*; Carril 2: muestra 47; Carril 3-5: diluciones de la muestra 47; Carril 6-9: muestras M2, M4, M7 y M16.

Para las muestras 49-55 se llevó a cabo la amplificación de cada una de ellas por medio de la técnica PCR como se indica en la Tabla 5 y fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar el estado de la amplificación, los resultados se muestran en la figura 14 para las muestras 50, 51, 53 y 54. Se

observa que el carril del marcador de peso molecular se obtuvieron bandas con alta intensidad y definición entre ellas. Para el carril 1 se obtuvo una sola banda intensa, extendida y con buena definición para un fragmento de ADN de 1.35 kb; en los carriles 2 y 5 se observa la presencia de 3 bandas, una correspondiente a la muestra de ADN con un tamaño de 1.35 kb, una segunda banda débil y borrosa de aproximadamente 1000 pb y una tercera muy débil y borrosa al final del gel que podría indicar algún problema con los componentes de la mezcla de reacción de PCR o un problema en la electroforesis. Para los carriles 3 y 4 sólo se obtuvo una banda al final del gel, pero ninguna para el fragmento de ADN que se esperaba obtener de 1.35 kb.

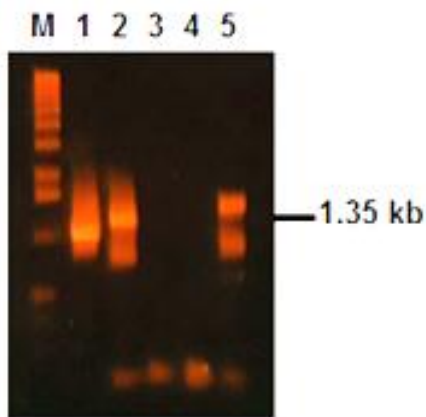


Figura 14. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo de *B. infantis*; Carril 2: muestra 50 *B. animalis*; Carril 3: muestra 51 *B. bifidum*; Carril 4: muestra 53 *B. infantis*; Carril 5: muestra 54 *B. lactis*.

Para las muestras 49, 52 y 55 se obtuvieron los resultados de la electroforesis que se observan en la figura 15. Se obtuvieron bandas con alta intensidad y definición para las bandas del marcador de peso molecular y para los carriles 1 y 3, se obtuvo una sola banda un poco extendida pero con alta intensidad y definición pero para los carriles 2 y 4 no se obtuvo ninguna banda, lo que podría indicar que no hubo unión de los primers con el ADN extraído.

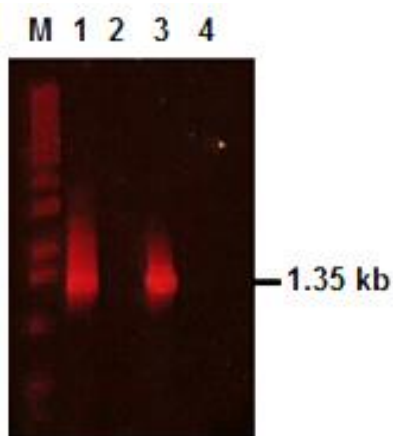


Figura 15. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo *B. infantis*; Carril 2: muestra 49 *B. adolescentis*; Carril 3: muestra 52 *B. breve*; Carril 4: muestra 55 *B. longum*.

A partir de un cultivo sólido de la cepa G (Tabla 1), se llevaron a cabo dos diferentes procedimientos:

1. Amplificación por PCR como se muestra en la Tabla 5, sin realizar ninguna extracción previa, ya que la muestra se tomó directamente del medio y con esa misma se preparó la reacción para PCR y así poder verificar el estado del cultivo.
2. Extracción de ADN por medio de un kit QIAamp QIAGEN (muestra 56 de la Tabla 3)

Se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% para estas 2 muestras (cepa G y muestra 56) y se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 16. Las bandas correspondientes al carril del marcador de peso molecular son un poco curvadas, con alta intensidad y definición entre ellas. En el carril 1 del control positivo, se obtuvo una sola banda con alta definición e intensidad y de un tamaño equivalente a los primers Im3/Im26 que se utilizaron; en el carril 2 de la muestra de la cepa G, se obtuvo una banda borrosa al final del gel y no equivalente a los pares de primers utilizados, lo que indica que la amplificación por PCR presentó algún problema y para el carril 3 de la muestra 56 extraída por un kit, se obtuvo una banda extendida y borrosa pero con alta intensidad, lo que indica que la amplificación fue inespecífica.

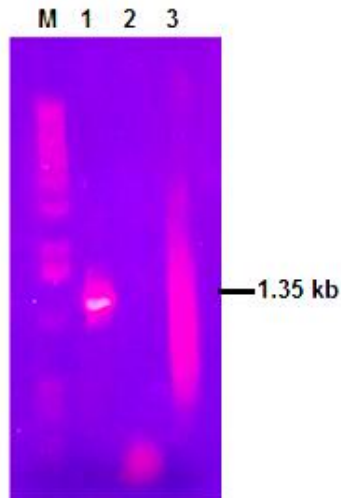


Figura 16. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para diversas muestras. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo *B. infantis*; Carril 2: muestra *B. longum* (amplificada por PCR); Carril 3: muestra 56 (ADN extraído por medio de un kit).

Posteriormente, se llevó a cabo amplificación de la muestra 56 por PCR con los primers Im3/Im26 como se muestra en la Tabla 5 y se verificaron los resultados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, obteniendo los que se muestran en la figura 17. Las bandas para el marcador de peso molecular tienen alta definición e intensidad entre ellas, en el carril 1 del control positivo se observa una sola banda que presenta alta intensidad y alta definición de la banda con un tamaño del fragmento correspondiente a los primers utilizados y en el carril 2 de la muestra 56 se observan 2 bandas, la primera es de alta intensidad y un poco extendida pero corresponde con los pares de bases que debían amplificarse y la segunda banda obtenida tiene buena definición y es un poco borrosa, pero no corresponde con el ADN amplificado. Estos resultados indican que la amplificación logró llevarse a cabo de manera adecuada para poder obtener los fragmentos esperados.

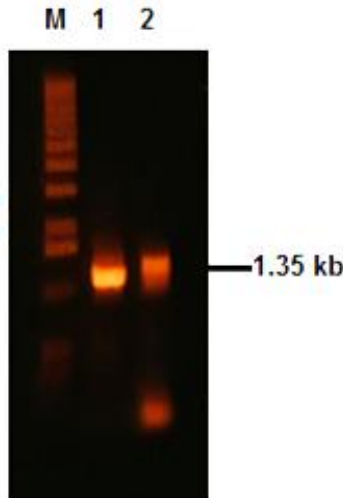


Figura 17. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para la muestra Lkit amplificada por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: control positivo *B. infantis*; Carril 2: muestra 56 analizada.

La muestra 56 fue nuevamente amplificada nuevamente junto con el control positivo *B. infantis* como se muestra en la Tabla 5 debido a los buenos resultados que habían presentado las electroforesis en gel de agarosa previamente realizadas (bandas nítidas y definidas con buena intensidad). Se prepararon 3 tubos de reacción para PCR con cada uno de los pares de primers que habían sido previamente utilizados (xfp1/xfp2 y lm3/lm26) y así, se prepararon 9 tubos de reacción para amplificación por PCR (3 tubos para el control positivo con los primers xfp1/xfp2, 3 tubos para la muestra 56 *B. longum* con los primers xfp1/xfp2 y 3 tubos con los primers lm3/lm26).

Los resultados de la amplificación por PCR se muestran en la figura 18, en la cual se observa que las bandas para el marcador de peso molecular presentan alta definición entre ellas y alta diferencia en la intensidad de cada una. En los carriles 1-3 se observa que se lograron amplificar los fragmentos correspondientes a 0.435 kb con alta intensidad y definición en las bandas obtenidas, a excepción del carril 3 donde la banda es débil pero con buena definición. En los carriles 7-9 igualmente se lograron amplificar de manera adecuada los fragmentos correspondientes a 1.35 kb, obteniendo bandas con alta intensidad y un poco extendidas. Para los carriles 4-6 se obtuvieron bandas muy débiles y casi imperceptibles correspondientes a .0435 kb y en todos los carriles se obtuvieron

bandas borrosas y débiles al final del gel, lo que podría indicar algún problema en los componentes de la mezcla de reacción para PCR.

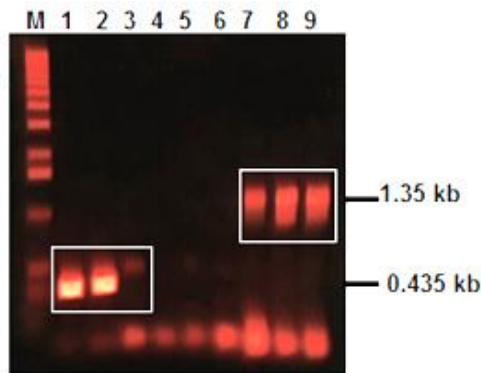


Figura 18. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para las muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1-3: control positivo *B. infantis* con primers Xfp1/Xfp2; Carril 4-6: muestra 56 *B. longum* con primers Xfp1/Xfp2; Carril 7-9: muestra 56 *B. longum* con primers Im3/Im26.

Debido a que se obtuvieron mejores resultados en la electroforesis de la muestra 56 amplificada con el par de primers Im3/Im26 y del control positivo *B. infantis* con el par de primers xfp1/xfp2, se llevó a cabo la precipitación de estas dos muestras junto con una muestra adicional del control positivo con el par de primers Im3/Im26 para posteriormente realizar electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para las muestras con los primers xfp1/xfp2 y 2 gels de agarosa al 0.8% para las muestras con primers Im3/Im26 y así, poder obtener una banda específica. Los resultados de la electroforesis para los 3 gels se muestran en la figura 19. Para las 3 muestras seleccionadas se obtuvieron bandas con alta definición e intensidad y cada una correspondiente al número de pares de bases de acuerdo a los primers utilizados.

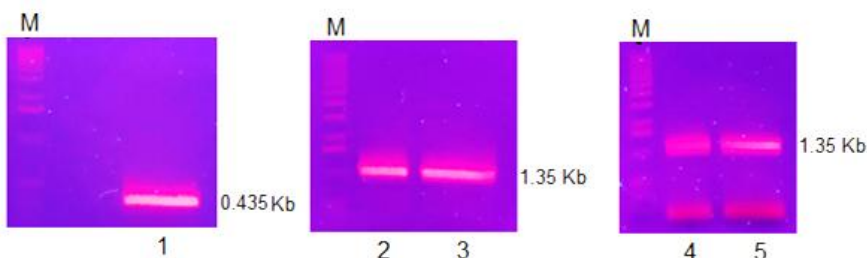


Figura 19. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y al 0.8% para las muestras amplificadas por PCR. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: muestra *B. infantis* con primers Xfp1/Xfp2; Carril 2, 3: muestra *B. infantis* con primers Im3/Im26; Carril 4, 5: muestra *B. longum* con primers Im3/Im26.

A lo largo del trabajo, se llevaron a cabo un total de 22 geles de agarosa con diferentes concentraciones para ser analizados mediante electroforesis.

6. **Secuenciación de muestras seleccionadas.**

La muestra 56 que fue precipitada junto con el control positivo de *B. infantis* utilizando los dos pares de primers, presentada en la figura 19 previamente explicada, fue seleccionada para obtener su secuencia debido a sus bandas nítidas, definidas e intensas obtenidas a través de electroforesis en geles de agarosa. Las bandas que se obtuvieron en la figura 19, fueron cortadas para extraer el ADN de cada una de ellas y así obtener las muestras 57, 58 y 59 que se muestran en la Tabla 3 y que fueron analizadas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% para obtener la figura 20 y ser enviada junto con las muestras para su secuenciación. Se observa que las bandas para el marcador de peso molecular son definidas e intensas aunque un poco curvadas, las bandas para los carriles 1-3 son altamente definidas e intensas y cada una de ellas corresponde al fragmento de pares de bases esperado de acuerdo a los pares de primers que fueron utilizados.

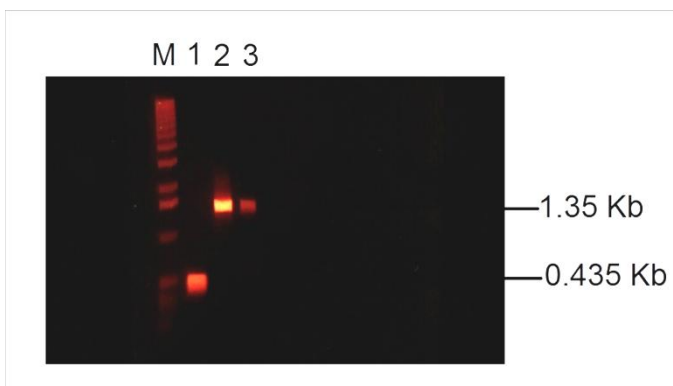


Figura 20. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 1% para muestras amplificadas por PCR y enviadas para secuenciación. Carril M: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 1: muestra 57 *B. infantis* con primers Xfp1/Xfp2; Carril 2: muestra 58 *B. infantis* con primers Im3/Im26; Carril 3: muestra 59 *B. longum* con primers Im3/Im26.

La secuenciación de las muestras fue llevada a cabo por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se obtuvieron de manera exitosa las secuencias correspondientes a las muestras 57 y 59. Para la muestra 58 no se pudo obtener su secuencia por falta de intensidad en las

señales, esto pudo deberse a diversas razones: concentración más baja a la necesaria del ADN o los primers, el primer no encontró el sitio de hibridación, el ADN estaba contaminado, entre otros.

Las secuencias de cada una de las muestras se muestran en la figura 21 para la muestra 57 y en la figura 22 para la muestra 59.

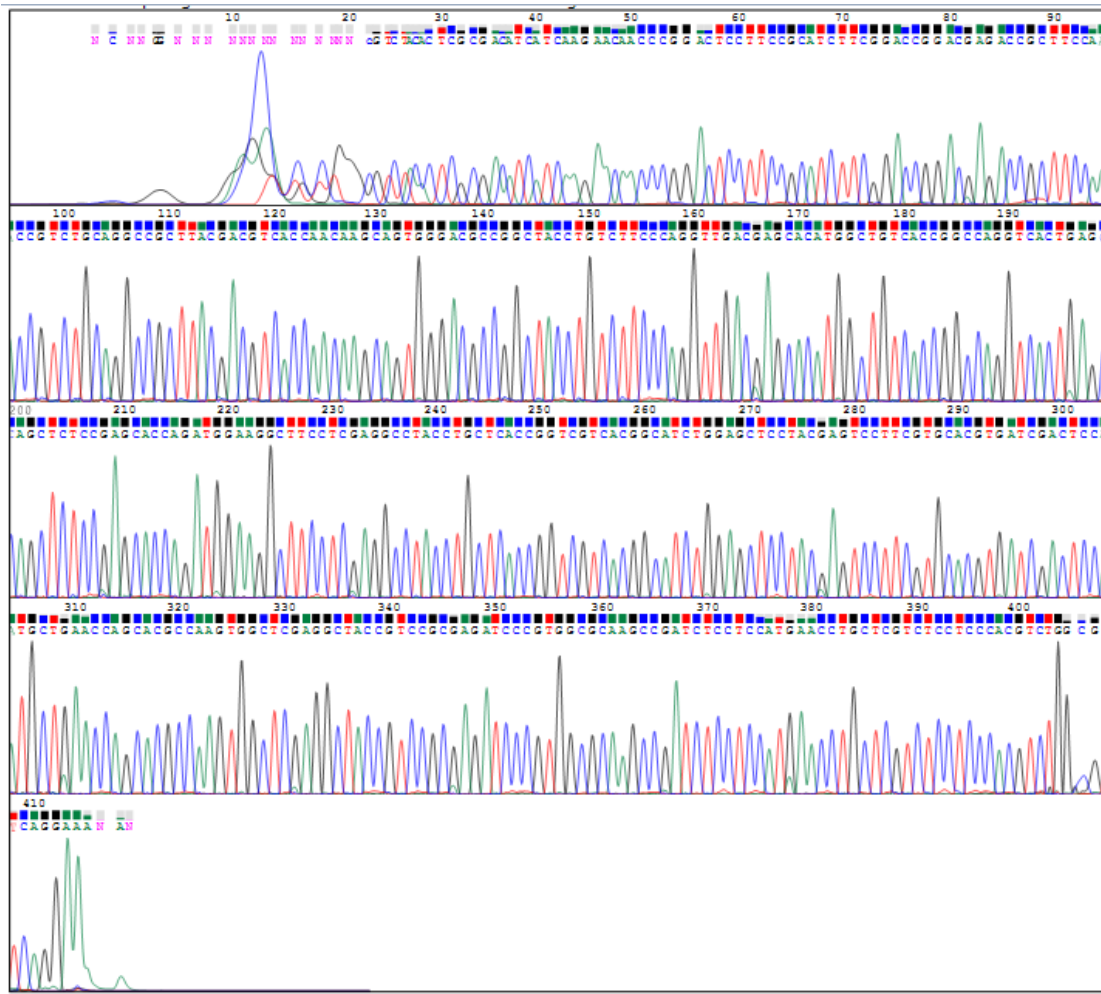


Figura 21. Secuencia correspondiente a la muestra 57 obtenida por el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

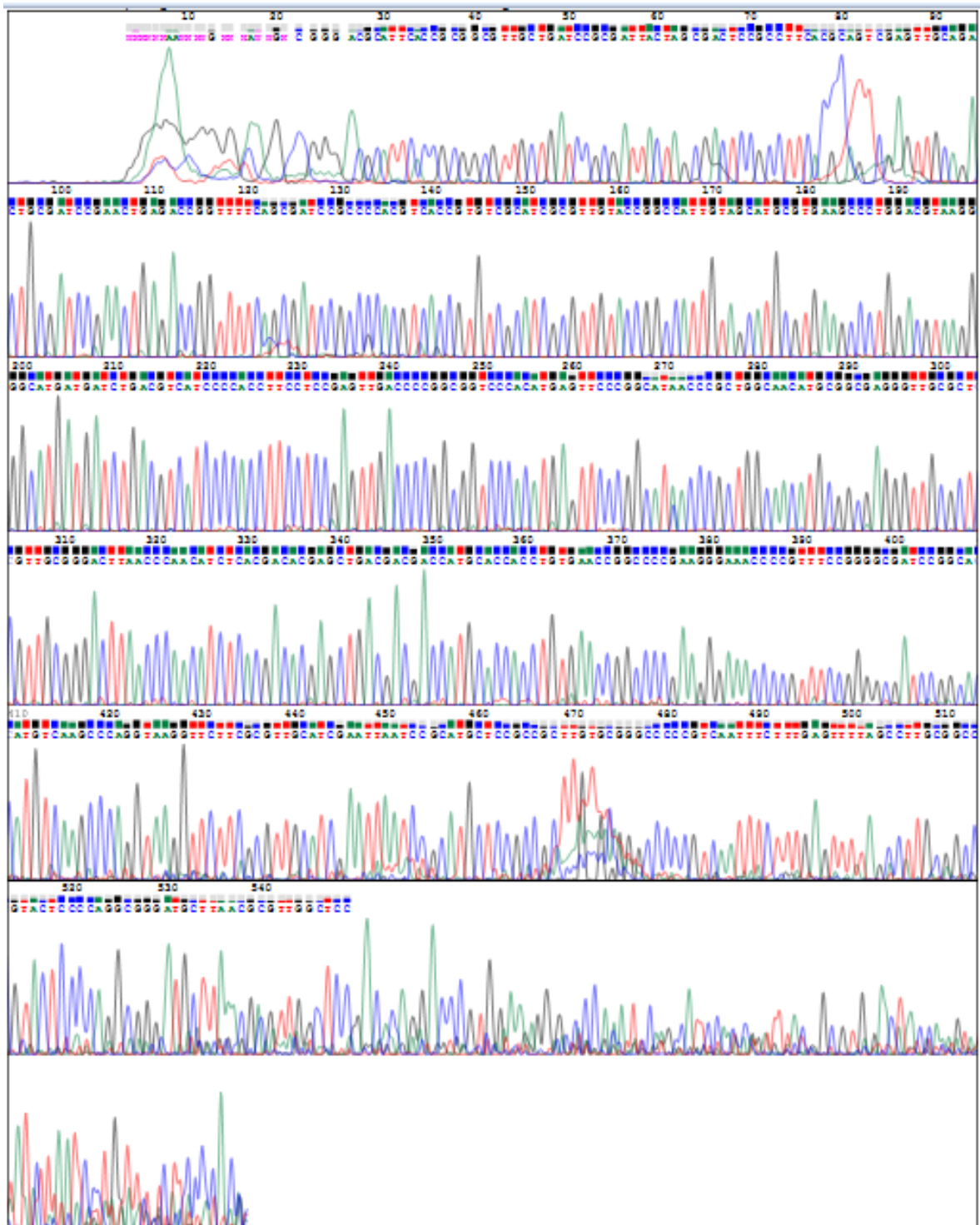


Figura 22. Secuencia correspondiente a la muestra 59 obtenida por Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El análisis de la secuencia para determinar a qué especie correspondía se hizo mediante el alineamiento de secuencias con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Nucleotide.

En la figura 21 correspondiente a la secuencia para la muestra 57 de la cepa E, se observa el análisis de 418 bases con señales para cada nucleótido de la siguiente forma:

- G: 1925
- A: 1729
- T: 1649
- C: 2377

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante BLAST Nucleotide, la secuencia fue similar a:

1. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* con 99.49% de similitud.
2. *Bifidobacterium catenulatum* con 98.73% de similitud.
3. *Bifidobacterium dentium* con 96.95% de similitud.

Lo que indica que la cepa E podría corresponder a *B. pseudocatenulatum*.

En la figura 22 correspondiente a la secuencia para la muestra 59 de la cepa. se observa el análisis de 549 bases con señales para cada nucleótido de la siguiente forma:

- G: 47
- A: 39
- T: 41
- C: 47

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante BLAST Nucleotide, la secuencia fue similar a:

1. *Bifidobacterium animalis* con 99.81% de similitud.

Lo que indica que la cepa G corresponde a *Bifidobacterium animalis*.

Conclusiones.

Mediante la cuantificación espectrofotométrica que se realizó a 59 muestras, se logró evaluar la calidad del método fenol-cloroformo para la extracción de ADN proveniente de bifidobacterias. Con este método, se llevó a cabo la extracción del material genético de 55 muestras diferentes, de las cuales 38 muestras llevaban almacenadas varios meses hasta su cuantificación y 17 de estas muestras fueron cuantificadas al momento de su extracción. Así, de estas 17 muestras, el 47% fueron de pureza óptima de acuerdo a la relación A260/280 obtenida y 53% fueron de pureza aceptable. Diversos factores como contaminación por productos de fenol o proteínas pudieron afectar la pureza de las muestras para no poder obtener pureza óptima en todas las muestras analizadas, pero a pesar de esto, la pureza se encuentra dentro de rangos aceptables, por lo que se considera que el método cumple con el objetivo establecido.

Así mismo, para la amplificación del fragmento deseado de ADNr 16S se probaron diversas condiciones para llevar a cabo la reacción de PCR aplicada a distintas muestras y mediante un análisis electroforético, se seleccionaron las dos variables de condiciones que mostraron mejores resultados:

Finalmente, mediante el alineamiento de las secuencias obtenidas se logró determinar con exactitud a qué especie correspondía el ADN analizado, lo que permite confirmar 2 aspectos importantes:

1. El fragmento de ADN secuenciado corresponde al género *Bifidobacterium*.
2. El procedimiento utilizado para la secuenciación permitió cuantificar la similitud de secuencias en un porcentaje mayor a 96%.

Así, se concluye que se logró llevar a cabo la optimización de la extracción de ADN de bifidobacterias y su posterior amplificación por medio de PCR para poder lograr una correcta secuenciación del ADN obtenido para su identificación por medio del alineamiento de secuencias en BLAST Nucleotide y así, poder identificar con exactitud la especie de *Bifidobacterium*.

Bibliografía.

1. Bush, L. (-). Introducción a las bacterias. Enero 26, 2018, de Merck Sharp and Dohme Corporation Sitio web: <http://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias>
2. Tormo, R. (2006). Concepto y mecanismos de acción. Enero 26, 2018, de Anales de pediatría Sitio web: <http://www.analesdepediatría.org/es/pdf/13092364/S300/>
3. Cercenado, E. & Cantón, E. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enero 29, 2018, de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Sitio web: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
4. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. (2013). Las bifidobacterias: nuevo descubrimiento y beneficios que nos aportan. Enero 28, 2018, de Omicron Sitio web: <http://omicron.elespanol.com/2013/06/las-bifidobacterias-nuevo-descubrimiento-y-beneficios-que-nos-aportan/>
5. MedlinePlus. (2017). Bifidobacterias. Enero 29, 2018, de Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU Sitio web: <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/natural/891.html>
6. Brunser, O. (2013, Septiembre). El papel de las bifidobacterias en el funcionamiento del organismo humano. Revista chilena de nutrición, 40, 303-308. 2018, Enero 29, De SciELO Base de datos.
7. García, J. (2010). Técnicas moleculares aplicadas a la caracterización y estudio de la supervivencia de bacterias lácticas del yogurt. España: Universidad Politécnica de Valencia.
8. Perdigón, G., Fuller, R., & Raya, R. (2001). Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Current issues in intestinal microbiology, 2(1), pp. 27–42.
9. Matsuzaki, T. (1998). Immunomodulation by treatment with Lactobacillus casei strain Shirota. International Journal of Food Microbiology, 41(2), pp. 133–140.
10. Collado, M. (2004). Caracterización de cepas del género bifidobacterium con carácter probiótico. España: Universidad Politécnica de Valencia.

11. LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. (2020). Genus Bifidobacterium. Junio, 2020, de LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature Sitio web: <https://lpsn.dsmz.de/genus/bifidobacterium>.
12. Pérez, I., Soledad, M. & Alonso, G. (2012). Aislamiento e identificación de cepas del género Bifidobacterium presentes en productos lácteos fermentados tipo yogur. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 32, pp. 29-35.
13. Garrido, M. (-). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Enero 30, 2018, de Universidad de Granada Sitio web: <http://www.ugr.es/~mgarrido/PCR.htm>
14. Serrato, A., Flores, L., Aportela, J. & Sierra, E. (-). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. Junio 2020, de Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático Sitio web: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>
15. Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22, pp. 238-245.
16. Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En Ecología Molecular (251-278). México: INE, CONABIO y UNAM.
17. All Science. (2017) ¿Cuáles son las diferencias entre PCR, RT PCR, QPCR y RT QPCR? Enero 30, 2018, de All Science Sitio web: <https://www.e-allscience.com/blogs/news/cuales-son-las-diferencias-entre-pcr-rt-pcr-qpcr-y-rt-qpcr>
18. EDVOTEK. (2016). Principios y práctica de la electroforesis en gel de agarosa. Junio 2020, de The biotechnology education company Sitio web: <https://www.edvotek.com/site/pdf/101sp.pdf>
19. NHGRI. (2019). Secuenciación del ADN. Febrero, 2020, de NHGRI Sitio web: <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
20. Jauk, F. (Octubre, 2019). Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. Hematología, 23, pp. 21-38.
21. López, U. (Enero, 2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. Munibe Ciencias Naturales, 64, pp. 1-26.

22. Rodríguez-Santiago, B & Armengol, L. (Abril, 2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico prenatal*, 23, pp. 56-66.
23. Márquez, L., Serrato, A. & Cerritos, R. (-). Secuenciación de fragmentos de ADN. Junio 2020, de Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático
Sitio web:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/secuenciacion.pdf>
24. Bioinformatics at COMAV. (-). Alineamiento de secuencias. Junio 2020, de COMAV
Sitio web:
https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/alineamientos.html
25. Cifuentes, G. (2018). Aislamiento, identificación y caracterización de nuevos probióticos con propiedades funcionales para su aplicación en alimentación. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona.
26. Kok, R., De Waal, A., Schut, F., Welling, G., Weenk, G. & Hellingwerf, K. (1996). Specific Detection and Analysis of a Probiotic Bifidobacterium Strain in Infant Feces. *Applied and environmental microbiology*, 62, pp. 3668-3672.
27. Kaufmann, P., Pfefferkorn, M. & Meile, L. (1997). Identification and Quantification of Bifidobacterium Species Isolated from Food with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes by Colony Hybridization and PCR. *Applied and environmental microbiology*, 63, pp. 1268-1273.
28. Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. & Collins, K. (1996). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35, pp. 1-27.
29. Tannock, G. (1999). Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current issues in molecular biology*, 1, pp. 53-64.
30. Dong, X., Cheng, G. & Jian, W. (2000). Simultaneous Identification of Five Bifidobacterium Species Isolated from Human Beings Using Multiple PCR Primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 23, pp. 366-390.
31. Krizova, J., Spanová, A. & Rittich, B. (2006). Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of Bifidobacterium species. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, pp. 36-44.
32. Youn, S., Seo, J. & Ji, G. (2007). Evaluation of the PCR method for identification of Bifidobacterium species. *Letters in Applied Microbiology*, 46, pp. 7-13.

33. Rossello-Mora R., & Amman, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25: 39–67
34. Berthoud H., Chavagnat F., Haueter M., Casey M.G. (2005). Comparison of partial gene sequences encoding a phosphoketolase for the identification of bifidobacterial. *LWT-Food Science and Technology*. 38(1):101-105.
35. Schaad, N. Opgenorth, D. & Gaush, P. (2002). Real-Time Polymerase Chain Reaction for One-Hour On-Site Diagnosis of Pierce's Disease of Grape in Early Season Asymptomatic Vines. *The American Phytopathological Society*, 92, pp. 721-728.
36. Reyes, M. (2018). Evaluación del efecto de la inulina en la población *Bifidobacterium sp.* en el intestino de rata, en un modelo de hepatocarcinogénesis. Reporte para obtener el título de Química Farmacéutica Biológica. Universidad Autónoma Metropolitana