



XVIII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

IX SIMPOSIO INTERNACIONAL DE NUEVAS TECNOLOGÍAS

VII SIMPOSIO LATINOAMERICANO SOBRE HIGIENE Y CALIDAD DE ALIMENTOS

V SIMPOSIO DE INNOVACIÓN EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Libro de trabajos completos

XVIII CONGRESO ARGENTINO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

XVIII CyTAL[®] 2023

Innovación, sustentabilidad y productividad
en la transformación del sistema alimentario



Asociación Argentina
de Tecnólogos Alimentarios



FACULTAD DE INGENIERÍA
Y CIENCIAS AGRARIAS



Agencia I+D+i

Libro de trabajos completos XVIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos XVIII CyTAL® 2023 / Stella Maris Alzamora, María del Pilar Buera, Ricardo Castellano, Paula Sol Pok, Silvia Mónica Raffellini, Emilia Elisabeth Raimondo, Susana Emilia Socolovsky, Sergio Ramón Vaudagna, Susana Leontina Vidales, Angela Zuleta

1a ed compendiada. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios - AATA, 2024.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-47615-4-5

1. Tecnología de los Alimentos. I. Alzamora, Stella Maris [et al.].

CDD 641.3002

ISBN 978-987-47615-4-5



9 789874 761545 5

4010. DESARROLLO DE NUEVO MEDIO DE CULTIVO DIFERENCIAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE BIFIDOBACTERIAS

Vega, María F.^{1,2}; Palacio, María I.^{1,3}; Fernández P., María B.^{1,2}; Ruiz, Julia^{1,3}; Etcheverría, Analía I.^{1,3}

1. *Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV). Tandil, Buenos Aires, Argentina.*
2. *Producción Animal Veterinaria de Tandil (PROANVET).*
3. *Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), UNCPBA-CICPBA- CONICET. Tandil, Buenos Aires, Argentina.*

E-mail: mfvega@vet.unicen.edu.ar

RESUMEN

Se ha demostrado que el consumo de bifidobacterias contribuye a mejorar la salud del huésped. Principalmente, previenen infecciones gastrointestinales, regulan el sistema inmune, mejoran las capacidades metabólicas intestinales, mantienen el balance de la microbiota y la inmunidad del huésped. Tomando en cuenta estos efectos positivos se propuso el desarrollo de un medio de cultivo diferencial que permita el recuento de cepas del género *Bifidobacterium*. Para el recuento de bifidobacterias se elaboró un medio de cultivo que denominamos “medio para *Bifidobacterium* modificado” (MBM). Preparación de “medio para *Bifidobacterium* modificado” (MBM). Ingredientes para 1l: Medio Lactobacilli Agar AOAC 24 g, Agar Diferencial para Clostridios 21 g, Verde de bromocresol en solución de Na(OH) 20 ml, Cloruro de litio 2,5 g, Ácido propiónico al 5% en agua destilada 25 ml, Agar-agar 4,4 g, Agua destilada 950 ml. Se preparó agregando Medio Lactobacilli Agar AOAC, Agar Diferencial para Clostridios, verde de bromocresol, cloruro de litio, agar-agar y agua destilada. Se fundió y autoclavó a 121 °C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a 50-55 °C, se ajustó a pH 5-5,5 con el agregado del ácido propiónico previamente esterilizado mediante filtración. El crecimiento en el medio MBM fue controlado mediante el cultivo de una cepa comercial *Bifidobacterium animalis* BLC1 (Lyofast), observando colonias pequeñas, redondas, color verde oscuro y de borde neto, confirmando el crecimiento de la cepa control. Para demostrar la selectividad del medio MBM, se realizó la siembra de cepa de referencia STEC O157 EDL933. No se observó crecimiento de la misma en el medio estudiado. Además, se realizó la siembra de dos cepas comerciales de lactobacilos: *Lactobacillus acidophilus* (LA3) y *Lactocaseibacillus rhamnosus* (LB21) (ambos Lyofast), obteniendo morfología de colonia diferente, redonda, irregular y grande (2 mm) color amarillo con el centro verde y a la coloración se observaron bacilos Gram

(+). Luego, para comprobar la selectividad del medio para crecimiento y desarrollo únicamente de cepas del género *Bifidobacterium*, se trabajó con un grupo de n = 8 lechones neonatos clínicamente sanos, provenientes de n = 8 cerdas libres de antibióticos. Luego de 12 h de lactancia, los animales fueron sacrificados (siguiendo las normas éticas aprobadas por el Comité de Bienestar Animal de la FCV, UNCPBA) y se recolectaron muestras del contenido intestinal. Las mismas, se sembraron en medio MBM, las colonias con morfología de bifidobacteria se purificaron, se identificaron fenotípicamente, se realizó tinción de Gram y pruebas de catalasa y oxidasa. Una cepa pura compatible con *Bifidobacterium*, fue criopreservada en caldo MRS con cisteína (0,5%) y glicerol (17%) y liofilizada en medio con Leche-Lactosa. Se caracterizó por PCR (resultado positivo), y se secuenció en el Laboratorio de Alimentos Stamboulia confirmando resultado 100% de compatibilidad para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Finalmente, podemos concluir que este medio diferencial nos permitió reconocer colonias compatibles con bifidobacterias y la cepa aislada será utilizada en futuros ensayos para evaluar su capacidad probiótica y posible utilización en alimentos funcionales.

Palabras clave: Probióticos, bifidobacterias, medio de cultivo, aislamiento.

1. Introducción

Las bifidobacterias tienen un papel relevante en la salud humana y animal, siendo consideradas microorganismos probióticos. Esta actividad probiótica ha sido estudiada por diferentes autores. Se observaron varios efectos probióticos de bifidobacterias en niños entre los que se destaca la mejora en la salud gastrointestinal (Powell y col., 2016), el efecto inmunomodulador y en la composición de la microbiota intestinal (Wu y col., 2016). En cuanto a salud cardiovascular se observó la regulación de niveles anormales de colesterol (Guardamagna y col., 2014). En vías respiratorias, se estudió el efecto en enfermedades de las vías respiratorias superiores (Lau y col., 2018), en rinitis alérgica y asma intermitente (Miraglia Del Giudice y col., 2017). En adultos, se ha estudiado el efecto en salud gastrointestinal, mejorando colitis ulcerosa (Furrie y col., 2005, Tamaki y col., 2016) y enfermedad de Crohn (Steed y col., 2010). En inmunidad se ha observado una mejora en la actividad antioxidante en sangre en sujetos colonizados por *Helicobacter pylori* asintomáticos (Hutt y col., 2009), síndrome de fatiga crónica y biomarcadores inflamatorios (Groeger y col., 2013). Salud Respiratoria y Alergias Estacionales (Odamaki y col., 2007, Xiao y col., 2007). Finalmente se ha estudiado el efecto en pacientes con piel reactiva que se caracteriza por una sensibilidad marcada a estímulos físicos (calor, frío, viento) o químicos (productos aplicados tópicamente), y por el deterioro de la capacidad de la barrera cutánea para repararse a sí misma (Gueniche y col., 2010).

En base a todo el conocimiento mencionado sobre los efectos positivos que pueden conferir ciertas bifidobacterias cuando son usadas en nutrición de niños y adultos, puede afirmarse que ofrecen una vía sustentable de mejora del estado sanitario. Estas ventajas, se traducen finalmente en la promoción de la salud pública. Este estudio propone la identificación de cepas de bifidobacterias utilizando un medio diseñado por el grupo de trabajo, con el fin de seleccionar una o más que presenten las características adecuadas para su uso futuro en nutrición.

2. Materiales y métodos

Se trabajó con 8 lechones neonatos clínicamente sanos, provenientes de 8 cerdas libres de antibióticos. La temperatura del ambiente de la sala de maternidad se mantuvo a 23 °C durante el parto de las cerdas, contando además con un espacio para los lechones con una lámpara infrarroja y una manta térmica (materiales que permiten otorgarles a los lechones una temperatura de confort de 32 °C). Los animales fueron monitoreados para detectar signos de diarrea durante todo el estudio. Luego de 12 h de lactancia materna, los animales fueron sacrificados (siguiendo las normas éticas aprobadas por el Comité de Bienestar Animal de la FCV, UNCPBA) y se recolectaron muestras del contenido intestinal para su posterior análisis.

2.1. Muestreo del intestino

Inmediatamente después del sacrificio, se recogieron muestras del tracto gastrointestinal de cada lechón para las diferentes determinaciones (**Figura 1**). Todas las muestras fueron procesadas en los Laboratorio de Toxicología, Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, todos pertenecientes a la FCV, UNCPBA.

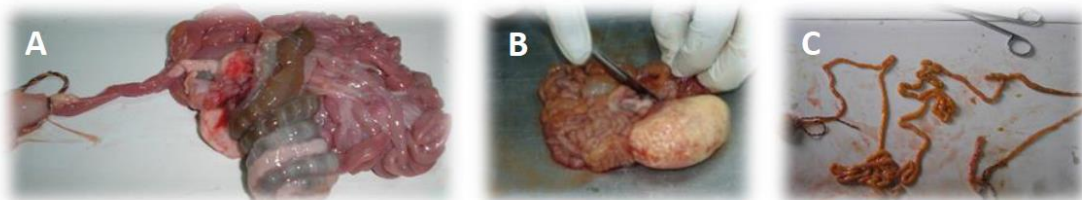


Figura 1. (A) Tracto gastrointestinal de lechón. (B) Disección del tracto gastrointestinal. (C) Extensión de la masa intestinal.

2.2. Muestreo

Muestras de contenido intestinal de tres porciones (yeyuno-íleon a 10 cm proximal al ciego, ciego y colon a 20 cm posterior a la válvula íleo-cecal) fueron recolectadas en recipientes estériles, se tomaron por separado muestras para cada porción intestinal y para cada lechón. Inmediatamente fueron remitidas en forma refrigerada al laboratorio para su procesamiento. Las muestras fueron recolectadas con hisopos estériles y colocadas en tubos con agua de peptona. Se realizaron diluciones seriadas. Alícuotas de 100 µL de cada dilución fueron sembradas en placa por duplicado con espátula en medios ya utilizados para cada tipo de bacterias. Para el recuento de bifidobacterias se elaboró un medio de cultivo que denominamos “medio para *Bifidobacterium* modificado” (MBM).

2.3. Preparación del medio para *Bifidobacterium* modificado - MBM

Ingredientes para 1 litro:

INGREDIENTE	CANTIDAD
Medio Lactobacilli Agar AOAC (Difco Laboratories, EE. UU.)	24 g
Agar Diferencial para Clostridios (Britania S.A.)	21 g
Verde de bromocresol (Biopack) en solución de Na(OH)	20 mL
Cloruro de litio (Biopack)	2,5 g
Ácido propiónico al 5% (Sigma-Aldrich Chemical Co, EE.UU.) en agua destilada	25 mL
Agar-agar (Britania S.A., Argentina)	4,4 g
Agua destilada	950 mL

El medio se preparó agregando Medio Lactobacilli Agar AOAC, Agar Diferencial para Clostridios, verde de bromocresol, cloruro de litio, agar-agar y agua destilada. Posteriormente se fundió y esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Al retirar de la autoclave, se dejó enfriar a 50-55 °C, se midió el pH con tiras y se ajustó a pH 5,5 con el agregado del ácido propiónico esterilizado mediante filtración de 0,22 µm. Finalmente se homogeneizó y volcó en placas de Petri.

2.4. Control del desarrollo de y selectividad del medio MBM

El desarrollo del MBM fue controlado mediante el cultivo de una cepa comercial liofilizada *Bifidobacterium animalis* (BLC1) Lyofast, (Laboratorio Sacco SRL, Italia).

Además, para demostrar selectividad del medio MBM, se realizó la siembra de cepas de referencia.

- *Escherichia coli* como representante de coliformes. Además, se controló el crecimiento en agar Mac Conckey, para diferenciar la inhibición de crecimiento en el agar MBM con respecto al medio de crecimiento recomendado para esta cepa.
- Dos cepas comerciales liofilizadas de lactobacilos: *Lactobacillus acidophilus* (LA3) Lyofast, (Laboratorio Sacco SRL, Italia) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* (LB21) Lyofast, (Laboratorio Sacco SRL, Italia).

2.5. Aislamiento y criopreservación: Luego del control del medio de cultivo se procedió al sembrado de las muestras provenientes del hisopado intestinal de cada uno de los lechones. Varias cepas puras compatible con *Bifidobacterium*, fueron crioconservadas en caldo MRS con cisteína (0,5%, p/v) y glicerol (17% v/v). Luego los tubos eppendorf se conservaron a -20 °C.

Además, se conservaron por liofilización utilizando como medio de protección Leche y Lactosa. Este medio de protección está formulado a base de Leche (6%), Lactosa (8%), ácido Ascórbico (2,5%) y H₂O destilada (83,5 %). Luego de la preparación se sometió a una esterilización a vapor fluente por 30 minutos. Luego de enfriado a temperatura ambiente, se agrega la solución de ácido ascórbico al 5% esterilizada por filtración.

2.6. Identificación Genotípica

Las muestras fueron caracterizadas por secuenciación del gen 16s rRNA mediante técnica de PCR, la cual se puso a punto empleando cepas de referencia, según la metodología descrita por Dubernet y col. (2002). La identificación se realizó amplificando regiones específicas de cada una de las especies analizadas, los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Kwon y col., 2004) . La extracción de ADN se realizó con el kit *Highway*® ADN PuriPrep-B kit K1209. Para la identificación de género *Bifidobacterium*, se utilizaron los primers generales g-Bifid-F (CTCCTGGAAACGGGTGG) y g-Bifid-R (GGTGTTCTTCCCGATATCTACA)

(Matsuki y col., 2002). En la identificación de género *Lactobacillus*, se utilizaron los primers generales LbLMA1-rev (5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3') y R16-1 (5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA-3') (Dubernet y col., 2002).

Se preparó el cóctel con los siguientes reactivos, buffer: 5 µL, cloruro de magnesio: 10 µL, desoxiribonucleótico trifosfato (DNTP's), 0,5 µL, *primers: reverse y forward* 0,5 µL de cada uno, taq ADN polimerasa: 0,2 µL, agua bidestilada: 28,3 µL, ADN bacteriano: 5 µL. Para la amplificación se empleó un termociclador marca Multigene con un programa específico que incluye, desnaturalización inicial un ciclo a 94 °C durante 5 min, luego 35 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 20 s), *annealing* o unión con gradiente entre 55 y 50 °C por 20 s, extensión a 72 °C por 30 s, 5 min finales de extensión a 72 °C y finalmente el almacenamiento a 4 °C.

2.7. Secuenciación

Se secuenciaron los productos de amplificación de dos cepas caracterizadas como bifidobacteria y lactobacilo en el Laboratorio de Alimentos Stambouljian utilizando un secuenciador AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se secuenció el gen 16S rRNA, utilizado para la extracción los siguientes *primers* P13P *reverse* (AGGCCCCGGGAACGTATTCAC), PSL *forward* (AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA).

3. Resultados y discusión

La disponibilidad comercial de medios de cultivos selectivos diferenciales para aislamiento y diferenciación de bifidobacterias en Argentina suele ser escasa. Así por ejemplo uno de los medios de cultivo más utilizados para su cultivo suele ser el MRS adicionado con cisteína y antibióticos (Leuschner y col., 2003, Simpson y col., 2004), que le aportan selectividad, pero no lo convierten en medio diferencial. En este marco, en el laboratorio se tomó la decisión de diseñar un medio de cultivo diferencial modificado con materiales ya disponibles. Se tomaron como base dos medios de cultivo: el medio diferencial ya utilizado para crecimiento de bifidobacterias HHD permite la comprobación de una o más características fisicoquímicas o bioquímicas de los microorganismos para su identificación, por contener un indicador de pH que ayuda a diferenciar visualmente los microorganismos heterofermentadores de los homofermentadores (Camaschella y col., 1998, Draksler y col., 2002) y el medio BD se basa en la base de agar Columbia, suplementado con ácido propiónico, a un pH de 5,05.

(Laboratorio_BD, 2003). El HHD tiene los siguientes componentes: fructosa, KH_2PO_4 , peptona tripticasa, peptona fitona, casaminoácido, extracto de levadura, Tween 80, verde de bromocresol y agar (McDONALD y col., 1987) y el Agar BD contiene: Base de agar Columbia, glucosa, lactulosa, cisteína-HCl, riboflavina, ácido propiónico. Con insumos disponibles en el laboratorio, se logró desarrollar una combinación de ambos medios, creando así el medio MBM que nos permitió realizar el recuento de bifidobacterias. El cloruro de litio y ácido propiónico le dan selectividad, el verde de bromocresol permite diferenciación de homo y heterofermentativos. Fuente de nutrición se encuentra en los dos agares agregados que cuentan con fuente de azúcares Glucosa y Fructosa (en el jugo de tomate) y fuente proteica.

3.1. Control del desarrollo y selectividad del medio MBM

La cepa control de bifidobacteria (provista por Sacco) fue sembrada en medio MBM. Su crecimiento mostró colonias pequeñas (menos de 1 mm), redondas, como gota de agua con centro verde oscuro y de borde netos (Figura 2), a las cuales se les realizó un extendido y coloración de Gram, observando bacilos G (+) pleomórficos y posterior prueba de catalasa, cuyo resultado fue (-), esto se corresponde con lo observado por (Rodríguez García, 2019).

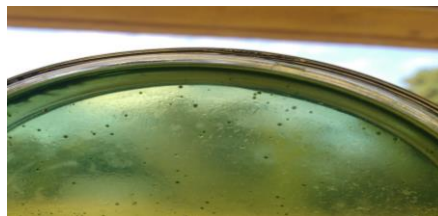


Figura 2. Bifidobacterias en placa de MBM agar.

Luego se procedió a sembrar la cepa de referencia de lactobacilo (Sacco), observando un crecimiento con morfología de colonia diferente a la anterior. Las colonias fueron grandes (2 mm), redondas, color amarillo con el centro verde y borde irregular. En el extendido y coloración de Gram se observaron bacilos G (+) similar a lo observado por (Rodríguez García, 2019). Finalmente, se sembró una cepa *E. coli* de referencia como representante de coliformes; no se observó crecimiento en el medio Agar MBM y si se detectó crecimiento positivo en el Agar Mac Conkey, específico para enterobacterias. (Figura 3).

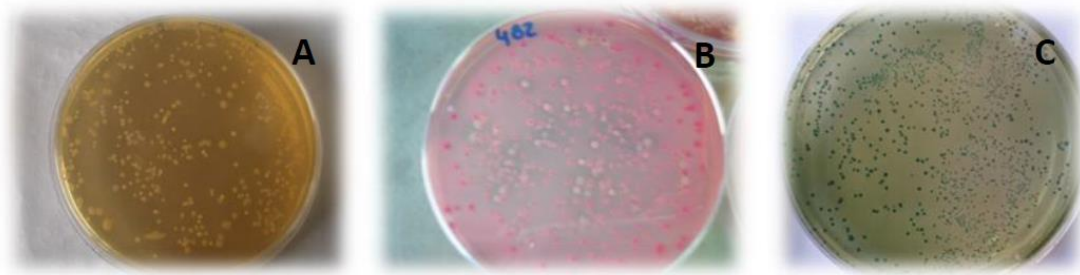


Figura 3. (A) Bacterias ácido-lácticas en placa de MRS agar. (B) Enterobacterias en placa de Mac Conkey agar. (C) Bifidobacterias en placa de MBM agar.

Posteriormente a la puesta a punto del medio de cultivo MBM, se realizó el sembrado de los hisopados intestinales y la purificación de las bacterias obtenidas a partir de estas siembras de cada lechón individual. Se tomaron varias colonias compatibles con morfología de bifidobacteria provenientes la siembra en placa con MBM. Se encontró una elevada cantidad de bacterias en MRS y Agar Mac Conkey. Se pudo confirmar la presencia de lactobacilos y bifidobacterias en el medio MBM, ambos con morfología de colonia diferente. Se destaca la morfología que diferencial lograda entre los lactobacilos de las bifidobacterias, igual que lo indicado por Rodríguez García (2019). Las colonias de bifidobacterias se observaron como colonias puntiformes muy pequeñas elevadas, con forma de gota de agua, bordes definidos y centro verde, en cuanto a la morfología de los lactobacilos se observaron colonias más grandes de color blanco amarillento.

Se seleccionaron 20 cepas con morfología de bifidobacteria, fueron crioconservadas en caldo MRS con cisteína (0,5%) y glicerol (17%) y liofilizadas en medio con Leche-Lactosa. Se caracterizaron por PCR (resultado positivo), solo una cepa pura compatible con *Bifidobacterium* (proveniente del lechón 8) se secuenció en el Laboratorio de Alimentos Stambouljan confirmando resultado 100% de compatibilidad para *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Este aislamiento se encuentra en concordancia con Horvathova y col. (2023) quienes también aislaron cepas de esta especie de muestras de colon y materia fecal de cerdos y lechones, siendo esta una de las más preponderantes dentro del género *Bifidobacterium*.

4. Conclusiones

El medio ensayado en el presente estudio nos permitió reconocer colonias compatibles con bifidobacterias a partir de una muestra biológica (intestinal), en la cual

coexisten múltiples especies microbianas. Se logró aislar e identificar una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, la cual será utilizada en futuros ensayos para evaluar su capacidad probiótica y posible utilización en alimentos funcionales.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el invaluable apoyo de la Doctora Cristina Monteavaro. Secretaría de Ciencia, Arte y Tecnología (SECAT) Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN) Programa de Fortalecimiento de la Ciencia y la Tecnología.

6. Bibliografía

Camaschella, P.; Mignot, O.; Pirovano, F.; Sozzi, T. (1998). Method for differentiated enumeration of mixed cultures of thermophilic lactic acid bacteria and bifidobacteria by using only one culture medium. *Le Lait* 78(4): 461-467.

Draksler, D.; Locascio, M.; González, S.; Oliver, G. (2002). The development of faecal flora in young Creole goats. *Small Ruminant Research* 46: 67-70.

Dubernet, S.; Desmases, N.; Gueguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 214(2): 271-275.

Furrie, E.; Macfarlane, S.; Kennedy, A.; Cummings, J. H.; Walsh, S. V.; O'Neil D, A.; Macfarlane, G. T. (2005). Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54(2): 242-249.

Groeger, D.; O'Mahony, L.; Murphy, E. F.; Bourke, J. F.; Dinan, T. G.; Kiely, B.; Shanahan, F.; Quigley, E. M. (2013). *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes* 4(4): 325-339.

Guardamagna, O.; Amaretti, A.; Puddu, P. E.; Raimondi, S.; Abello, F.; Cagliero, P.; Rossi, M. (2014). Bifidobacteria supplementation: effects on plasma lipid profiles in dyslipidemic children. *Nutrition* 30(7-8): 831-836.

Gueniche, A.; Bastien, P.; Ovigne, J. M.; Kermici, M.; Courchay, G.; Chevalier, V.; Breton, L.; Castiel-Higounenc, I. (2010). *Bifidobacterium longum* lysate, a new ingredient for reactive skin. *Exp Dermatol* 19(8): e1-8.

Horvathova, K.; Modrackova, N.; Splichal, I.; Splichalova, A.; Amin, A.; Ingribelli, E.; Killer, J.; Doskocil, I.; Pechar, R.; Kodesova, T.; Vlkova, E. (2023). Defined Pig Microbiota with a Potential Protective Effect against Infection with *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms* 11(4).

Hutt, P.; Andreson, H.; Kullisaar, T.; Vihalemm, T.; Unt, E.; Kals, J.; Kampus, P.; Zilmer, M.; Mikelsaar, M. (2009). Effects of a synbiotic product on blood antioxidative activity in subjects colonized with *Helicobacter pylori*. *Lett Appl Microbiol* 48(6): 797-800.

Kwon, H. S.; Yang, E. H.; Yeon, S. W.; Kang, B. H.; Kim, T. Y. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 239(2): 267-275.

Laboratorio_BD. (2003). Instrucciones de uso – Medios en placa listos para usar - BD *Bifidobacterium* Agar, Modified. Consulta: 27/09/2023.

- Lau, A. S.; Yanagisawa, N.; Hor, Y. Y.; Lew, L. C.; Ong, J. S.; Chuah, L. O.; Lee, Y. Y.; Choi, S. B.; Rashid, F.; Wahid, N.; Sugahara, H.; Xiao, J. Z.; Liong, M. T. (2018). Bifidobacterium longum BB536 alleviated upper respiratory illnesses and modulated gut microbiota profiles in Malaysian pre-school children. *Benef Microbes* 9(1): 61-70.
- Leuschner, R. G.; Bew, J.; Simpson, P.; Ross, P. R.; Stanton, C. (2003). A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. *Int J Food Microbiol* 83(2): 161-170.
- Matsuki, T.; Watanabe, K.; Fujimoto, J.; Miyamoto, Y.; Takada, T.; Matsumoto, K.; Oyaizu, H.; Tanaka, R. (2002). Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68(11): 5445-5451.
- McDonald, L.; McFeeters, R.; Daeschel, M.; Fleming, H. (1987). A Differential Medium for the Enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6): 1382-1384.
- Miraglia Del Giudice, M.; Indolfi, C.; Capasso, M.; Maiello, N.; Decimo, F.; Ciprandi, G. (2017). Bifidobacterium mixture (B longum BB536, B infantis M-63, B breve M-16V) treatment in children with seasonal allergic rhinitis and intermittent asthma. *Ital J Pediatr* 43(1): 25.
- Odamaki, T.; Xiao, J. Z.; Iwabuchi, N.; Sakamoto, M.; Takahashi, N.; Kondo, S.; Miyaji, K.; Iwatsuki, K.; Togashi, H.; Enomoto, T.; Benno, Y. (2007). Influence of Bifidobacterium longum BB536 intake on faecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season. *J Med Microbiol* 56(Pt 10): 1301-1308.
- Powell, W. T.; Borghese, R. A.; Kalanetra, K. M.; Mirmiran, M.; Mills, D. A.; Underwood, M. A. (2016). Probiotic Administration in Infants With Gastroschisis: A Pilot Randomized Placebo-Controlled Trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 62(6): 852-857.
- Rodríguez García, D. M. (2019). Validación de una metodología para la cuantificación de un microorganismo probiótico (*Lactobacillus acidophilus* La3) en yogur. *Magister en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, Universidad de Antioquia Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias.
- Simpson, P. J.; Fitzgerald, G. F.; Stanton, C.; Ross, R. P. (2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *J Microbiol Methods* 57(1): 9-16.
- Steed, H.; Macfarlane, G. T.; Blackett, K. L.; Bahrami, B.; Reynolds, N.; Walsh, S. V.; Cummings, J. H.; Macfarlane, S. (2010). Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 32(7): 872-883.
- Tamaki, H.; Nakase, H.; Inoue, S.; Kawanami, C.; Itani, T.; Ohana, M.; Kusaka, T.; Uose, S.; Hisatsune, H.; Tojo, M.; Noda, T.; Arasawa, S.; Izuta, M.; Kubo, A.; Ogawa, C.; Matsunaka, T.; Shibatouge, M. (2016). Efficacy of probiotic treatment with Bifidobacterium longum 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Dig Endosc* 28(1): 67-74.
- Wu, B. B.; Yang, Y.; Xu, X.; Wang, W. P. (2016). Effects of Bifidobacterium supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World J Pediatr* 12(2): 177-182.
- Xiao, J. Z.; Kondo, S.; Yanagisawa, N.; Miyaji, K.; Enomoto, K.; Sakoda, T.; Iwatsuki, K.; Enomoto, T. (2007). Clinical efficacy of probiotic Bifidobacterium longum for the treatment of symptoms of Japanese cedar pollen allergy in subjects evaluated in an environmental exposure unit. *Allergol Int* 56(1): 67-75.

