

BIFIDOBACTÉRIAS: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E APLICAÇÃO EM ALIMENTOS PROBIÓTICOS

JACIARA ZARPELLON MAZO*
EUNICE CASSANEGO ILHA**
ANA CAROLINA M. ARISI***
ERNANI S. SANT'ANNA***

Esta revisão de literatura teve por objetivo descrever os principais meios de cultura já desenvolvidos para o isolamento e enumeração de bifidobactérias, e os métodos moleculares utilizados para a identificação desse gênero e de suas espécies. Os critérios de seleção das bifidobactérias probióticas visando à aplicação tecnológica também foram abordados (como tolerância a pH baixo, presença de oxigênio e presença de ingredientes e aditivos). Diversas pesquisas realizadas com bifidobactérias para o desenvolvimento de alimentos probióticos foram citadas. A importância do isolamento e identificação das bifidobactérias envolve a aplicação desses microrganismos como agentes probióticos em alimentos. Pode-se concluir que a constante busca pela saúde tende a aumentar o consumo de alimentos probióticos, estimulando a diversificação de produtos e a descoberta de novas cepas com essa função.

PALAVRAS-CHAVES: BIFIDOBACTÉRIAS; MEIOS DE CULTURA; MÉTODOS MOLECULARES; PROBIÓTICOS.

- * Doutoranda em Ciência dos Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC (e-mail: jaciaramazo@gmail.com).
** Farmacêutica-Bioquímica, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, SC (e-mail: eunilha@cca.ufsc.br).
*** Docentes, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, SC (e-mail: arisi@cca.ufsc.br; ernaniss@cca.ufsc.br).

1 INTRODUÇÃO

As bifidobactérias foram isoladas e descritas pela primeira vez, em 1899, por Tissier, sendo denominadas de *Bacillus bifidus communis*. O gênero *Bifidobacterium sp* foi proposto originalmente por Orla-Jensen, em 1924, mas somente em 1986 foi aceito e reconhecido como gênero independente na oitava edição do *Manual Bergey's* (TESHIMA, 2001). Caracterizam-se, em geral, como microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios, podendo apresentar formas variadas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos bifurcados (HOLT *et al.*, 1994). A temperatura ótima de crescimento das bactérias bífidas abrange de 37°C a 41°C, não havendo crescimento em temperaturas abaixo de 25-28°C e acima de 43°-45°C. O pH ótimo de crescimento compreende a faixa de 6,0 a 7,0, não ocorrendo crescimento abaixo de 4,5 a 5,0 ou acima de 8,0 a 8,5 (SCARDOVI, 1986).

Diferem das bactérias lácticas homo e heterofermentativas na forma de fermentação da glicose, a qual ocorre pela via frutose-6-fosfato, produzindo ácido acético e ácido láctico na forma L(+) na proporção molar de 3:2, respectivamente, e 5 moles de ATP, a partir de 2 moles de glicose. A presença de frutose-6-fosfato- fosfocetolase (F6PPK) distingue o gênero de outros do grupo. Essa enzima quebra a frutose-6-fosfato em acetil-fosfato e eritrose-4-fosfato, sendo o único gênero bacteriano de origem intestinal que apresenta essa via fermentativa conhecida como "via bífida" (MODLER, McKELLAR e YAGUCHI, 1990). Todas as espécies fermentam glicose, galactose, frutose e lactose, com exceção de *B. gallicum* que não utiliza lactose (BIAVATI *et al.*, 1992, citado por TESHIMA, 2001). Mais de 30 espécies já foram identificadas, sendo 11 isoladas do trato gastrointestinal humano (WARD e ROY, 2005).

Esta revisão de literatura teve por objetivo descrever os principais meios de cultura já desenvolvidos para o isolamento e enumeração de bifidobactérias e os métodos moleculares utilizados para identificação do gênero e das espécies de *Bifidobacterium*, os quais servem de subsídio para a pesquisa de novas cepas com atividade probiótica e sua possível aplicação em alimentos funcionais.

2 ISOLAMENTO DAS BIFIDOBACTÉRIAS

O meio de cultura adotado para o isolamento das bifidobactérias deve promover seu crescimento seletivo, enquanto outros microrganismos devem ser suprimidos (HARTEMINK *et al.*, 1996). A utilização de meios não seletivos e ricos nutricionalmente como *De Man, Rogosa and Sharp* (MRS) e *Trypticase Phytone Yeast* (TPY) para isolamento de bifidobactérias pode dificultar sua identificação, uma vez que várias outras espécies podem crescer nesses meios (BIAVATI *et al.*, 1992, citado por TESHIMA, 2001). Porém, o método mais utilizado ainda é o de contagem em placas.

TERAGUCHI *et al.* (1978), citados por LAROIA e MARTIN (1991), formularam o meio para enumeração de bifidobactérias em produtos lácteos. Esse meio chamado **Neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride (NPNL)** apresenta ágar *Blood-glucose-liver* (BL) com sulfato de neomicina, sulfato de paromomicina, ácido nalidíxico e cloreto de lítio. Muitos autores o consideram meio de referência pelo bom crescimento das bifidobactérias e possível inibição de cocos Gram positivos e Gram negativos, porém a seletividade desse meio tem como base o uso de antibióticos e na microbiota intestinal de recém-natos existe grande variação intraespecífica da resistência de bifidobactérias a antibióticos (LIM, HUH e BAEK, 1993; CHARTERIS *et al.*, 1998).

MUÑO A e PARES (1988) desenvolveram meio para isolamento e enumeração de bifidobactérias em meios aquáticos naturais para monitorar a qualidade bacteriológica da água. **Bifidobacterium Iodoacetate Medium 25 (BIM-25)** tem sua seletividade baseada na presença de iodoacetato e dos antibióticos ácido nalidíxico, sulfato de polimixina B e sulfato de kanamicina. Nenhuma bactéria Gram negativa cresceu nesse meio, sendo que as bifidobactérias testadas se desenvolveram (com exceção de *B. adolescentis*) o suficiente para análises do gênero *Bifidobacterium sp.* como indicador de contaminação fecal.

BEERENS (1990) verificou que muitos meios seletivos para bifidobactérias vinham sendo descritos, porém a maioria apresentava antibióticos na composição e nenhum era satisfatório para todas as espécies. Desta forma, desenvolveu o **Beerens' Medium** combinando o baixo pH (5,0) com ácido propiônico. Esse meio mostrou-se eletivo e seletivo para todas as espécies de bifidobactérias, com aumento de crescimento, exceto *B. coryneforme*.

Lithium Chloride-Sodium Propionate Agar (Agar LP) constitui meio simples e seguro para isolamento seletivo e enumeração de bifidobactérias de leites fermentados, o qual apresenta cloreto de lítio e propionato de sódio para inibir o crescimento de outras bactérias ácido lácticas. Com exceção de uma cepa de *B. longum*, todas as demais bifidobactérias foram capazes de crescer nesse meio (LAPIERRE, UNDELAND e COX, 1992).

O meio chamado **Blood-glucose-liver Agar (BL-OG)**, contendo bile (Oxgall) e gentamicina, foi formulado para enumeração seletiva de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados com a presença de lactobacilos e estreptococos. A recuperação das cepas bífidas testadas girou em torno de 90%, exceto para uma cepa de *B. longum*, e todas as demais bactérias ácido lácticas presentes foram inibidas (LIM, HUH e BAEK, 1995).

O meio "**Bif**" foi desenvolvido por PACHER e KNEIFEL (1996) para a detecção e enumeração de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados. A seletividade desse meio foi baseada na adição de soro de leite humano e dos antibióticos ácido nalidixico, sulfato de paromomicina, aztreonam e netilmicina. Quando utilizado para contagem em placas de diferentes produtos lácteos apresentou grande espectro de bifidobactérias, podendo ser usado em análises de rotina.

HARTEMINK *et al.* (1996) desenvolveram novo meio para a detecção seletiva de bifidobactérias, o qual chamaram de **Raffinose-Bifidobacterium (RB) Medium**. Foram utilizados rafinose como fonte de carboidratos, púrpura de bromocresol como indicador de pH, propionato e cloreto de lítio para estimular o crescimento e caseína como fonte de proteína. Todas as bifidobactérias de origem humana e de produtos lácteos cresceram bem nesse meio, exceto algumas cepas de *Bifidobacterium longum* que não fermentam rafinose.

Bifidobacterium Medium (BFM), meio livre de antibióticos, foi estabelecido por NEBRA e BLANCH (1999) para a enumeração de bifidobactérias no meio ambiente ou em alimentos. Utilizaram lactulose como a principal fonte de carbono, enquanto que riboflavina e tiamina foram adicionadas como promotoras do crescimento. Ácido propiônico, cloreto de lítio e azul de metileno inibiram outras espécies bacterianas relacionadas, e o baixo pH inibiu o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*.

VINDEROLA e REINHEIMER (1999) propuseram metodologias para a enumeração de bactérias probióticas (bifidobactérias e *Lactobacillus acidophilus*) na presença das bactérias do iogurte. Para a contagem de bifidobactérias utilizaram dois meios modificados: o **BL-MRS**, inicialmente proposto por LIM, HUH e BAEK (1995), e o **meio LP-MRS**, sugerido por LAPIERRE, UNDELAND e COX (1992), com substituição do ágar base pelo MRS (*De Man, Rogosa and Sharp*).

RADA e PETR (2002) compararam os meios **Trypticase Phytone Yeast Mupirocin Medium (MTPY)** e **Trypticase Phytone Yeast Mupirocin Medium Colistin (MTPYC)** por eles desenvolvidos para enumerar bifidobactérias de amostras intestinais e fecais. Os compostos seletivos continham o antibiótico mupirocina em ambos os meios, e no meio MTPYC ainda foram utilizados ácido acético glacial e outro antibiótico, a colistina (polimixina E). Ágar MTPY mostrou-se seletivo para todas as amostras testadas, com exceção das fezes de suínos. Ágar MTPYC apresentou 100% de seletividade para bifidobactérias.

Metodologia de plaqueamento seletivo para enumeração de culturas mistas presentes no leite fermentado foi sugerida por TABASCO *et al.* (2007). Os meios utilizados estavam livres de antibióticos, sendo que a enumeração de *Bifidobacterium lactis* foi obtida pelo meio **MRS-rafinose** contendo 0,05% de cloreto de lítio. Outros meios, seletivos e não seletivos foram descritos para a enumeração de bifidobactérias, como os mostrados na Tabela 1.

TABELA 1 - MEIOS DE CULTURA DESENVOLVIDOS PARA A ENUMERAÇÃO E ISOLAMENTO DE BIFIDOBACTÉRIAS

Meio de Cultura	Base da Seletividade	Usos	Referência
AL Ágar	Lactose, acetilglicosamina	fezes	YAZAWA, NAKAJIMA e TAMURA (1984)
AMC Ágar	Ácido nalidíxico, polimixina B, sulfato de kanamicina, ácido iodoacético, TTC, cloreto de lítio, propionato	<i>B. longum</i>	ARROYO, COTTON e MARTIN (1995)
BBM Ágar	Ácido nalidíxico, rifampicina, rafinose	fezes	COLE e FULLER (1989)
BiBI Ágar	Anilina azul, sangue	fezes, produtos farmacêuticos	RASIC (1990)
BS Ágar	Cloreto de lítio, neomicina, paramomicina, propionato	fezes	RASIC (1990)
CB Ágar	Azul da China	fezes	MEVISSSEN-VERHAGE <i>et al.</i> (1987)
GL Ágar	Galactose, cloreto de lítio	produtos lácteos	IWANA <i>et al.</i> (1993)
LCL Ágar	Lactose, infusão de fígado	fezes	RASIC (1990)
MPN Ágar	Lactose, ácido nalidíxico	fezes	TANAKA e MUTAI (1980)
MRS-LP Ágar	Propionato, cloreto de lítio	produtos lácteos	Gomes <i>et al.</i> (1995)
RCM (modificado)	pH baixo	produtos lácteos	RASIC (1990)
RCM + corante	Azul de metileno	produtos lácteos	RASIC (1990)
Rogosa	pH baixo	produtos lácteos, fezes	RASIC (1990)
Rogosa Modificado	Neomicina, propionato paramomicina, cloreto de lítio	produtos lácteos	RASIC (1990)
Rogosa-N	pH baixo, ácido nalidíxico	fezes	RASIC (1990)
TCPY Ágar	Suco de tomate	fezes	RASIC (1990)
TCPY Ágar Modificado	Suco de tomate, azida	fezes	RASIC (1990)
TCPY Ágar Modificado	Suco de tomate, ácido sórbico	fezes	RASIC (1990)
TOS Ágar	TOS	fezes, produtos lácteos	SONOIKE, MADA e MUTAI (1986)
TOS Ágar Modificado	TOS, ácido nalidíxico, neomicina, paramomicina	produtos lácteos	WIJSMAN, HEREIJGERS e De GROOTE (1989)
TPYd Ágar	Dicloxacilina	produtos lácteos	Sozzi <i>et al.</i> (1990)
TTC Ágar	TTC	contaminação fecal	GYLLENBERG e NIEMELA (1957)
VF Ágar Modificado	Cloreto de lítio, propionato, neomicina, lauril sulfato de sódio	produtos lácteos	CALICCHIA <i>et al.</i> (1993)
YN-6	Lactose, ácido nalíxico, neomicina, verde de bromocresol	fezes, esgotos	RESNICK e LEVIN (1981)

Fonte: modificado de HARTEMINK *et al.* (1996).

3 IDENTIFICAÇÃO DAS BIFIDOBACTÉRIAS

Diversos métodos podem ser empregados para a identificação das bifidobactérias, tais como técnicas moleculares (baseadas em DNA ou rRNA), fluorescentes ou imunológicas, bem como os métodos enzimáticos. A identificação baseada em características fenotípicas nem sempre fornece resultados claros e confiáveis, bem como não permitem a diferenciação entre algumas espécies, como *B. longum* e *B. infantis* (ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996).

A identificação do gênero *Bifidobacterium* é convenientemente alcançada pela detecção da atividade da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase (F6PPK), mas como *Gardnerella vaginalis* também expressa essa enzima são necessários critérios adicionais para distinguir essas espécies (MULLIÉ *et al.*, 2003).

Os primeiros métodos de identificação molecular desenvolvidos foram hibridização DNA-DNA, análise da sequência de 16S rDNA, hibridização com molde específico e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Baseados na composição em ácidos nucleicos, normalmente são usados em associação com a identificação microbiológica convencional (WARD e ROY, 2005).

Na hibridização DNA-DNA utilizam-se membranas filtrantes para a fixação do DNA e radioisótopos para a detecção (CROCIANI *et al.*, 1996), ou microplacas e fotobiotina (SATOKARI *et al.*, 2001; YAESHIMA *et al.*, 1996) para verificar a homologia entre as cepas isoladas e a cepa padrão. Se a porcentagem de homologia for maior que 70% entre as cepas isoladas e a padrão, e o critério fenotípico corresponder ao resultado, essas cepas podem ser agrupadas na mesma espécie. Como exemplo, *B. longum* e *B. infantis* apresentam similaridade próxima a 70% (HERREMAN, ASSELIN e NOVEL, 1994, citados por WARD e ROY, 2005) e *B. animalis* e *B. lactis* maior que 80% (MATSUKI, WATANABE e TANAKA, 2003).

O gene 16S rRNA, considerado universalmente como presente em todas as bactérias, mostrou alto grau de preservação da sequência. A verificação da homologia por esse gene demonstra alguns resultados interessantes para análises filogenéticas do gênero *Bifidobacterium* (FROTHINGHAM, DUNCAN e WILSON, 1993, citados por WARD e ROY, 2005). As similaridades são muito altas em algumas espécies, como *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum* (similaridade de 99,5%), *B. longum* e *B. infantis* (similaridade 99,1%), *B. lactis* e *B. animalis* (similaridade de 99%) (MEILE *et al.*, 1997; MIYAKE *et al.*, 1998). A unificação de *B. infantis*, *B. longum* e *B. suis* dividiu-as em três biotipos e a separação de *B. lactis* de *B. animalis* em níveis de subespécies foram propostas (VENTURA e ZINK, 2002; MASCO *et al.*, 2004, SAKATA *et al.*, 2002, citados por WARD e ROY, 2005).

Para a hibridização com sonda específica, o ácido nucleico é fixado num suporte sólido, nitrocelulose ou membrana de nylon, por *dot blot* ou hibridização da colônia (ITO, OHNO e TANAKA, 1992; KAUFMANN *et al.*, 1997). A sonda pode ser um simples oligonucleotídeo ou fragmento de DNA clonado e caracterizado, marcado com biotina ou digoxigenina para produzir reação colorimétrica (KAUFMANN *et al.*, 1997) ou radiomarcado (ITO, OHNO e TANAKA, 1992). Com as sondas radiomarcadas, a quantidade de híbridos formados é determinada por autorradiografia.

Fluorescence in-situ hybridization (FISH) utilizando lâmina de microscópio também é usada para detectar e determinar a população de *Bifidobacterium* spp. em diferentes amostras (LANGENDIJK *et al.*, 1995). Algumas sondas gênero-específicas e espécie-específicas para detectar e determinar a população de *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. animalis* e *B. longum* foram propostas (CHARTERIS *et al.*, 1997; ITO, OHNO e TANAKA, 1992; YAMAMOTO, MOROTOMI e TANAKA, 1992).

Ribotyping ou *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) é utilizada na identificação de polimorfismos que determinam a alteração do padrão de clivagem obtido a partir de determinada região do DNA. A sonda é a própria região potencialmente polimórfica, contendo 16S ou 23S ou ambos 16S e 23S DNA complementar. Antes da hibridização, o DNA é digerido com *Bam*HI, *Eco*RV, *Pvu*II ou *Nar*I (MANGIN *et al.*, 1994) e transferido em membrana por *Southern blot*. Esse método possibilitou a diferenciação entre as espécies de *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. longum* (MACCARTNEY e TANNOCK, 1995).

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) constitui técnica de operação rápida, exata, sensível e fácil. Permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA, usando dois iniciadores (*primers*) que hibridizam com as fitas opostas em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. A especificidade dessa técnica está diretamente associada à seleção dos iniciadores e à temperatura de seus anelamentos. A amplificação de DNA de bifidobactérias pode ser feita diretamente numa colônia ou amostra fecal, sem necessidade de cultivo prévio (KULLEN *et al.*, 1997; MULLIÉ *et al.*, 2003). Como vantagem para a detecção de *Bifidobacterium*, essa técnica não requer condições anaeróbicas como o método de cultivo clássico (MATSUKI, WATANABE e TANAKA, 2003). Alguns pares de iniciadores baseados em 16S rDNA ou na sequência transcrita interna 16S para 23S foram selecionados para a detecção do gênero *Bifidobacterium* e para as principais espécies humanas (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, grupo *B. catenulatum*, *B. dentium* e *B. gallicum*) (MATSUKI *et al.*, 1998; MATSUKI *et al.*, 1999; ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996; SILVI *et al.*, 2003; WANG, CAO e CERNIGLIA, 1996) e cepas usadas em produtos comerciais (*B. lactis* e *B. animalis*) (PRASAD *et al.*, 1998; VENTURA, RENIERO e ZINK, 2001). KOK *et al.* (1996), visando detectar cepas de bifidobactérias e identificá-las, desenvolveram três tipos de iniciadores (*primers*): gerais Bif16S3, Bif16S4 e Bif23S1; iniciadores específicos para gêneros Bif 164-PCR e Bif 662-PCR e iniciadores específicos para as cepas LW420A, LW420C e LW420D. BRIGIDI *et al.* (2003) utilizaram a técnica da PCR para identificar e enumerar cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium infantis* Y1 e *Bifidobacterium breve* Y8 em amostras fecais após a administração de preparação farmacêutica (VSL-3) ou iogurte, sendo que a amplificação do DNA foi obtida por meio de iniciadores específicos para cepas InfY-BV.L/R e BreY-BV.L/R.

Multiplex PCR é similar à PCR convencional. Muitos pares de iniciadores são usados na mesma reação e ao mesmo tempo para a detecção de muitos gêneros bacterianos ou de diferentes espécies. Outras vantagens dessa técnica envolvem a redução do número de reações da PCR e a redução do tempo gasto. Neste método, algumas recomendações são importantes: 1) a temperatura do anelamento dos iniciadores deve ser a mesma para todos os pares; 2) os iniciadores usados não podem causar nenhuma reação cruzada; 3) tamanhos diferentes dos produtos da PCR são necessários para possibilitar a distinção entre as diferentes espécies ou bactérias; e 4) deve ser usada grande quantidade de Taqpolimerase (MATSUKI, WATANABE e TANAKA, 2003). Diferentes *multiplex* têm sido designados para detecção simultânea de: 1) *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* e *B. adolescentis* (DONG, CHENG e JIAN, 2000); 2) *B. bifidum*, *B. breve* e *B. infantis*; 3) *B. angulatum*, *B. catenulatum*/*B. pseudocatenulatum*, *B. dentium* e *B. longum*; e 4) *B. adolescentis*, *B. scardovii* e *B. gallicum* (MULLIÉ *et al.*, 2003).

Sequências de genes específicos podem ser usadas para identificação e caracterização de *Bifidobacterium*. Alguns genes diferentes de 16S rRNA são empregados para a diferenciação de bifidobactérias, gene L-lactato desidrogenase (*ldh*), gene *recA*, gene 60 kg.mol⁻¹ proteína (HSP60), gene piruvato quinase (PK) (KULLEN, BRADY e O'SULLIVAN, 1997; ROY e SIROIS, 2000; VAUGIEN, PREVOTS e ROQUES, 2002). Antes do sequenciamento, parte do gene é selecionada e amplificada por PCR, o qual é sequenciado, analisado e comparado com as outras sequências. Com pequena região dos genes *recA* (231 pb) e *ldh* (312 pb) é possível distinguir entre as principais espécies humanas (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve* e *B. animalis*) (KULLEN, BRADY e O'SULLIVAN, 1997; ROY e SIROIS, 2000). A análise da região do gene *ldh* mostrou que a sequência de nucleotídeos de *B. lactis* DSM 10140 e *B. animalis* ATCC 27536 são idênticas, porém diferentes de *B. lactis* DSM 10140 e *B. animalis* ATCC 25527 (ROY e SIROIS, 2000). O gene parcial piruvato quinase (300 pb) possibilitou diferenciar *B. infantis* e *B. longum* e também *B. animalis* de *B. lactis* (VAUGIEN, PREVOTS e ROQUES, 2002). Finalmente, análises de sequências parciais do gene *hsp60* (538 pb) é muito efetiva para diferenciação entre todas as espécies humanas de *Bifidobacterium*. A similaridade é de 93% entre *B. catenulatum* e *B.*

pseudocatenulatum, 98% entre *B. longum*, *B. infantis* e *B. suis* e 98% entre *B. animalis* e *B. lactis* (JIAN, ZHU e DONG, 2001). O gene *hsp60* constitui poderosa ferramenta para estudo filogenético de espécies de *Bifidobacterium*, melhor que o gene 16S rRNA (WARD e ROY, 2005).

A técnica *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) baseia-se na seleção das enzimas de restrição, visando clara distinção entre o padrão e a maior quantidade de espécies. Análises e comparações de mais de um perfil de restrição podem ser necessárias para a diferenciação de espécies muito próximas. O primeiro estudo de ROY e SIROIS (2000) demonstrou diferenças entre *B. animalis*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* e *B. adolescentis* após amplificação da região de 914 pb do gene 16S rRNA e restrição com *Bam*HI, *Sau*3AI e *Taq*I. O padrão de restrição de cepas de *B. lactis* foi idêntico às cepas de *B. animalis*. *B. longum* apresentou-se muito próximo a *B. infantis*, mas a diferença entre essas espécies foi obtida com a enzima de restrição *Sau*3AI. Alguns resultados similares foram obtidos por VENTURA, RENIERO e ZINK (2001) após a restrição do gene 16S rRNA com *Bam*HI e *Sau*3AI. Contudo, essa equipe demonstrou a possibilidade de diferenciar também *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum* com esses padrões. VENTURA *et al.* (2001), em outro trabalho, utilizando ARDRA (duas endonucleases de restrição: *Sau*3AI e *Bam*HI) demonstraram a detecção espécie-específica de *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. coryneforme*, *B. cunivuli*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. suis*, *B. magnum*, *B. pseudolongum*, *B. pseudocatenulatum* e *B. pullorum* presentes em diferentes meios microecológicos. VENEMA e MAATHUIS (2003) compararam todas as espécies de *Bifidobacterium* encontradas no trato digestivo humano, incluindo *B. lactis* e *B. animalis*, mediante combinação de seis padrões de restrição de um fragmento do gene 16S ribossômico de 511 a 525 pb com as enzimas *Taq*I, *Sau*3AI, *Rsa*I, *Alu*I, *Sau*96I e *Nci*I. O sistema ARDRA representa ferramenta de identificação molecular boa e reprodutível para espécies de *Bifidobacterium* humanas. Esse método permite a diferenciação entre *B. infantis* e *B. longum* ou entre *B. catenulatum* e *B. pseudocatenulatum* (ROY e SIROIS, 2000; VENEMA e MAATHUIS, 2003; VENTURA, RENIERO e ZINK, 2001). A Enzima *Nci*I também foi usada para distinguir *B. animalis* e *B. lactis* (VENEMA e MAATHUIS, 2003). Resultados similares foram obtidos por KRIZOVÁ, SPANOVÁ e RITTICH (2006).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) baseia-se no fenômeno descontínuo de dissociação, possibilitando a resolução de fragmentos do DNA com a substituição de um único nucleotídeo. As principais dificuldades com a DGGE envolvem a escolha do tempo de corrida adequado e as condições do gel para realizar ótima separação. A amplificação PCR das regiões V2-V3 do 16S rDNA ou fragmento de DNA transaldolase seguido por DGGE permitiu a separação de *B. animalis*, *B. lactis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum* e *B. breve* (FASOLI *et al.*, 2003; REQUENA *et al.*, 2002). Esse método tornou-se popular na avaliação da composição bacteriana em amostras fecais (ROY e SIROIS, 2000; SATOKARI *et al.*, 2001) e pode ser interessante e rápido para a triagem das bifidobactérias componentes de produtos probióticos (FASOLI *et al.*, 2003).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) tem sido usada para caracterizar bactérias probióticas. Com essa técnica, o genoma inteiro extraído de cultivo bacteriano é usado para gerar o perfil de DNA após a amplificação da PCR com iniciadores ao acaso (VINCENT *et al.*, 1998). Esses iniciadores são frequentemente dez nucleotídeos e somente um é usado em cada reação. Os diferentes tamanhos dos *amplicons* foram visualizados em luz ultravioleta após eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio. Os perfis da RAPD podem ser combinados e analisados com *software* apropriado. RAPD tem como vantagem a possibilidade de distinguir cepas dentro das espécies que não podem ser diferenciadas por ARDRA. VINCENT *et al.* (1998) usaram grupos de iniciadores OPA-02, OPA-18, OPL-07, OPL-16 e OPM-05 em diferentes grupos de *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* e *B. animalis*. Cepas de *B. infantis* foram agrupadas num subgrupo de *B. longum*. Resultados similares foram obtidos por SAKATA *et al.* (2002), citados por WARD e ROY (2005), com *B. infantis*, *B. longum* e *B. suis*. A comparação de perfis da RAPD também pode ser usada para recuperar cepa específica em amostras diferentes. As variações entre as espécies e as cepas podem ser identificadas com o número e o

tamanho dos fragmentos de DNA. Às vezes, a reprodutibilidade dessa técnica é baixa, exigindo condições de controle e manuseio meticulosos (WARD e ROY, 2005).

Boa reprodutibilidade e eficiente diferenciação entre as cepas de *Bifidobacterium* foi observada pelo método de eletroforese *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Comparada com outras técnicas moleculares, a PFGE requer grande quantidade de tempo e exige a extração do DNA genômico em agarose. Essa extração permite ter o DNA intacto antes da digestão. Poucas enzimas de restrição podem ser selecionadas para obter perfil de DNA contendo de 10 a 20 fragmentos. Mudanças periódicas na orientação do campo elétrico durante migração de 18-24h permite a separação de grandes fragmentos de DNA. *XbaI*, *SpeI*, *DraI* e *Asel* são quatro enzimas que geram padrões seletivos para as cepas de *Bifidobacterium* (BOURGET, SIMONET e DECARIS, 1993; O'RIODAN e FITZGERALD, 1997; PRASAD *et al.*, 1998; ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996). Perfis PFGE foram obtidos com algumas cepas comerciais (ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996) e cepas-padrão de *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. cateculatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. lactis* e *B. breve* (BOURGET, SIMONET e DECARIS, 1993; O'RIODAN e FITZGERALD, 1997; PRASAD *et al.*, 1998; ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996). Esses perfis são geralmente diferentes entre as diversas cepas. Contudo, *B. animalis* ATCC 25527 e ATCC 27674 apresentam o mesmo molde após a digestão com *XbaI* e *SpeI* da mesma forma que as cepas de *B. animalis* ATCC 27536 e *B. lactis* DSM 10140. A maioria das cepas de *Bifidobacterium* isoladas de preparações comerciais europeias não puderam ser distintas de *B. animalis* ATCC 27536, previamente isolado de fezes de galinha (ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996). PFGE pode também ser usada para estimar o tamanho do genoma. Algumas grandes variações foram observadas em tamanhos de genomas de algumas cepas pertencentes a mesma espécie, como, por exemplo, o tamanho estimado de *B. bifidum* após a digestão com *XbaI* ficou entre 1,6 e 2,2 Mb (ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996) e do genoma de *Bifidobacterium* entre 1,1 e 2,2 Mb (BOURGET, SIMONET e DECARIS, 1993; O'RIODAN e FITZGERALD, 1997; ROY, WARD e CHAMPAGNE, 1996).

PCR em tempo real para o gene transaldolase foi usado para detectar e enumerar bifidobactérias em amostras fecais (ROY e SIROIS, 2000). A comparação de contagens de bifidobactérias obtidas por cultivo e a PCR em tempo real mostrou boa correlação (MATSUKI, WATANABE e TANAKA, 2003; REQUENA *et al.*, 2002). Essa técnica pode ser utilizada para detectar diferentes espécies de *Bifidobacterium* com algumas sondas baseadas no gene *hsp60*, ou ser usada em *multiplex* para a detecção de algumas espécies de *Bifidobacterium* presentes simultaneamente no mesmo produto. MASCO *et al.* (2007) utilizaram PCR em tempo real para enumerar as bifidobactérias presentes em 29 produtos probióticos que alegavam conter esses microrganismos. Apenas 11 dos produtos analisados (38%) continham a concentração mínima de 10⁶ UFC/mL ou g de *Bifidobacterium*.

PCR competitiva foi desenvolvida para estimar a quantidade de bifidobactérias em amostras fecais humanas, usando dois *primers* gênero-específicos, Bif164f e Bif662r. A PCR-TTGE, realizada com os mesmos *primers*, também permitiu descrever as espécies de bifidobactérias presentes nas amostras fecais. A PCRc possibilitou rápida, altamente específica e reprodutível quantificação do gênero *Bifidobacterium*. A TTGE permitiu a identificação de *B. longum* em dez das onze amostras analisadas e *B. adolescentis* e *B. bifidum* em cinco dessas amostras. Assim, PCRc e PCR-TTGE podem ser associadas para melhor caracterizar bifidobactéria em amostras fecais humanas (MANGIN *et al.*, 2006).

TABASCO *et al.* (2007) adotaram meios seletivos sem a adição de antibióticos para isolar as bactérias de cultura mista presente em leite fermentado, formada por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *Bifidobacterium lactis*. As cepas foram identificadas pelas análises de PCR espécie-específica e DGGE, sendo demonstrado que não há necessidade de isolamento prévio para a sua identificação.

YOUN, SEO e JI (2008) avaliaram 37 *primers* de PCR previamente relatados para amplificar as regiões 16S DNAr, 23S DNAr ou sequências de DNA repetitivas de várias espécies de *Bifidobacterium*. Verificaram que somente 10 dos *primers* mostraram especificidade para identificação de *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. longum* biovar *infantis* e *B. dentium*.

4 BIFIDOBACTÉRIAS PROBIÓTICAS

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”. A definição mais utilizada, atribuída por FULLER (1989), foi “suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta de forma benéfica seu receptor, através da melhoria do balanço microbiano intestinal”. Os probióticos são classificados como alimentos funcionais que, segundo as Resoluções 18 e 19 de 30/04/1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são definidos como “alimentos com propriedades funcionais ou com propriedades de saúde”. Segundo MCDONOUGH, HITCHINS e WONG (1982), produtos probióticos devem conter cerca de 10^6 organismos viáveis por mililitro e a quantidade ingerida, da ordem de 100 mL, no mínimo duas vezes por semana.

Os benefícios creditados aos produtos de laticínios probióticos, citados por SGARBIERI e PACHECO (1999), incluem: promoção do crescimento em estudos com ratos e aves; produção de vitaminas (riboflavina, niacina, tiamina, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico); aumento na absorção de minerais; aumento da resposta imune pela elevação na produção de imunoglobulina A; diminuição da população de patógenos pela produção dos ácidos acético e láctico e de bacteriocinas; redução da intolerância à lactose; supressão de enzimas microbianas potencialmente prejudiciais associadas ao câncer de cólon em animais; estabilização da microbiota intestinal, especialmente após severos estresses intestinais ou uso de antibióticos; alívio da constipação; redução do colesterol sanguíneo e efeito antimutagênico (ROBERFROID, 1997).

Os critérios de seleção do uso das bifidobactérias como agente probiótico (FULLER, 1989) incluem atividade antimicrobiana, boa tolerância ao ácido e aos metabólitos tóxicos (fenol) e sais biliares. O probiótico deve ser capaz de gerar produto final de sabor e textura aceitáveis, com população mínima de 10^6 UFC/mL (RASIC e KURMANN, 1983 citados por GOMES e MALCATA, 2002), assegurando a manutenção de número elevado de células viáveis durante o armazenamento do alimento e sua passagem pelo processo gastrointestinal.

5 APLICAÇÃO EM ALIMENTOS

O aumento do valor nutritivo e terapêutico trazido pelas bifidobactérias gerou interesse no sentido de incorporação das mesmas em determinados alimentos, sendo os veículos mais usuais os alimentos infantis, os leites fermentados, outros produtos lácteos e algumas preparações farmacêuticas (RASIC e KURMANN, 1983 citados por GOMES e MALCATA, 2002).

Para uso em alimentos, as cepas devem ser selecionadas com base nos processos tecnológicos, visto que as bactérias probióticas devem exibir resistência às etapas da preparação do alimento (MORI *et al.*, 1997).

Muitas bifidobactérias, adicionadas aos produtos lácteos, podem morrer após exposição ao ácido (durante ou após sua fermentação), ao oxigênio durante a distribuição e estocagem refrigerada, e/ou ao ácido estomacal humano após ingestão (MAUS e INGHAM, 2003).

Características como crescimento rápido e acidificação do leite são importantes para a seleção de bifidobactéria, pois podem reduzir custos por requererem pequeno tempo de incubação durante a manufatura do produto lácteo fermentado. As bifidobactérias de crescimento rápido mais comumente usadas pela indústria de lácteos são *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. longum* (DESJARDINS, ROY e GOULET, 1990).

O sucesso dos alimentos contendo bifidobactérias dependerá de sua viabilidade no produto durante sua vida útil, bem como da sua resistência às condições do sistema no trato gastrointestinal superior (SUN e GRIFFITHS, 2000).

Combinações de diferentes cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* são utilizadas tradicionalmente em produtos lácteos fermentados, sendo selecionadas com base em critérios médicos, científicos e tecnológicos (COLLINS, THORTON e SULLIVAN, 1998). Essas culturas devem tolerar o processo de fabricação ao qual serão submetidas

e manter a viabilidade durante a estocagem, o que dependerá de fatores como pH, presença de aditivos e ocorrência de inibidores microbianos (CHARTERIS *et al.*, 1998).

As interações com os componentes alimentares podem ser mínimas quando a adição do probiótico ocorrer após a fermentação, pois a atividade metabólica é reduzida drasticamente em temperatura de refrigeração. Entretanto, se o tempo de estocagem for longo, podem ocorrer pequenas interações mensuráveis (HELLER, 2001).

5.1 TOLERÂNCIA A pH BAIXO

Na produção de leites fermentados, o pH final ideal é de aproximadamente 4,7. Esse pH deve ser alcançado em no máximo 24h para garantir a segurança microbiológica do produto durante sua vida útil e para evitar que o pH decresça a valores muito baixos durante o estágio de armazenagem. As bactérias probióticas têm baixa capacidade de acidificação, sendo utilizadas em associação com culturas bioajustadoras (HELLER, 2001). Apesar do pH não ser o único fator envolvido no crescimento das bactérias probióticas, sua dificuldade de desenvolvimento em pH inferior a 4,5 limita a manufatura de produtos alimentares (SCARDOVI, 1986).

5.2 PRESENÇA DE OXIGÊNIO

Bifidobactérias são consideradas como altamente susceptíveis ao oxigênio, embora essa tolerância dependa da espécie (SHIMAMURA *et al.*, 1992). O oxigênio pode afetar esses organismos pela sua toxicidade às células e pela produção de peróxido de hidrogênio. MEILE *et al.* (1997) demonstraram que *B. animalis* subsp. *lactis*, isolada de leites fermentados, apresentou boa tolerância ao oxigênio. BEERENS, GAVINI e NEUT (2000) verificaram o efeito da exposição ao ar de 84 cepas de bifidobactérias isoladas de alimentos. As espécies de origem animal (*B. thermophilum*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*) mostraram-se mais resistentes ao oxigênio que as de origem humana, porém todas as bifidobactérias examinadas foram suficientemente aerotolerantes.

5.3 PRESENÇA DE INGREDIENTES E ADITIVOS ALIMENTARES

Os aditivos alimentares são indispensáveis na fabricação de bebidas e outros derivados lácteos. Tornam-se parte do alimento a fim de estabelecer características sensoriais próprias e definidas, como sabor, aparência, consistência e vida útil (NAKAZAWA e HOSONO, 1992; GILLILAND, 1998, citados por VINDEROLA *et al.*, 2002). VINDEROLA *et al.* (2002) verificaram a influência de aditivos utilizados em produtos lácteos fermentados no crescimento dos iniciadores ácido-lácticos e das bactérias probióticas. Constataram que adoçantes, compostos aromáticos, natamicina, agentes flavorizantes e o flavorizante-corante de pêssego não influenciaram o crescimento das cepas nas concentrações utilizadas pela indústria. O efeito de outras substâncias, especialmente agentes flavorizantes-corantes, mostrou-se dependente da espécie bacteriana.

5.4 ALIMENTOS DESENVOLVIDOS COM BIFIDOBACTÉRIAS PROBIÓTICAS

DINAKAR e MISTRY (1994) desenvolveram queijo tipo Cheddar com adição de *Bifidobacterium bifidum*. Constataram a viabilidade e aumento no número das células da cultura probiótica durante as 24 semanas de estudo sem que afetasse o *flavor*, a textura ou a aparência do queijo em relação ao padrão.

Na produção de queijo Cottage, BLANCHETTE e ROY (1995) utilizaram *Bifidobacterium infantis* e observaram que em condições controladas de sal e pH, a cepa consegue desenvolver-se e manter número viável de células.

GOMES e MALCATA (1998) utilizaram com sucesso cultura mista composta unicamente de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* na manufatura de queijo de leite de cabra, o qual foi

caracterizado pelo sabor e aroma aceitáveis e alcançou número de células viáveis de ambas as cepas bem acima de 10^6 UFC/g de queijo no momento do consumo. Resultados semelhantes já haviam sido obtidos anteriormente com queijo tipo Gouda (GOMES *et al.*, 1995 citados por GOMES e MALCATA, 1998).

GOBETTI *et al.* (1998) incorporaram três espécies de bifidobactérias (*B. bifidum*, *B. infantis* e *B. longum*) na formulação de queijo Crescenza e verificaram a similaridade do produto em relação à formulação convencional.

Bifidobacterium bifidum e *Bifidobacterium Infantis* foram adicionados à maionese tanto como células livres quanto encapsuladas (KHALIL e MANSOUR, 1998), sendo a sobrevivência das bifidobactérias e seus efeitos sobre a qualidade da maionese avaliados. A viabilidade das células livres desapareceu após 2 semanas, no entanto, *B. bifidum* e *B. infantis* encapsulados sobreviveram 12 e 8 semanas, respectivamente. Melhores propriedades sensoriais da maionese foram verificadas com a adição das bifidobactérias encapsuladas perante a adição das células livres.

Em experimento realizado com queijo, semelhante ao Cheddar, utilizando *Bifidobacterium infantis* e tempo de estocagem de doze (12) semanas, a cultura exibiu excelente viabilidade e mostrou-se metabolicamente ativa (DAIGLE *et al.*, 1999).

Bifidobacterium sp., *B. bifidum*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei* foram utilizados como probióticos na fabricação de queijo Frescal Argentino, evidenciando que esse tipo de queijo pode ser usado como carreador de cultura probiótica (VINDEROLA *et al.*, 2002).

SELVAMUTHUKURAMAN e SHUKLA (2006) prepararam leite em pó a partir de leite de vaca suplementado com 10% de cultura de *Bifidobacterium bifidum*, o qual foi incubado a 37°C por 24h, resfriado e desidratado em condições pré-determinadas em *spray dried*. O leite em pó bifidus apresentou contagem de $1,88 \times 10^9$ a $15,80 \times 10^9$ células/g de peso seco e sua porcentagem de sobrevivência foi de 4,17 a 35,11%. As autoras verificaram que a alta temperatura e a pressão do ar do *spray drying* influenciaram a cor e a aparência do produto final.

Visando o efeito benéfico à saúde proporcionado pelos simbióticos, CARDARELLIA *et al.* (2007) testaram cinco formulações diferentes de queijo tipo *petit-suisse* nas quais combinaram os prebióticos inulina, oligofrutose e mel com os probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. Verificaram que em qualquer das formulações, esse tipo de queijo pode ser promissor alimento funcional.

MAGARIÑOS *et al.* (2007) desenvolveram sorvete probiótico utilizando *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, subsp. Bb-12, em leite com 4% de gordura, o qual foi armazenado a -25°C por 60 dias. Observaram que o sorvete inoculado somente com *L. acidophilus* apresentou concentração final de 2×10^6 UFC/g e razão de sobrevivência de 87%. O tratamento com Bb-12 evidenciou concentração final de 9×10^6 UFC/, com decréscimo logarítmico de 10%. Quando ambos foram inoculados, a razão de sobrevivência foi de 86%.

Bebida à base de soja e iogurte de leite de vaca foram produzidos com *Streptococcus thermophilus* (ATCC 4356) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MI 025), adicionados das bactérias probióticas *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La-1), *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (GG) ou bifidobactérias de origem humana. Foi observada queda do pH durante a fermentação mais rápida na bebida de soja do que no iogurte de leite de vaca. No entanto, os valores de pH final foram similares e a presença das bactérias probióticas não afetou o crescimento das cepas do iogurte. Cromatografia a líquido de alta pressão (HPLC) mostrou que as bactérias probióticas estavam usando diferentes açúcares para o seu crescimento, dependendo se o meio era o leite de vaca ou a bebida de soja (FARNWORTH *et al.*, 2007).

MAGARIÑOS *et al.* (2008) processaram sobremesa láctea com adição de molho *cranberry* na qual adicionaram dois microrganismos probióticos (*Lactobacillus casei* Shirota e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) em tratamentos diferentes. Verificaram que a sobremesa pode constituir bom veículo para probióticos, sendo que *B. lactis* apresentou concentração final de $1,99 \times 10^6$ UFC/g após 21 dias de armazenagem.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os meios *Raffinose Bifidobacterium Agar* (Ágar RB) e *Lithium Chloride-Sodium Propionate-De Man, Rogosa and Sharp Agar* (Ágar LP-MRS) apresentaram-se mais seletivos para o isolamento de bifidobactérias entre os meios revisados. Além de menos onerosos e trabalhosos, possibilitam melhor visualização da colônia. No meio RB não houve crescimento de espécies não bífidas (exceto uma cepa de actinomicetos), e no meio LP-MRS houve inibição do crescimento de lactobacilos e da maioria dos estreptococos e lactococos também presentes no alimento.

Meios contendo antibióticos na composição apresentam custo elevado e demora no preparo, como o *Neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride Media* (Meio NPML), normalmente usado como referência por ser considerado seletivo para o isolamento de bifidobactérias, porém permite o crescimento de outros gêneros bacterianos. Ainda, na microbiota intestinal de recém-nascidos existe grande variação intraespecífica da resistência de bifidobactérias a antibióticos, permitindo somente o isolamento no meio NPML das cepas resistentes a esses antibióticos.

Para a identificação das bifidobactérias, a técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) não requer condições anaeróbicas, como o método de cultivo clássico. Apresenta operação rápida, exata, sensível e fácil, permitindo a amplificação de DNA de bifidobactérias diretamente de uma colônia ou amostra fecal, sem necessidade de cultivo prévio.

O fato de as bifidobactérias proporcionarem o aumento do valor nutritivo e terapêutico dos alimentos estimula o mercado de alimentos probióticos e a pesquisa para descoberta de novas cepas e diversificação de produtos.

ABSTRACT

BIFIDOBACTERIA: ISOLATION, IDENTIFICATION AND USE IN PROBIOTIC FOODS

This review aimed to describe the main culture media that have been developed for the isolation and enumeration of bifidobacteria and the molecular methods used for identification of this genus and its species. The criteria for probiotic bifidobacteria selection for their technological application were also demonstrated (as tolerance to low pH, presence of oxygen and presence of ingredients and additives). Various studies carried out using a bifidobacteria in the development of probiotic foods were cited. It can be concluded that the constant consumer's search for balance of health tends to increase the market for probiotic foods, stimulating research in the discovery of new strains with this activity and diversification of products.

KEY-WORDS: BIFIDOBACTERIA; MEDIA CULTURE; MOLECULAR METHODS; PROBIOTIC.

REFERÊNCIAS

- 1 BEERENS, H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.155-157, 1990.
- 2 BEERENS, H.; GAVINI, F.; NEUT, C. Effect to exposure to air on 84 strains of bifidobacteria. **Anaerobe**, v. 6, p. 65-67, 2000.
- 3 BLANCHETTE, L.; ROY, D. Production of cultured Cottage cheese dressing by Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p.1421-1429, 1995.
- 4 BOURGET, N.; SIMONET, J.M.; DECARIS, B. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium brevis* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and *rrn* loci number. **FEMS Microbiology Letters**, v. 110, p.11-20, 1993.
- 5 BRIGIDI *et al.* PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 203-209, 2003.
- 6 CARDARELLIA, H.R.; SAADB, S.M.I.; GIBSON, G.R.; VULEVICA, J. Functional petit-suisse cheese: measure of the probiotic effect. **Anaerobe**, v.13, p. 200-207, 2007.

- 7 CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.1-27, 1997.
- 8 CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. **Letters Applied in Microbiology**, v.26, p.333-337, 1998.
- 9 COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.
- 10 CROCIANI, F. *et al.* *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 564-571, 1996.
- 11 DAIGLE, A.; ROY, D.; BÉLANGER, G.; VUILLEMARD, J.C. Production of probiotic cheese (Cheddar-like Cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p.1081-1091, 1999.
- 12 DESJARDINS, M.L.; ROY, D.; GOULET, J. Growth of Bifidobacteria in milk and their enzyme profiles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p.299-315, 1990.
- 13 DELCENSERIE, V. *et al.* A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 61, p. 55-67, 2005.
- 14 DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. **Journal Dairy Science**, v. 77, p. 2854-2864, 1994.
- 15 DONG, X.; CHENG, G.; JIAN, W. Simultaneous identification of five *Bifidobacterium* species isolated from human beings using multiple PCR primers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 386-390, 2000.
- 16 FARNWORTH, E.R. *et al.* Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174-181, 2007.
- 17 FASOLI, S. *et al.* Bacterial composition of comercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 59-70, 2003.
- 18 FULLER, R. A review: probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- 19 GOBETTI, M. *et al.* Production of Crescenza Cheese by incorporation of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 37-47, 1998.
- 20 GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. **Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas** 1998. Disponível em: <http://www.dequim.ist.utl.pt/bbio/64/pd/agentes_probioticos_em_alimentos.pdf>. Acesso em: 08/10/2002.
- 21 HARTEMINK, R. *et al.* Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 27, p. 33-43, 1996.
- 22 HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristic and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 3745-3795, 2001.
- 23 HOLT, J.G. *et al.* **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: William e Wilkins, 1994.
- 24 ITO, M.; OHNO, T.; TANAKA, R. A specific DNA probe for identification of *Bifidobacterium brevis*. **Microbiology Ecology Health Diseases**, v. 5, p.185-192, 1992.
- 25 JIAN, W.; ZHU, L.; DONG, X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. **International Journal Systematic Evolution Microbiology**, v. 51, p.1633-1638, 2001.
- 26 KAUFMANN, P. *et al.* 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**, v. 63, p.1268-1273, 1997.
- 27 KHALIL, A.H.; MANSOUR, E.H. Alginate encapsulated bifidobacteria survival in mayonnaise. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 702-705, 1998.
- 28 KOK, R.G. *et al.* Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3668-3672, 1996.
- 29 KRIZOVÁ, J.; SPANOVÁ, A.; RITTICH, B. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 36-44, 2006.
- 30 KULLEN, M.J. *et al.* Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprint demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. **Journal of Nutrition**, v.127, p. 89-94, 1997.

- 31 KULLEN, M.J.; BRADY, L.J.; O'SULLIVAN, D.J. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. **FEMS Microbiology Letters**, v.154, p. 377-383, 1997.
- 32 LANGENDIJK, P.S. *et al.* Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3069-3075, 1995.
- 33 LAPIERRE, L.; UNDERLAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.1192-1196, 1992.
- 34 LARROIA, S.; MARTIN, J.H. Methods for enumeration and propagating bifidobacteria. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 26, p. 32-33, 1991.
- 35 LIM, K.S.; HUH, C.S.; BAEK, Y.J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2168-2174, 1993.
- 36 LIM, K.S.; HUH, C.S.; BAEK, Y.J. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2108-2112, 1995.
- 37 MAGARIÑOS, H. *et al.* Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p.128-134, 2007.
- 38 MAGARIÑOS, H. *et al.* Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) in a milk-based dessert with cranberry sauce. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, p. 96-101, 2008.
- 39 MANGIN, L. *et al.* Identification of *Bifidobacterium* strains by rRNA gene restriction patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p.1451-1458, 1994.
- 40 MANGIN, I. *et al.* Characterization of human intestinal bifidobacteria using competitive PCR and PCR-TTGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, p. 28-37, 2006.
- 41 MASCO, L. *et al.* Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and *recA* genes for the enumeration of bifidobacteria in probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p. 351-357, 2007.
- 42 MATSUKI, T. *et al.* Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v.167, p.113-121, 1998.
- 43 MATSUKI, T. *et al.* Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4506-4512, 1999.
- 44 MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R. Genus and species-specific PCR primers for the detection and identification of bifidobacteria. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 4, p. 61-69, 2003.
- 45 MAUS, J.E.; INGHAM, S.C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria. **Journal of Applied and Microbiology**, v. 95, p.146-154, 2003.
- 46 McCARTNEY, A.L.; TANNOCK, G.W. Ribotyping of *Bifidobacterium* strains using cells embedded in agarose plugs and a 16S rDNA probe. **Microbiology Ecology Health Diseases**, v. 8, p. 79-84, 1995.
- 47 McDONOUGH, F.E.; HITCHINS, A.D.; WONG, N.P. Effects of yogurt and freeze-dried yogurt on growth stimulation of rats. **Journal of Food Science**, v. 47, p.1463-1465, 1982.
- 48 MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Survival of constitutive microbiota in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. **Journal Food Protection**, v. 56, p. 731-733, 1994.
- 49 MEILE, L. *et al.* *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk system. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 57-64, 1997.
- 50 MIYAKE, T. *et al.* Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on the 16S rDNA sequences. **Microbiology and Immunology**, v. 42, p. 661-667, 1998.
- 51 MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute Food Science and Technology Journal**, v. 23, p. 29041, 1990.
- 52 MORI, H. *et al.* Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.1959-1964, 1997.
- 53 MULLIÉ, C. *et al.* Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, p.129-136, 2003.

- 54 MUÑOZA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p.1715-1718, 1988.
- 55 NAGENDRA, R. *et al.* Effect of feeding milk formula containing lactulose to infants on fecal bifidobacterial flora. **Nutrition Research**, v. 15, p.15024, 1995.
- 56 NEBRA, Y.; BLANCH, R. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5173-5176, 1999.
- 57 O'RIODAN, K.; FITZGERALD, G.F. Determination of genetic diversity within the geus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, p. 259-264, 1997.
- 58 PACHER, B.; KNEIFEL, W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 43-64, 1996.
- 59 PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 993-1002, 1998.
- 60 RADA, V.; PETR, J. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal samples. **Veterinary Medicine – Czech**, v. 47, p.104, 2002.
- 61 REQUENA, T. *et al.* Identification, detection and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2420-2427, 2002.
- 62 ROY, D.; WARD, P.; CHAMPAGNE, G. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 11-29, 1996.
- 63 ROY, D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 191, p.17-24, 2000.
- 64 SATOKARI, R.M. *et al.* Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 504-513, 2001.
- 65 SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986. p. 1418-1434.
- 66 SELVAMUTHUKUMARAN, M.; SHUKLA, S.S. Optimization of spray drying conditions for production of bifidus milk powder from cow milk. **Journal of Food Quality**, v. 29, p. 305-318, 2006.
- 67 SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 2, p. 7-19, 1999.
- 68 SHIMAMURA, S. *et al.* Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.3296-3306, 1992.
- 69 SILVI, S. EU Project Crownlife: functional foods, gut microflora and healthy ageing. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of edery subjects for a possible probiotic use in functional foods. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p.195-200, 2003.
- 70 SUN, W.; GRIFFITHS, M.W. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **International Journal of Food Technology**, v.61, p.17-25, 2000.
- 71 TABASCO, R. *et al.* Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, v.17, p.1107-1114, 2007.
- 72 TESHIMA, E.D.S. **Seleção de bactérias bífidas isoladas de lactentes e modulação da microbiota intestinal por meio de probióticos, prebióticos e simbióticos**. Viçosa, 2001. 113 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa.
- 73 VAUGIEN, L.; PREVOTS, F.; ROQUES, C. Bifidobacteria identification based on 16S rRNA and pyruvate kinase partial gene sequence analysis. **Anaerobe**, v. 8, p. 341-344, 2002.
- 74 VENEMA, K.; MAATHUIS, A.J.H. A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p.143-149, 2003.
- 75 VENTURA, M.; ELLI, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 36, p. 113-121, 2001.
- 76 VENTURA, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from differnt environmental isolates by a cobined multiplex-PCR approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2760-2765, 2001.

- 77 VENTURA, M.; ZINK, R. Rapid identification, differentiation and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6429-6434, 2002.
- 78 VINCENT, D. *et al.* Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 185-193, 1998.
- 79 VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497-505, 1999.
- 80 VINDEROLA, C.G. *et al.* Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microbiota in Argentinian Fresco Cheese. **Journal Dairy Science**, v. 83, p. 1905-1911, 2002.
- 81 WANG, R.F.; CAO, W.W.; CERNIGLIA, C.E. PCR detection and quantification of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1242-1247, 1996.
- 82 WARD, P.; ROY, D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. **Lait**, v. 85, p. 23-32, 2005.
- 83 YAESHIMA, T. *et al.* Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a microplate hybridization method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 303-313, 1996.
- 84 YAMAMOTO, T.; MOROTOMI, M.; TANAKA, R. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 4076-4079, 1992.
- 85 YOUN, S.Y.; SEO, J.M.; JI, G.E. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 7-13, 2008.