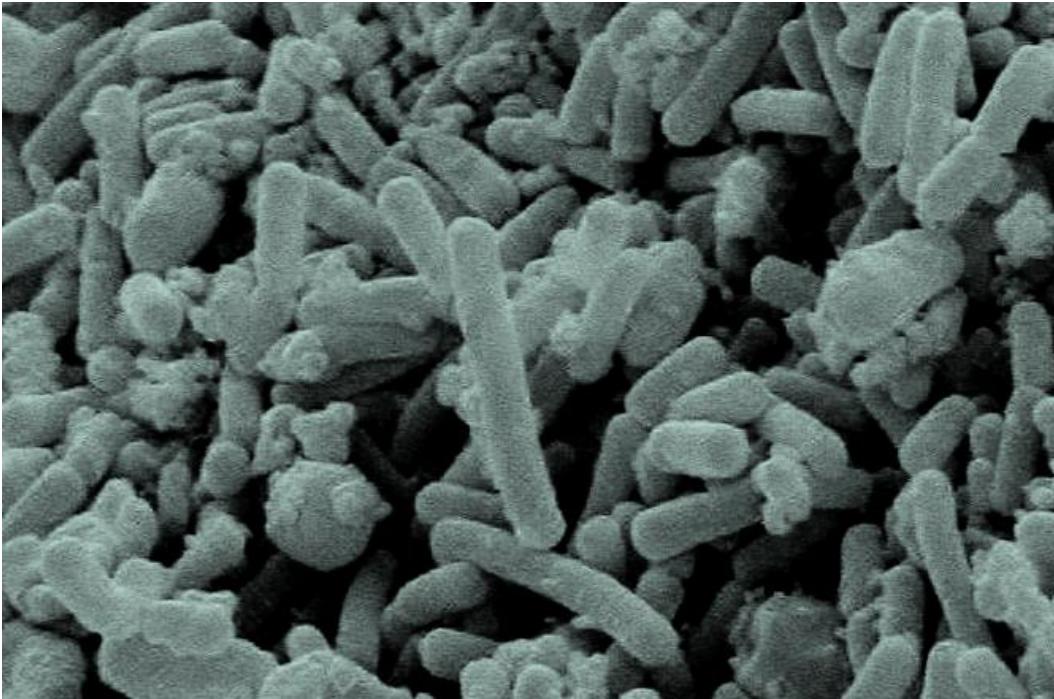


Capítulo 1: Aislamiento e Identificación de microorganismos de gránulo de kefir



Introducción

1.- Identificación de microorganismos en comunidades microbianas complejas.

El estudio de la composición de poblaciones microbianas complejas se puede realizar mediante el uso de técnicas dependientes de cultivo o independientes de cultivo. La comparación entre el porcentaje de bacterias cultivables y el total de células en diferentes hábitats muestra comúnmente enormes discrepancias. Una de las razones de estas diferencias puede ser la interdependencia de los microorganismos entre sí y la falta de conocimiento sobre las verdaderas condiciones de cultivo de los mismos en sus hábitats naturales (Muyzer & Smalla, 1998). El uso de técnicas independientes del cultivo y el desarrollo de métodos de biología molecular otorgó ventajas en éste aspecto, aumentando el estado de conocimiento sobre las comunidades microbianas complejas.

1.1.- Métodos para el estudio de comunidades microbianas: electroforesis dependientes de la secuencia.

Las técnicas electroforesis dependientes de la secuencia (EDS) se basan en la separación electroforética de fragmentos de ADN amplificados por PCR (amplicones). Estos amplicones poseen secuencias específicas de igual longitud y son separados en una matriz de poliacrilamida que contiene un gradiente desnaturizante de urea y formamida (electroforesis en gel con gradiente desnaturizante químico (DGGE)) o bien un gradiente de temperatura (electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE) y electroforesis en gel con gradiente temporal de temperatura (TTGE)) (Muyzer, 1999; Huys *et al.*, 2008). En la TGGE, el gradiente de temperatura se crea a lo largo de la longitud del gel, mientras que en TTGE el gradiente de temperatura es temporal se forma gradualmente durante el funcionamiento

de la electroforesis (Huys *et al.*, 2008). Estas técnicas se utilizan para comparar la diversidad de comunidades microbianas, monitorear la dinámica poblacional, detectar microorganismos no cultivables y hacer análisis de mutaciones.

Dichas metodologías han sido utilizadas en diversas comunidades microbianas, obteniéndose resultados positivos en cuanto a la identificación de los microorganismos que lo componen (Felske *et al.*, 1998; Ercolini *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2010). También han sido aplicadas al estudio de la microflora presente en gránulos de kefir (Ninane *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Jianzhong *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, 2010; Londero *et al.*, 2012), aumentando así la información acerca de la composición microbiana de estos ecosistemas.

Para obtener los perfiles de las comunidades bacterianas se deben llevar a cabo los siguientes pasos: extracción del ADN total de la comunidad presente en la muestra; amplificación por PCR de las secuencias específicas utilizando oligonucleótidos; separación electroforética de los amplicones usando DGGE, TGGE o TTGE; y procesamiento y análisis de la huella digital.

1.1.1.- Extracción del ADN

El método utilizado para la extracción del ADN debe ser eficiente, reproducible y de alto rendimiento. Esto es indispensable para obtener una muestra representativa de la comunidad microbiana en estudio. El paso crucial en la extracción del ADN es la lisis celular. Existen diversos métodos que incluyen rupturas mecánicas o bien lisis enzimáticas. Evaluar este paso de la extracción es fundamental debido a que no todos los miembros de las comunidades microbianas poseen la misma sensibilidad a las condiciones de lisis. Los criterios usualmente utilizados para evaluar la eficacia de los procedimientos de extracción del ADN incluyen verificación electroforética de la integridad del ADN y determinación del rendimiento.

1.1.2.- Amplificación

Luego del paso de extracción y purificación del ADN se procede a la amplificación. La selección de los oligonucleótidos que serán utilizados en la reacción de amplificación de la polimerasa (PCR) es el punto más importante. El uso de oligonucleótidos universales permite el análisis de cualquier tipo de comunidad microbiana aunque en poblaciones con una alta diversidad, solo generarán bandas visibles en los perfiles obtenidos por las técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia, aquellas que se encuentren en mayor proporción en la comunidad. Para centrarse en una subpoblación específica dentro de la comunidad total, se utilizan oligonucleótidos específicos para determinados grupos poblacionales (Huys *et al.*, 2008).

Tradicionalmente se utilizan los genes que codifican para el rARN 16S como molécula *target* para la construcción de oligonucleótidos universales y específicos. Esta preferencia proviene del hecho de que los genes de la subunidad ribosomal menor (SSU) del rARN están compuestos por una estructura tipo mosaico donde se alternan regiones no variables, relativamente conservadas, con regiones altamente variables (regiones V). En las técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia que analizan la huella genética de las poblaciones se utilizan oligonucleótidos que se unen a regiones conservadas de las secuencias de los genes con el objetivo de cubrir hasta tres regiones hipervariables. Los oligonucleótidos utilizados para este tipo de técnicas poseen además una secuencia rica en GC unida al extremo 5' denominada *GC clamp* que tienen el objetivo de prevenir la desnaturalización completa de los amplicones generados. Esto es necesario para obtener un punto de fusión estable de los fragmentos durante la electroforesis (Huys *et al.*, 2008).

1.1.3.- Electroforesis

Las técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia se basan en el principio de que la movilidad electroforética de los amplicones doble cadena, en la matriz del gel con gradiente desnaturalizante ascendente (químico o de temperatura), va disminuyendo, y a una determinada concentración de agente desnaturalizante o bien a una temperatura dada, se produce la fusión parcial de la doble hebra (T_m) (Figura 1). La desnaturalización física de los fragmentos de ADN doble cadena está influenciada básicamente por dos factores, la secuencia nucleotídica y el contenido de G+C. A los dominios con altos contenidos en G+C se los denomina dominios de fusión e interfieren con la estructura helicoidal de la molécula de ADN produciendo una migración mayor en el gel. Los amplicones que presentan diferencias en sus secuencias nucleotídicas exhiben discrepancias en su comportamiento de fusión y, por lo tanto, migran hasta una posición diferente a lo largo del gradiente lineal del gel. Esto produce como consecuencia diferentes perfiles de bandas que representan la diversidad de las secuencias presentes en la mezcla de amplicones (Huys *et al.*, 2008).

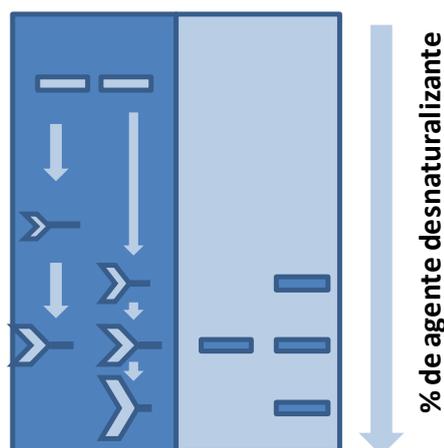


Figura 1: Esquema del proceso de separación de amplicones de ADN por electroforesis en gradiente desnaturalizante químico.

1.1.4.- Análisis de datos

El análisis de los perfiles obtenidos por éstas técnicas puede ser realizado visualmente o numéricamente. La interpretación visual de los perfiles solo se puede llevar a cabo cuando se comparan perfiles de baja complejidad. En aquellas muestras donde el número de bandas de los perfiles aumenta o bien cuando se deben comparar un alto número de perfiles, se utilizan métodos numéricos. Con este objetivo se procede a digitalizar las imágenes de los geles y procesarlos con distintos software. Algunos de los más utilizados son: GelCompar y BioNumerics (Applied Maths; <http://www.applied-maths.com/>), Quantity One y Molecular Analyst (Bio-Rad Laboratories), GeneTools (Syngene; <http://www.syngene.com/>), y Photo-Capt (Vilber Lourmat; <http://www.vilber.com/>). Estos programas permiten realizar el análisis numérico de los patrones de bandas y suelen incluir herramientas estadísticas para la interpretación de los datos.

Luego de este primer paso de análisis estadísticos, basado en diversidad y coeficientes de similitud, se procede a identificar y monitorear los miembros específicos de las comunidades bacterianas. La identificación de las bandas presentes en los perfiles electroforéticos pueden ser obtenidas mediante el análisis de las posiciones relativas de las bandas, comparándolas con las posiciones de patrones de identidad conocida, o bien mediante la secuenciación de las bandas (Huyst *et al.*, 2008).

Idealmente, la posición de cada banda en el perfil de una muestra es representativa de una especie. Sin embargo, en la práctica, el efecto observado en ciertas taxa cuando se utilizan oligonucleótidos para los genes del rARN 16S, puede llevar a una sobreestimación del número de especies predominantes en las muestras analizadas debido a la presencia de operones múltiples.

Los resultados obtenidos por comparación de la posición de las bandas pueden o deben ser verificados mediante secuenciación, permitiendo así determinar la filiación filogenética de cepas desconocidas.

Se procede a extraer los fragmentos de amplificación de la matriz del gel de poliacrilamida. Luego, dichos fragmentos se reamplifican y analizan por técnicas de electroforesis dependientes de la secuencia para verificar que se esté trabajando con los fragmentos de ADN correctos. Como consecuencia, estos fragmentos obtenidos por PCR pueden ser directamente secuenciados sin necesidad de clonación previa o clonados previo a la secuenciación. Finalmente, las secuencias obtenidas son comparadas con secuencias almacenadas en las bases de datos públicas (por ejemplo: EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)) para su identificación.

2.- Taxonomía

La taxonomía o la sistemática es el estudio científico de la diversidad de organismos con el objetivo último de caracterizarlos y disponerlos de una manera ordenada (Schleifer & Ludwig, 1994). Clasificación, identificación y nomenclatura son tres subdisciplinas separadas pero relacionadas en taxonomía. La clasificación es el proceso de agrupar los organismos en grupos taxonómicos (taxa) en base a sus semejanzas o relaciones. La nomenclatura es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos según reglas internacionales. Finalmente, la identificación es el proceso de determinar si un nuevo aislado pertenece a una de las taxa establecidas y nombradas (Staley & Krieg, 1989).

Las taxas en el sistema de clasificación están organizadas de manera jerárquica. Actualmente, se reconocen dos dominios procarióticos: Archaea y Bacterias. A su vez, estos dominios se dividen en reinos; siendo los niveles subsiguientes phylum, clase, orden, familia, género y especie. Estos niveles taxonómicos se diferencian mediante sufijos.

Debido a que los microorganismos poseen una estructura muy simple y pocos caracteres informativos comparados con organismos superiores, el progreso en la taxonomía bacteriana ha sido dependiente de los avances que

se dan dentro de la tecnología. Por esta razón, la taxonomía bacteriana moderna emplea principalmente datos moleculares.

Los métodos de análisis comúnmente utilizados para la identificación de microorganismos poseen diferente poder de resolución, por lo tanto la investigación completa de la identidad de un microorganismo se podría realizar solamente a través de la comparación de resultados de un gran número de técnicas: éste es el acercamiento polifásico a la sistemática bacteriana, es decir cuanto más datos se utilizan para la comparación, es más completa y exacta la identificación (Colwell, 1970; Vandamme *et al.*, 1996). Vandamme *et al.* (1996) señalan que para la identificación de microorganismos se deben tener en cuenta en forma integral los resultados obtenidos por distintas metodologías que incluyan tanto el estudio de características fenotípicas como genotípicas. La taxonomía polifásica logra consensuar caracteres fenotípicos tales como morfología, nutrición, movilidad, características tintoriales, formación de esporos, marcadores quimiotaxonómicos, perfil de proteínas totales, enzimas, etc.; filogenéticos, basados en el gen del rARN 16S y genotípicos como el % G+C, hibridación ADN-ADN, técnicas basadas en perfiles que marcan diferencias entre especies (*fingerprinting*), etc.

En las últimas décadas el acercamiento a la filogenética ha revolucionado la sistemática bacteriana. La filogenética se basa en encontrar la relaciones existente entre los organismos mediante la comparación de las secuencias moleculares, principalmente a través de los genes que codifican al rARN 16S (Woese, 1987). Para esto se asumen que: (i) los genes que codifican para el rARN son altamente conservados debido al rol fundamental que cumplen los ribosomas en la biosíntesis de proteínas (función que fue desarrollada en los primeros tiempos de la evolución del organismo); (ii) estos genes no están implicados en fenómenos de transferencia genética horizontal y (iii) el porcentaje de similitud entre las secuencias de diversos individuos es representativa de la variación de sus genomas. Si bien estas

aseveraciones no son completamente ciertas; gracias al análisis de los genes del rARN 16S se ha logrado un avance importante en la taxonomía bacteriana y los resultados obtenidos han sido confirmados mediante el análisis de varias moléculas, por ejemplo: proteínas como RecA (Lloyd & Sharp, 1993; Eisen, 1995) y factores de elongación.

Alternativamente se utilizan otros marcadores como pueden ser los genes que codifican para la subunidad α de la ARN polimerasa (*rpoA*) y la subunidad α del t-ARN de la fenilalanina sintasa bacteriana (Naser *et al.*, 2007).

Se ha encontrado una relación empírica, no-lineal entre los datos de similitud del ADN total y el porcentaje de identidad de las secuencias de los genes que codifican para el rARN 16S (Keswani & Withman, 2001; Rosselló-Mora & Amann, 2001). Según Gevers *et al.* (2005) se podría afirmar que si dos organismos poseen una similitud inferior al 97% en la secuencia del gen que codifica para el rARN 16S tienen una relación a nivel genético baja y por lo tanto pertenecen a diferentes especies. Asimismo, si dos organismos poseen semejanzas superiores al 97 % los organismos son considerados como muy relacionados a nivel genético y solamente datos de hibridación ADN-ADN y/o análisis de otras secuencias son decisivos para la identificación a nivel de especie. Se debe tener en cuenta que la identificación mediante el análisis de secuencias obtenidas por amplificación de secuencias específicas y comparación con base de datos suele ser más rápida, reproducible y menos costosa que la hibridación ADN-ADN (Gevers *et al.*, 2005).

2.1.- El género *Lactobacillus*

Las especies del género *Lactobacillus* son una de las taxa más importantes implicadas en microbiología de alimentos y nutrición humana. Esto se debe al papel que tienen en la producción y preservación de alimentos y también a las características probióticas exhibidas por algunas

cepas. Estos rasgos son de importancia cada vez mayor y reciben la atención de los consumidores, industriales y comunidad científica.

Las bacterias ácido lácticas son un grupo filogenéticamente muy diverso. Estas bacterias constituyen un grupo heterogéneo formado por cocos o bacilos no esporulados, son Gram positivas, catalasa negativas, con bajo contenido de G+C (menor a 54%), carentes de citocromos, exigentes nutricionalmente, ácido-tolerantes y productoras de ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos.

La mayor discrepancia en la taxonomía del género *Lactobacillus* es la baja correlación existente entre las propiedades metabólicas y la filogenética. La subdivisión histórica del género *Lactobacillus* basada en el tipo de fermentación ha sido revisada y se ha subrayado el hecho de que a términos como homofermentativo y heterofermentativo y ambos términos acompañados de obligado y/o facultativo se le han asignado significados diversos según los autores, lo cual puede llevar a error.

Actualmente se acepta la definición descrita por Hammes & Vogel (1995) donde se define como homofermentativos obligados a aquellos lactobacilos capaces de fermentar las hexosas a ácido láctico por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) mientras que las pentosas y el gluconato no son fermentadas debido a la carencia de fosfocetolasa; heterofermentativo facultativos a aquellos lactobacilos que degradan las hexosas por vía EMP y son capaces de degradar las pentosas y a menudo el gluconato debido a que poseen las enzimas aldolasa y fosfocetolasa y finalmente se describe a los heterofermentativos obligados como aquellos que degradan las hexosas por la vía del fosfogluconato produciendo lactato, etanol o ácido acético y dióxido de carbono como productos y fermentan las pentosas por esta misma vía metabólica (Felis & Dellaglio, 2007).

Según la *Taxonomic Outline of the Prokaryotes* (Release 5.0, Garrity *et al.*, 2004), el género *Lactobacillus* pertenece al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae* y se agrupan dentro

de la misma familia a los géneros relacionados *Paralactobacillus* y *Pediococcus*.

El primer análisis filogenético de lactobacilos fue realizado en 1991 por Collins *et al.* con las especies conocidas hasta ese momento. De éste análisis surgieron subdivisiones y el género *Lactobacillus* fue dividido en 3 grupos. En los últimos años se han descrito una gran cantidad de nuevas especies y se ha realizado un nuevo examen filogenético del género. Como consecuencia, éstos grupos se han subdividido en grupos más pequeños. Esta estrategia fue adoptado de Hammes & Hertel (2003), y Dellaglio & Felis (2005), y se resumen en la Tabla 1.

| Grupos | Hammes y Hertel(2003) | Dellaglio y Felis (2005) | Felis y Dellaglio (2007) |
|---------------------------------------|--|---|--|
| <i>Lb coryniformis</i> (cor) | - | - | <i>Lb bifermentans</i> , <i>Lb coryniformis</i> , <i>Lb rennini</i> , not robustly associated with <i>L. composti</i> |
| <i>L. plantarum</i> (plan) | <i>L. alimentarius</i> , <i>L. arizonensis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. indensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. versmoldensis</i> | <i>L. arizonensis</i> , <i>L. collinoides</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> (<i>L. plantarum</i> group-a) associated with <i>L. alimentarius</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. mindensis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>L.versmoldensis</i> (<i>L. plantarum</i> group-b) the affiliation of <i>L. collinoides</i> was poorly supported | <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> |
| <i>L. perolens</i> (per) | - | - | <i>L. perolens</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. paracollinoides</i> |
| <i>L. brevis</i> (bre) | - | <i>L. acidifarinae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>L. zymae</i> | <i>L. brevis</i> , <i>L. hammesii</i> , <i>L. parabrevis</i> |
| <i>Pediococcus dextrinicus</i> (Pdex) | | | <i>P. dextrinicus</i> , <i>L. concavus</i> , <i>L. oligofermentans</i> (the latter sometimes poorly supported) |
| <i>Pediococcus</i> | | 1 single cluster (not including <i>P. dextrinicus</i>) | 2 clusters, not associated: the first comprises <i>P. cellicola</i> , <i>P. damnosus</i> <i>P. parvulus</i> , <i>P. inopinatus</i> , while the second includes <i>P. acidilactici</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. pentosaceus</i> and <i>P. stilesii</i> |
| Couples (couple) | | | <i>L. rossiae</i> - <i>L. siliginis</i> (1) <i>L. vaccinostercus</i> - <i>L. suebicus</i> (2) <i>L. manihotivorans</i> - <i>L. collinoides</i> (3) |
| Single species (ss) | <i>L. bifermentans</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. coryniformis</i> and <i>L. perolens</i> | <i>L. algidus</i> , <i>L. kunkeei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. paracollinoides</i> , <i>L. perolens</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i> | <i>L. kunkeei</i> , <i>L. malefermentans</i> , <i>L. pantheris</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i> |

No obstante estas clasificaciones, la taxonomía bacteriana está en permanente evolución debido a la aparición de nuevas especies generando la constante evaluación de géneros, cambio de nombre de las especies y la aparición de nuevos agrupamientos (Felis & Dellaglio, 2007).

2.1.1.- *Lb kefirifaciens*: características generales y su importancia en el ecosistema del kefir.

En el gránulo de kefir los microorganismos se encuentran en una íntima asociación con los componentes de la matriz (proteínas y

polisacáridos), siendo el polisacárido (kefiran) indispensable para mantener su integridad (Mukai *et al.*, 1990; Yokoi *et al.*, 1990).

Lactobacillus kefiranofaciens está compuesta por dos subespecies, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*. La importancia de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* radica en que es el responsable de la producción de kefiran (Fujisawa *et al.*, 1988, Vancanneyt *et al.*, 2004)

Lb kefiranofaciens subsp *kefiranofaciens* es un bacilo Gram positivo, no móvil, no formador de esporos, de un tamaño que varía entre 0,5-1,2 a 3,0-20 μm , puede encontrarse solo, de a pares y ocasionalmente en cadenas cortas. No crece a 15 °C. Es anaerobio facultativo y produce ácido DL-láctico homofermentativamente. No produce gas a partir de glucosa o gluconato. No produce catalasa. Acidifica la leche. Algunas cepas producen grandes cantidades de polisacárido. No produce la desaminación de la arginina. La hidrólisis de esculina es negativa. Produce ácido a partir de sacarosa pero no de amigdalina, arbutina, celobiosa, β -gentobiosa, inulina, salicina, trehalosa o D-turanose. La producción de ácido a partir de N-acetilglucosamina, maltosa, melibiosa y D-rafinosa es dependiente de la cepa. El contenido de G+C del ADN es de 37,3-38,2 mol % (HPLC) o 34,3-38,6 mol % (Tm) (Vancanneyt *et al.*, 2004).

Hasta el momento este microorganismo ha sido aislado de gránulos de kefir de distinto origen; la cepa tipo JCM 6985T = ATCC 43761T = LMG 19149T fue aislada de gránulos de kefir comerciales en Japón (Fujisawa *et al.*, 1988); las cepas IL1, HLI y MLI fueron aislados de tres gránulos provenientes de Taiwan (Chen *et al.*, 2008); ZW3 de gránulos originarios del Tibet (Wang *et al.*, 2008), R-12937=EXT2.139, R-14240=EXT2.143, R-14242=EXT2.145, R-14243=EXT2.146, R-14244=EXT2.147, R-14245=EXT2.148 y R-14703=EXT2.187 fueron aislados de gránulos procedentes del Cáucaso (Vancanneyt *et al.*, 2004), KF-75 fue aislada de gránulos proveniente de Japón (Mitsue *et al.*, 1998), CYC 10055, CYC 10056,

CYC 10057 y CYC 10058 fueron aislados de gránulos provenientes de distintas regiones de Francia, Italia, Portugal, Rusia, Turquía y España (Santos *et al.*, 2003). Además, *Lb kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* fue detectado en gránulos de kefir provenientes de Bélgica (Ninane *et al.*, 2007), Taiwan (Chen *et al.*, 2008), Tibet (Zhou *et al.*, 2009) y Turquía (Kesmen & Kacmaz 2011) utilizando métodos independiente del cultivo (PCR-DGGE). No encontrándose en gránulos provenientes de distintos estados de Brasil y Estados Unidos (Da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, 2010) utilizando la misma metodología.

En virtud de lo expuesto, en una primera etapa se centraron los estudios en determinar la presencia de este microorganismo en gránulos de kefir de la colección CIDCA (Argentina), para posteriormente proceder a su aislamiento y identificación.

Objetivo General

- ✓ Aislar *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de gránulos de kefir de la colección CIDCA.

Objetivos Específicos:

- ✓ Evaluar la presencia de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* en gránulos de kefir mediante métodos independientes de cultivo.
- ✓ Realizar un aislamiento dirigido a la búsqueda de este microorganismo y efectuar la identificación taxonómica de los aislados obtenidos.

Resultados y Discusión

1.- Aplicación de métodos independientes de cultivo para estudiar la presencia de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* en gránulos de kefir.

Lb kefiranofaciens subsp. *kefiranofaciens* tiene un rol vital dentro del ecosistema del gránulo de kefir debido a que el exopolisacárido (EPS) que produce forma parte de la matriz y es un componente esencial para el aumento de la biomasa. Por lo tanto es esperable la presencia de éste microorganismo dentro de los gránulos de kefir activos de la colección CIDCA.

Con la finalidad de constatar la existencia de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* dentro de los gránulos se utilizó una técnica independiente de cultivo comúnmente empleada para el estudio de comunidades microbianas complejas. La metodología utilizada fue la electroforesis en gel con gradiente desnaturante químico (DGGE) que consiste en la amplificación del ADN con oligonucleótidos específicos, separación electroforética en gel con gradiente desnaturante químico y secuenciación de los fragmentos de ADN presentes en cada perfil.

Se extrajo el ADN de 9 gránulos (CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 4, CIDCA AGK 5, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 8, CIDCA AGK 10 y CIDCA AGK 11), se amplificó el ADN de cada uno de ellos con oligonucleótidos específicos para Eubacterias (518R y 341F-GC) que codifican para la región V3 del ARNr 16S y los amplicones resultantes se separaron mediante DGGE. Los perfiles electroforéticos obtenidos a partir de la amplificación del ADN de los 9 gránulos en estudio se muestran en la Figura 2.

Se pueden observar diferentes perfiles para los distintos gránulos. Dependiendo del gránulo, el número de bandas presentes en cada perfil

varió entre 7 y 18; siendo el perfil del gránulo CIDCA AGK 2 el que presentó menor número de bandas y el del gránulo CIDCA AGK 8 el que presentó mayor número de bandas. Las bandas señaladas como I, II, y III se encontraron presentes en todos los perfiles. Los gránulos CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 10 y AGK 11 resultaron muy similares entre sí; lo mismo se observó entre los gránulos CIDCA AGK 2 y CIDCA AGK 5. Los perfiles de los gránulos CIDCA AGK 10, CIDCA AGK 7 y CIDCA AGK 8 presentaron bandas en la zona del gradiente de menor concentración de urea formamida que no se repitieron en los demás perfiles. El número de bandas de los perfiles no es indicativo de la cantidad de especies que están presente en cada comunidad debida a que una especie puede presentar más de una banda en su perfil electroforético (Rosado *et al.*, 1998; Cocolin *et al.*, 2001; Salles *et al.*, 2001) pero el análisis de los perfiles electroforéticos permite comparar las diferentes comunidades.

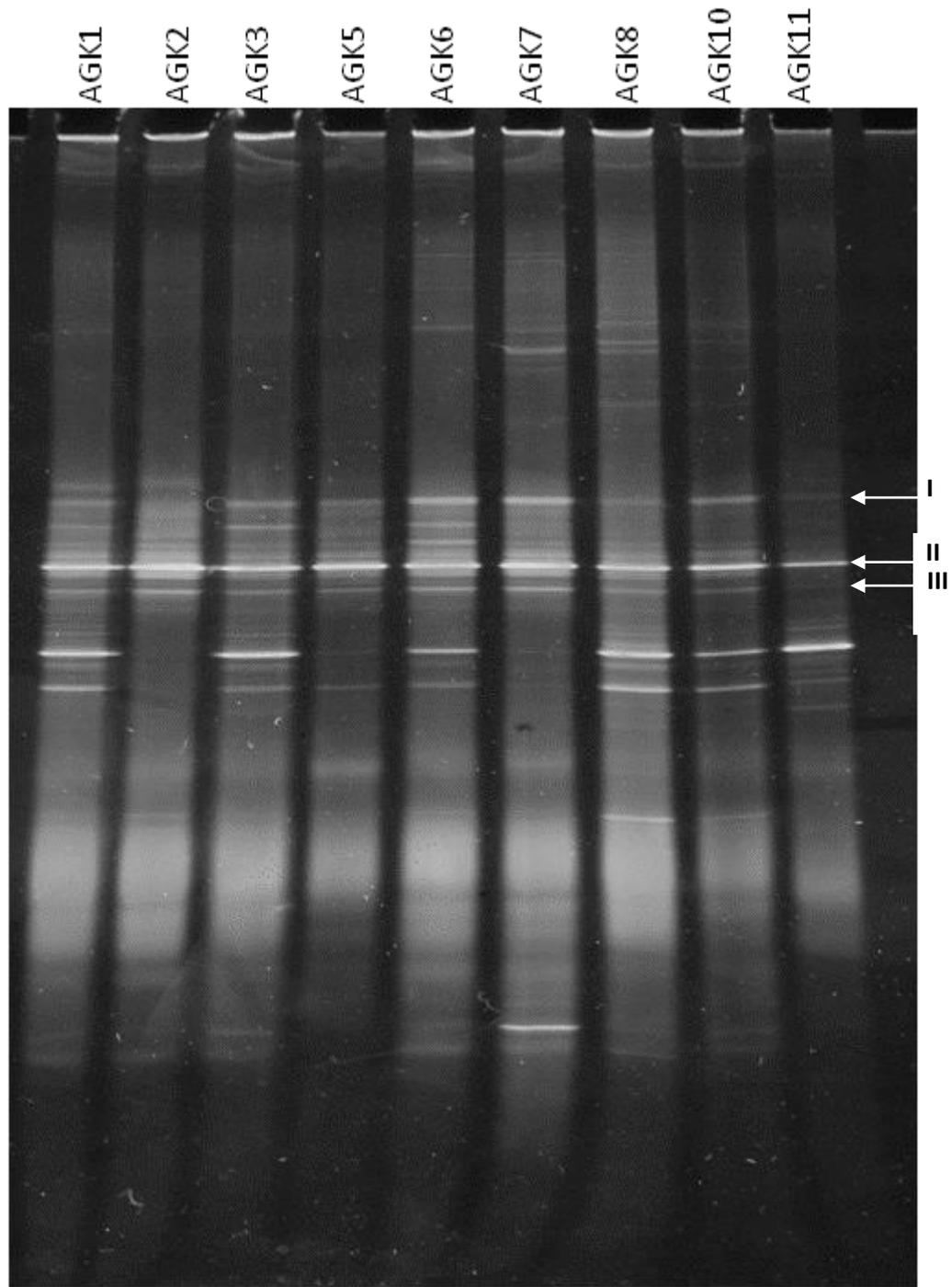


Figura 2: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S obtenidos a partir de ADN aislado de los gránulos de kefir CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 5, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 8, CIDCA AGK 10 y CIDCA AGK 11 de la colección CIDCA. En la electroforesis se utilizó un gradiente de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100V. Los gels fueron teñidos con Sybr Gold.

Para analizar la similitud existente entre los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los distintos gránulos se utilizó el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) el programa utilizado fue Systat 12 (Figura 3).

Del análisis del cluster puede decirse que entre todos los perfiles existe un 58,3 % de similitud. El gránulo CIDCA AGK 8 resultó el más disímil ya que no agrupó con ninguno de los otros gránulos. Los perfiles del resto de los gránulos se unieron en dos grandes grupos. En uno de ellos agruparon los gránulos CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 5 y CIDCA AGK 2, mientras que en el otro agruparon los gránulos CIDCA AGK 10, CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 3 y CIDCA AGK 11.

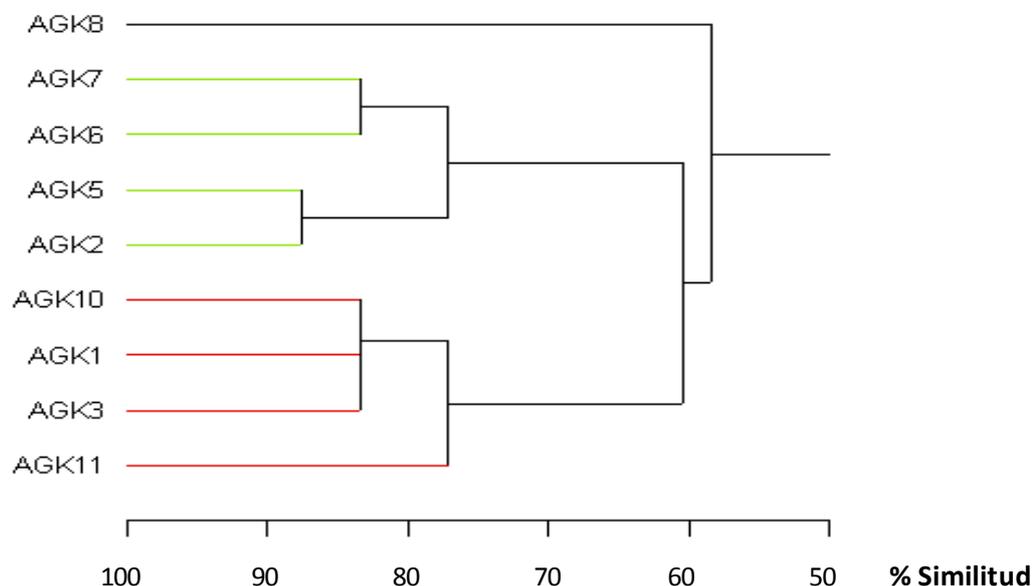


Figura 3: Dendrograma obtenido luego del análisis estadístico (UPGMA) de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante DGGE de los gránulos de kefir CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3, CIDCA AGK 5, CIDCA AGK 6, CIDCA AGK 7, CIDCA AGK 8, CIDCA AGK 10 y CIDCA AGK 11.

Los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los gránulos se contrastaron con los de cepas de referencia comúnmente descritas en éste ecosistema bacteriano y se compararon las posiciones relativas al frente de corrida de las bandas obtenidas. Para ello, el ADN de cepas de referencia fue amplificado y separado mediante la metodología ya descrita en Materiales y Métodos (ítem 12). Las cepas de referencia utilizadas fueron *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132; *Lb casei* DSMZ 20011; *Lb kefir* JCM 5818, *Lb parakefir* DSMZ 10551; *Lb plantarum* DSMZ 20174 y *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 332.

Los perfiles obtenidos del ADN de las cepas de referencia amplificados con los oligonucleótidos sintéticos específicos para Eucariotas (Figura 4) muestran que los microorganismos *Lb casei*, *Lb plantarum*, *Lb kefir* y *Lb parakefir* poseen patrones electroforéticos cuyas posiciones relativas al frente de corrida son muy disímiles entre sí, por lo tanto, son fácilmente diferenciables. *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* y *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* presentaron bandas en las mismas posiciones relativas al frente de corrida, pero diferentes a los otros microorganismos estudiados. Por esta razón estos tres microorganismos no pueden ser distinguidas por su movilidad electroforética.

En la Figura 4 también puede observarse que los amplicones muestran más de una banda en su perfil electroforético; esto puede deberse a varias razones dentro de las que podemos nombrar la presencia de múltiples copias del gen ribosomal analizado (Cocolin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008), la amplificación incompleta del gen de interés (Rosado *et al.*, 1998) o bien la formación de heteroduplex que se forman entre secuencias muy similares y se desnaturalizan en las regiones de menor contenido de agente desnaturalizante observándose bandas en la parte superior del gradiente (Fernandez *et al.*, 1993; Ferris & Ward, 1997; Rosado *et al.*, 1998).

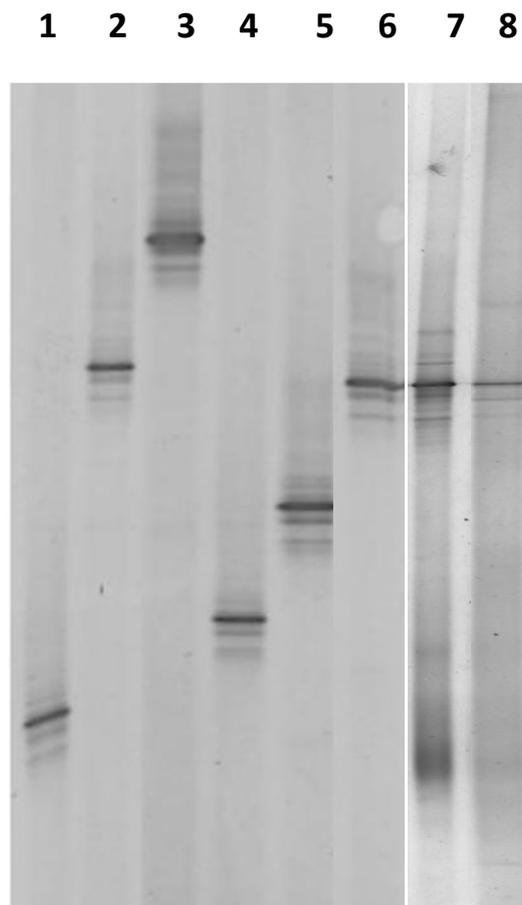


Figura 4: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S de cepas de referencia. En éste gel se utilizó un gradiente de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100 V. Los geles fueron teñidos con Sybr Gold. 1: *Lb casei* DSMZ 20011; 2: *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus* CIDCA 332; 3: *Lb plantarum* DSMZ 20174; 4: *Lb parakefir* DSMZ 10551; 5: *Lb kefir* JCM 5818; 6: *Lb kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens* DSMZ 5016.; 7: *Lb kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens* JCM 6985; 8: *Lb kefiranofaciens subsp. kefirgranum* LMG 15132.

Comparando los perfiles electroforéticos obtenidos para gránulos y cepas de referencia se pudo observar que en los perfiles de los gránulos estudiados se encuentran bandas que presentan posiciones relativas idénticas a las presentes en los perfiles de *Lb kefir*, *Lb parakefir* y de ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* y/o *Lb delbrueckii subsp. bulgaricus*. Por lo tanto estos microorganismos estarían presentes en éstos gránulos de kefir.

En la Figura 5 se presenta a modo de ejemplo los perfiles obtenidos a partir del ADN del gránulo AGK 10 (Calle 1) y un patrón formado por las cepas *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lb kefir* y *Lb parakefir* (Calle 2).

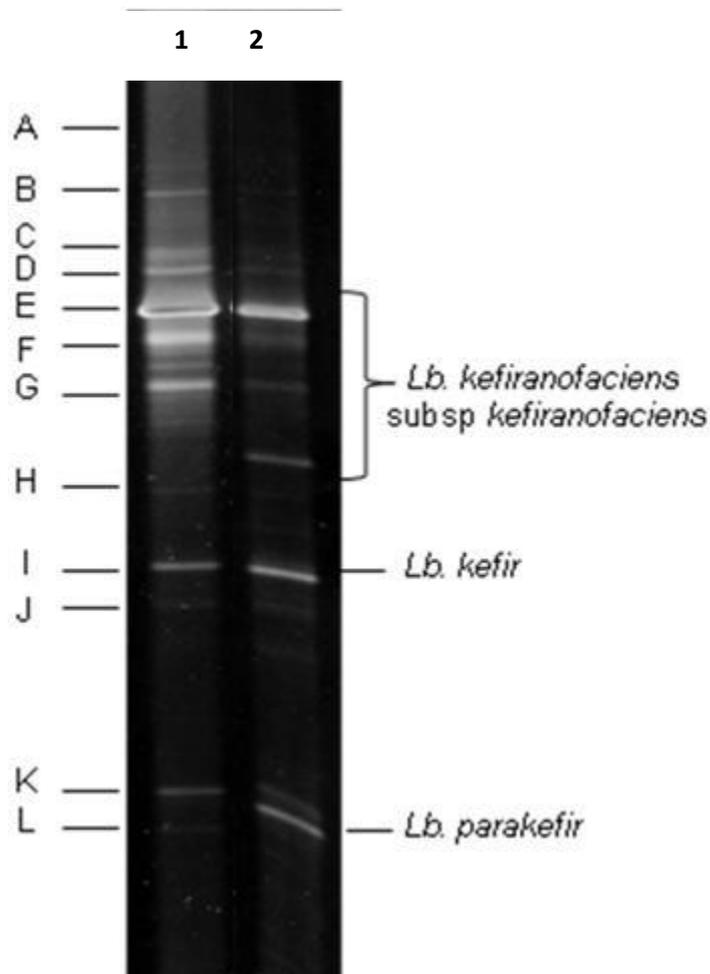


Figura 5: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones del gen que codifica para la región V3 del ARNr 16S de 1: Gránulo AGK 10; 2: Patrón formado por *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefir* JCM 5818 y *Lb parakefir* DSMZ 10551. Se utilizó un gradiente desnaturalizante de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100 V. Los geles fueron teñidos con *Sybr Gold*.

Debido a la complejidad de la muestra, la comparación de las posiciones relativas de las bandas no fue suficiente para la identificación de

los microorganismos y resultó necesario un análisis mediante secuenciación y contrastación con base de datos.

A fin de identificar a qué correspondía cada banda se separó el ADN de los geles de poliacrilamida, se purificó y se amplificó con los oligonucleótidos sintéticos 341F y 518R. Se procedió a la clonación y posterior secuenciación. En algunos experimentos los productos de amplificación fueron directamente secuenciados y comparados con secuencias similares en la base de datos del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabla 2). Las bandas que fueron objeto de la secuenciación se observan en la Figura 5. De acuerdo a éste análisis se encontró que las bandas A a G alinearon con ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* (subsp. *kefirgranum* y subsp. *kefiranofaciens*). La banda H fue identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o subsp. *cremoris*. Las bandas I y J alinearon con *Lactobacillus kefir*, *Lb buchneri*, *Lb otakiensis* y *Lb sunkii*. La banda K se correspondió con *Lb parakefir* y la banda L alineó con *Lactobacillus sp* sin diferenciar especies (Tabla 2).

Como se puede observar las bandas I y J mostraron altos porcentajes de homología con varias subespecies de lactobacilos. Se relacionaron las bandas I y J solamente con *Lb kefir* ya que *Lb buchneri*, *Lb otakiensis* y *Lb sunkii* no han sido encontrados con anterioridad en gránulo de kefir y provienen de otros hábitats.

Tabla 2: Porcentaje de similitud entre las secuencias parciales del ADNr 16S encontradas para las bandas A a L y las presentes en la base de datos de NCBI.

| Banda | Microorganismos más cercanos (closest relative) | Número de acceso | Similitud % |
|-------|--|----------------------------|----------------|
| A | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 99 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 99 |
| B | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 100 |
| C | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 100 |
| D | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 98 |
| E | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 100 |
| F | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 98 |
| G | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 100 |
| H | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | HM004215.1 | 100 |
| | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | GU344727.1 | 100 |
| I | <i>Lactobacillus kefiri</i> | AB429371.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus buchneri</i> | GQ421851.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus sunkii</i> | AB366385.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus otakiensis</i> | AB366392.1 | 100 |
| J | <i>Lactobacillus kefiri</i> | AB429371.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus buchneri</i> | AB425940.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus sunkii</i> | AB366385.1 | 100 |
| | <i>Lactobacillus otakiensis</i> | AB366392.1 | 100 |
| K | <i>Lactobacillus parakefiri</i> | AB447485.1 | 97 |
| L | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> | AB372208.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | FJ915793.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus crispatus</i> | AY339180.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus jensenii</i> | AY262343.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | GU454853.1 | 98 |
| | <i>Lactobacillus helveticus</i> | GU560037.1 | 98 |

El estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE permite inferir que hay un porcentaje de la comunidad microbiana que está presente en todos los gránulos pero ninguna de las poblaciones es idéntica entre sí. Está documentado que éstas variaciones pueden deberse a factores tales como el origen y almacenamiento de los gránulos o bien a las condiciones de elaboración del kefir (Witthuhn *et al.*, 2005; Fontán *et al.*, 2006; Latorre-García *et al.*, 2007). Resultados similares, utilizando la misma metodología, se encuentran entre gránulos provenientes de distintos estados de Brazil, Canadá y E.E.U.U. (da Cruz Pedrozo Miguel *et al.*, 2010), en gránulos de kefir procedentes del Tibet (Jianzhong *et al.*, 2009) y en gránulos originarios de Taiwán (Chen *et al.*, 2008). De esta manera la heterogeneidad de gránulos de distinto origen, que fue documentada con metodologías que se basan en el aislamiento de microorganismos, se confirma mediante técnicas independientes del cultivo (técnicas dependientes de la secuencia) (Ottagalli *et al.*, 1973; Garrote *et al.*, 2001; Farnworth *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2006).

En cuanto a la identificación de las bandas presentes en los perfiles de los gránulos se pudo constatar que las bandas cuyas posiciones relativas resultaron idénticas a las presentadas por *Lb kefir* JCM 5818 y *Lb parakefir* DSMZ 10551 fueron identificadas como tales mediante secuenciación y contrastación con base de datos pública. Asimismo, las bandas presentes en los gránulos que presentaron posiciones relativas similares *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y/o *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* y/o *Lb delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fueron identificadas como *Lb kefiranofaciens* sin diferenciar subespecie por secuenciación. Al examinar las secuencias publicadas en las base de datos (GenBank), la secuencia completa del ADNr 16S es idéntica para ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* (número de acceso AJ57525 y AJ575261) (Ninane *et al.*, 2007). Por lo tanto este método sería inapropiado para diferenciar a estos

microorganismos a nivel subespecie (Vancanneyt *et al.*, 2004; Ninane *et al.*, 2007).

Resultados previos indican que la comunidad bacteriana de los gránulos de kefir CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3 y CIDCA AGK 4, estudiada mediante métodos dependientes del cultivo, está constituida por los microorganismos *Lb plantarum*, *Lb kefir*, *Lb parakefir*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *diacetylactis*, *Acetobacter* y *Leuconostoc mesenteroide* (Garrote *et al.*, 2001). Los microorganismos hallados por éste método son dependientes del proceso de aislamiento, de la selectividad de los medios y condiciones de cultivo utilizados para el enriquecimiento. Tales variables pueden favorecer el crecimiento de microorganismos que se encuentren en baja proporción en la comunidad bacteriana (Heuer & Smalla, 1997; Miambi *et al.*, 2003).

Por otra lado, en éste trabajo, mediante métodos independientes de cultivo se encontró en los gránulos de kefir: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y/o *kefirgranum*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y/o subsp. *cremoris*; *Lactobacillus kefir*, *Lb parakefir* y otros *Lactobacillus sp* sin diferenciar especies. Este método nos permite confirmar la presencia de microorganismos de difícil crecimiento o bien no cultivables en condiciones de laboratorio. Además algunos microorganismos encontrados por métodos dependientes del cultivo no están representados en los patrones electroforéticos de los gránulos hallados mediante esta metodología. A modo de ejemplo, se puede destacar que *Lb plantarum* no fue detectado en los perfiles PCR-DGGE de ninguno de los gránulos, sin embargo; fue aislado previo enriquecimiento de los gránulos CIDCA AGK 1, CIDCA AGK 2, CIDCA AGK 3 y CIDCA AGK 4 (Garrote *et al.*, 2001). Esto podría estar relacionado con una baja proporción de éste microorganismo dentro del gránulo. Está descrito que especies que representan menos del 1% del total de una comunidad bacteriana pueden no ser visibles en los respectivos perfiles DGGE (Muyzer *et al.*, 1993; Heuer & Smalla, 1997). Sin embargo, esta no es la

única razón que justifica el hecho de que un microorganismo no esté representado en una comunidad microbiana al ser estudiada por esta metodología. Así, bajos rendimientos en la extracción del ADN debido a problemas en la lisis, amplificaciones diferenciales de genomas con bajo contenido de G-C, accesibilidad diferencial a los genes de interés dentro del genoma, interferencia de secuencias adyacentes y afinidad selectiva de los oligonucleótidos sintéticos por la secuencia blanco (Farrelly *et al.*, 1995; Suzuki & Giovannoni, 1996; Hansen *et al.*, 1998; Kanagawa, 2003) son otros factores que pueden influir en los resultados obtenidos por esta metodología. Por lo tanto, los métodos dependientes e independientes de cultivo resultaron complementarios a la hora de describir a la comunidad microbiana de los gránulos de kefir analizados.

Teniendo en cuenta resultados anteriores obtenidos por métodos dependientes de cultivo y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede decir que en los gránulos de kefir de la colección CIDCA están presentes los microorganismos *Lb plantarum*, *Lb kefir*, *Lb parakefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *diacetylactis*, *Acetobacter*, *Leuconostoc mesenteroide* y *Lb kefirnofaciens*.

2.- Aislamiento e identificación de *Lb kefirnofaciens* subsp. *kefirnofaciens* de gránulos de kefir.

2.1.- Aislamiento.

Habiendo confirmado la presencia de *Lb kefirnofaciens* en todos los gránulos de kefir de la colección CIDCA se planteó una estrategia dirigida a su aislamiento. Para ello se tuvieron en cuenta tanto las características de crecimiento como la complejidad de la estructura del gránulo.

Se observó que durante la purificación del kefir a partir de los gránulos se encontraban habitualmente bacilos íntimamente ligados al polisacárido. Estos bacilos mostraban una morfología microscópica coincidente con la de *Lb kefirnofaciens* subsp. *kefirnofaciens* y

permanecían asociados al polisacárido durante las sucesivas etapas de purificación. De tales observaciones se concluyó que la matriz producida por estos microorganismos constituye al mismo tiempo, una de las principales barreras para la liberación de los mismos hacia el medio utilizado para su aislamiento. Por lo tanto, para aumentar las probabilidades de aislar el microorganismo, se escogieron metodologías dirigidas a lograr la mayor disgregación o ruptura posible de la matriz del gránulo combinado con condiciones de cultivo que favorezcan el crecimiento de éste microorganismo frente al resto de los microorganismos presentes en el gránulo.

Las estrategias utilizadas para el aislamiento de *Lb kefiranofaciens* se esquematizan en la Figura 6. Los métodos 1 y 2 esquematizados se basaron principalmente en la propiedad del kefiran de ser soluble en agua caliente. La temperatura del agua utilizada, 40 °C, fue la más elevada posible para favorecer la solubilidad del polisacárido manteniendo la viabilidad de los microorganismos. El método 3 tuvo como objetivo una alternativa para la interrupción del gránulo. Dado que el gránulo tiene una textura gomosa no es factible triturarlo; por ésta razón para lograr mayor friabilidad se sumergió en nitrógeno líquido. Esto facilitó la ruptura posterior en mortero posibilitando la obtención de partículas de menor tamaño.

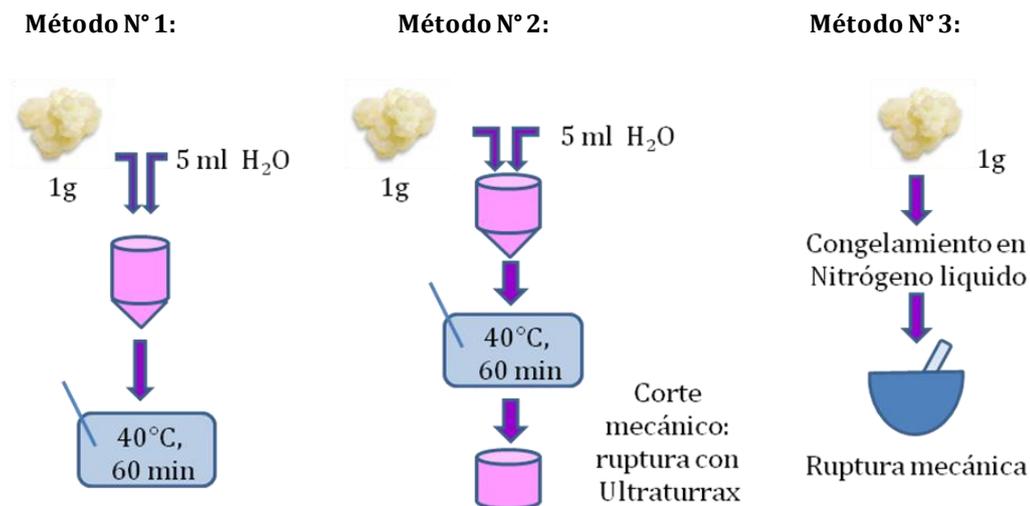


Figura 6: Estrategias para el aislamiento de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* a partir de gránulo de kefir.

Para el crecimiento se utilizaron medios de cultivo y condiciones de incubación selectivos para el desarrollo de *Lb kefiranofaciens* (caldo y agar MRS pH 5, y 10 días de incubación a 30 °C en atmosfera anaerobia). A las suspensiones obtenidas se les realizaron aislamientos directos por estrías en agar (agar MRS pH 5) y se realizó un previo enriquecimiento en medio líquido (caldo MRS pH 5) en las condiciones de crecimiento descritas antes de realizar el aislamiento por agotamiento en agar.

Las colonias encontradas se diferenciaron por características macroscópicas tales como color, tamaño, relieve, textura y bordes. En la Figura 7 se observan 4 de las morfologías de colonias encontradas. Dichas morfologías se repitieron en las colonias obtenidas a partir de los distintos gránulos y con las distintas estrategias de aislamiento.

Placas obtenidas luego de 10 días en MRS agar pH 5:



Tipos de colonias obtenidas:



Colonia opaca, de bordes lisos, tamaño grande. No presenta filancia.



Colonia opaca, de bordes rugosos, tamaño grande. No presenta filancia.



Colonia blanca, de bordes irregulares, tamaño grande. No presenta filancia.



Colonia brillante, de bordes lisos, tamaño pequeño. Presenta filancia.

Figura 7: Aspecto de las estrías (crecimiento en agar MRS pH 5, 10 días de incubación a 30 °C en atmósfera anaerobia) y microfotografías ampliadas mostrando las morfologías de colonia encontradas.

De las estrías obtenidas a partir de las suspensiones provenientes de cada gránulo se seleccionaron todas las colonias con distintas morfologías y se procedió a hacer sucesivos repiques hasta obtener cultivos puros de los microorganismos. La pureza de los microorganismos se constató por morfología de colonia y morfología microscópica utilizando tinción de Gram. Como resultado se obtuvo un total de 22 microorganismos aislados que fueron conservados a -80 °C hasta su caracterización. En la Tabla 3 se detallan los aislados obtenidos y los gránulos de los cuales provienen.

Tabla 3: Microorganismos aislados a partir de gránulos de kefir de la colección CIDCA.

| Gránulos de kefir | Aislado |
|-------------------|--|
| CIDCA AGK 1 | CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83122, CIDCA 83123, CIDCA 83124, CIDCA 83125 |
| CIDCA AGK 2 | CIDCA 83211, CIDCA 83212 |
| CIDCA AGK 3 | CIDCA 8339, CIDCA 83310, CIDCA 83311 |
| CIDCA AGK 5 | CIDCA 8352 |
| CIDCA AGK6 | CIDCA 8361 |
| CIDCA AGK7 | CIDCA 8371 |
| CIDCA AGK8 | CIDCA 8381, CIDCA 8385 |
| CIDCA AGK10 | CIDCA 83101, CIDCA 83102, CIDCA 83103 |
| CIDCA AGK 11 | CIDCA 830111 |

2.2.- Identificación de los aislados obtenidos

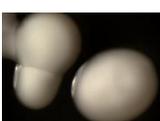
2.2.1.- Caracterización fenotípica: Coloración, morfología de colonia, producción de gas a partir de glucosa y capacidad para fermentar la leche.

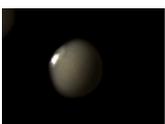
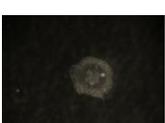
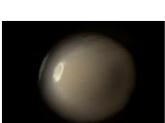
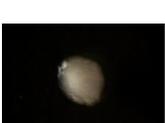
Los aislados fueron caracterizados en cuanto a su morfología microscópica comportamiento frente a la tinción de Gram y morfología de colonia. Asimismo, se les determinó la presencia de la enzima catalasa, capacidad de formar gas a partir de glucosa y la capacidad de crecimiento en leche. Todas las bacterias aisladas resultaron ser bacilos Gram positivos, catalasa negativa, no móvil y no formadoras de esporos, por lo tanto, se puede decir que se encuentran dentro del género *Lactobacillus* (Dellaglio & Felis, 2005).

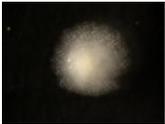
Para determinar la morfología de las colonias los microorganismos fueron crecidos en agar MRS pH 5 durante 7 días de incubación a 30 °C en

atmosfera anaerobia. En la Tabla 4 se muestra la descripción de las colonias con sus respectivas imágenes. Asimismo, se incluye la colonia perteneciente a *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* utilizada como referencia.

Tabla 4: Características de las colonias de los 22 aislados crecidos en agar MRS pH 5 durante 7 días de incubación a 30 °C en atmosfera anaerobia.

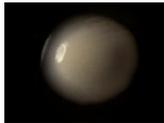
| Aislados | Color | Borde | Tamaño | Filancia | Brillo | Imágen |
|--|--------|--------|---------|----------|--------|---|
| <i>Lb kefirano faciens</i> subsp. <i>kefirano faciens</i> JCM 6985 | crema | liso | pequeño | + | si |  |
| CIDCA 83118 | crema | rugoso | pequeño | + | si |  |
| CIDCA 83119 | crema | rugoso | pequeño | + | si |  |
| CIDCA 83120 | blanca | liso | grande | +++ | si |  |
| CIDCA 83121 | blanca | liso | grande | +++ | si |  |
| CIDCA 83122 | crema | rugoso | pequeño | + | si |  |
| CIDCA 83123 | blanca | liso | grande | +++ | si |  |
| CIDCA 83124 | blanca | liso | grande | +++ | si |  |

| | | | | | | |
|----------------|-----------------|--------|---------|---|----|---|
| CIDCA 83125 | blanca | liso | grande | - | si |  |
| CIDCA 83211 | crema | rugoso | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 83212 | crema | rugoso | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 8339 | blanca | liso | grande | + | si |  |
| CIDCA 83310 | crema | rugoso | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 83311 | crema | rugosa | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 8352 | crema | rugoso | pequeño | + | si |  |
| CIDCA 8361 | crema | rugoso | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 8371 | crema | rugoso | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 8381 | blanqueci no | liso | grande | - | si |  |
| CIDCA 8385 | blanqueci no | rugoso | grande | - | no |  |
| CIDCA 83101 | blanqueci no | liso | grande | - | si |  |

| | | | | | | |
|-----------------|-----------------|--------|---------|---|----|---|
| CIDCA 83102 | blanqueci no | rugoso | grande | - | no |  |
| CIDCA 83103 | crema | rugoso | pequeño | - | no |  |
| CIDCA 830111 | crema | rugoso | grande | - | no |  |

En base a la similitud entre las morfologías de colonia encontradas se diferenciaron 5 grupos (Tabla 5). En el grupo I se incluye a los lactobacilos CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 que presentan colonias blancas, con brillo, bordes lisos, tamaño grande y filancia; el Grupo II está constituido por los microorganismos CIDCA 83101, CIDCA 8381, y CIDCA 83125, cuyas colonias son blanquecinas, con brillo, de bordes lisos, grandes y no presentan filancia. El grupo III está formado por los aislados CIDCA 83102, CIDCA 830111 y CIDCA 8385, de colonias blanquecinas, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño grande y sin filancia. El grupo IV esta constituido por los microorganismos CIDCA 83122, CIDCA 83119, CIDCA 83118 que tienen la característica de presentar polimorfismo en sus colonias. Ambos tipos de colonias son pequeñas, de color crema y bordes rugosos, la diferencia entre ambas es que unas presentan brillo y mayor filancia que el otro tipo de colonia. El Grupo V incluye a los microorganismos CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83212, CIDCA 83211, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 83103 cuyas colonias son de color crema, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño pequeño y no presentan filancia.

Tabla 5: Agrupamiento de los aislados según la morfología de sus colonias .

| GRUPOS | AISLADOS | DESCRIPCION | TIPO DE MORFOLOGÍA |
|--------|---|--|---|
| I | CIDCA 83120 CIDCA 83121 CIDCA 83123 CIDCA 83124 CIDCA 8339 | Colonias blancas, con brillo, de bordes lisos, tamaño grande. Presentan filancia. |  |
| II | CIDCA 83101 CIDCA 8381 CIDCA 83125 | Colonias blanquesinas, con brillo, de bordes lisos, tamaño grande. No presentan filancia |  |
| III | CIDCA 83102 CIDCA 8385 CIDCA 830111 | Colonias blanquesinas, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño grande. No presentan filancia. |  |
| IV | CIDCA 83122 CIDCA 83119 CIDCA 83118 | Presentan polimorfismo(1 y 2). 1: colonias color crema, de bordes rugosos, tamaño pequeño. 2: colonias color crema, de bordes rugosos, tamaño pequeño. Presentan brillo y filancia moderada. |  |
| V | CIDCA 8352 CIDCA 8361 CIDCA 8371 CIDCA 83212 CIDCA 83211 CIDCA 83310 CIDCA 83311 CIDCA 83103 | Colonias color crema, sin brillo, de bordes rugosos, tamaño pequeño. No presentan filancia |  |

De todos los aislados se analizó la habilidad de fermentar la leche y la capacidad de producir gas a partir de glucosa, que nos permite separar a los microorganismos en homofermentativos y heterofermentativos obligados. En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para los microorganismos aislados indicando el grupo al que pertenecen según la morfología de las colonias. Se incluyó en esta Tabla la cepa de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 que tiene la capacidad de fermentar la leche y no produce gas a partir de glucosa.

Los microorganismos de los grupos I, IV y V no producen gas a partir de glucosa y fermentan la leche; mientras que los microorganismos que pertenecen a los grupos II y III producen gas a partir de glucosa y no fermenta la leche. Estas características resultaron ser idénticas para los microorganismos dentro de cada grupo; excepto el aislado CIDCA 8361 perteneciente al grupo V que no fermenta la leche a diferencia de los demás microorganismos de ese grupo.

Tabla 6: Capacidad para crecer en leche y producir gas a partir de glucosa de *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 y 22 microorganismos aislados de gránulo de kefir.

| GRUPOS DE MORFOLOGÍA DE COLONIA | AISLADOS | CRECIMIENTO EN LECHE | GAS A PARTIR DE GLUCOSA |
|---------------------------------|---|----------------------|-------------------------|
| | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | + | - |
| I | 83120 | + | - |
| I | 83121 | + | - |
| I | 83123 | + | - |
| I | 83124 | + | - |
| I | 8339 | + | - |
| II | 83125 | - | + |
| II | 8381 | - | + |
| II | 83101 | - | + |
| III | 8385 | - | + |
| III | 83102 | - | + |
| III | 830111 | - | + |
| IV | 83118 | + | - |
| IV | 83119 | + | - |
| IV | 83122 | + | - |
| V | 83211 | + | - |
| V | 83212 | + | - |
| V | 83310 | + | - |
| V | 8352 | + | - |
| V | 8361 | - | - |
| V | 8371 | + | - |
| V | 83103 | + | - |
| V | 83311 | + | - |

2.2.2.- Caracterización fenotípica: Perfil de proteínas por SDS-PAGE

Continuando con la identificación de los aislados se realizó un análisis de las proteínas de célula entera. La electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) es ampliamente utilizado para identificar una

gran cantidad de especies estrechamente vinculadas (Ohya *et al.*, 1988; Vauterin *et al.*, 1993; Kersters *et al.*, 1994; Gómez-Zavaglia *et al.*, 1999). Además, numerosos estudios han revelado una buena correlación entre los resultados obtenidos por este método y la hibridación ADN-ADN (Costas, 1992; Vandamme *et al.*, 1996); siendo ésta última una técnica de gran importancia en identificación bacteriana.

Inicialmente se procedió a analizar los perfiles electroforéticos obtenidos mediante SDS-PAGE de cepas de referencia comúnmente descritas en éste ecosistema bacteriano y sus perfiles fueron comparados entre sí. Los microorganismos de referencia ensayados fueron *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* DSMZ 5016, *Lb plantarum* DSMZ 20174, *Lb acidophilus* DSMZ 20079, *Lb brevis* JCM 1059, *Lb kefir* JCM 5818, *Lb paracasei* LMG 40006 y *Lb parakefir* JCM 8573.

Los perfiles obtenidos para las cepas de referencia (Figura 8) resultaron ser disímiles entre sí. Se puede observar que se logra la diferenciación de microorganismos que se encuentran inclusive en los mismos grupos filogenéticos según Felis & Dellaglio (2007). Por ejemplo, se obtienen perfiles distintos para ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* y *Lb acidophilus*, logrando así diferenciar a estos microorganismos que se encuentran en el grupo *Lb delbrueckii*. Por otro lado, se logra diferenciar a los microorganismos *Lb kefir* y *Lb parakefir* pertenecientes al grupo *Lb buchneri*.

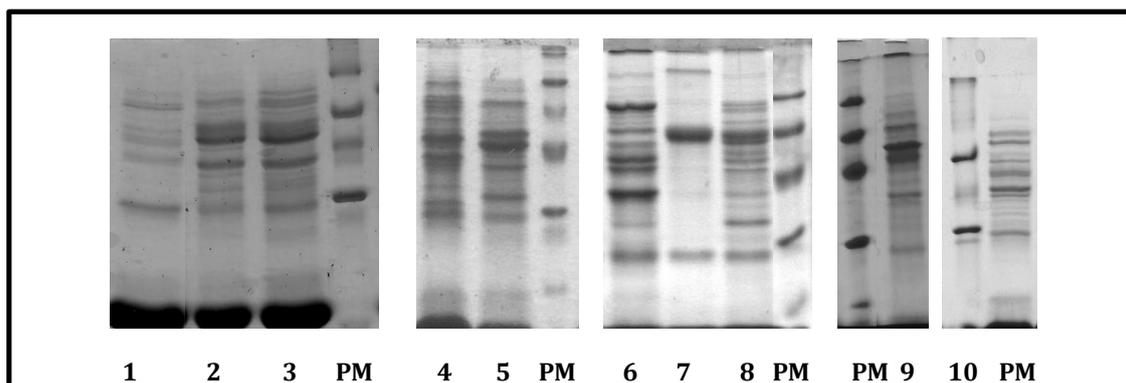


Figura 8: Perfil de proteínas de cepas de lactobacilos de referencia obtenido mediante SDS-PAGE en gel continuo 12,5% de acrilamida /bis acrilamida. Calles: 1: *Lb casei* DSMZ 20011; 2: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; 3: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* DSMZ 5016 ; 4: *Lb plantarum* DSMZ 20174; 5: *Lb acidophilus* DSMZ 20079; 6: *Lb brevis* JCM 1059; 7: *Lb kefir* JCM 5818; 8: *Lb parakefir* JCM 8573; 9: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, 10: *Lb paracasei* LMG 40006.

Los perfiles proteicos obtenidos mediante SDS-PAGE de cada uno de los microorganismos aislados se muestran en la Figura 9.

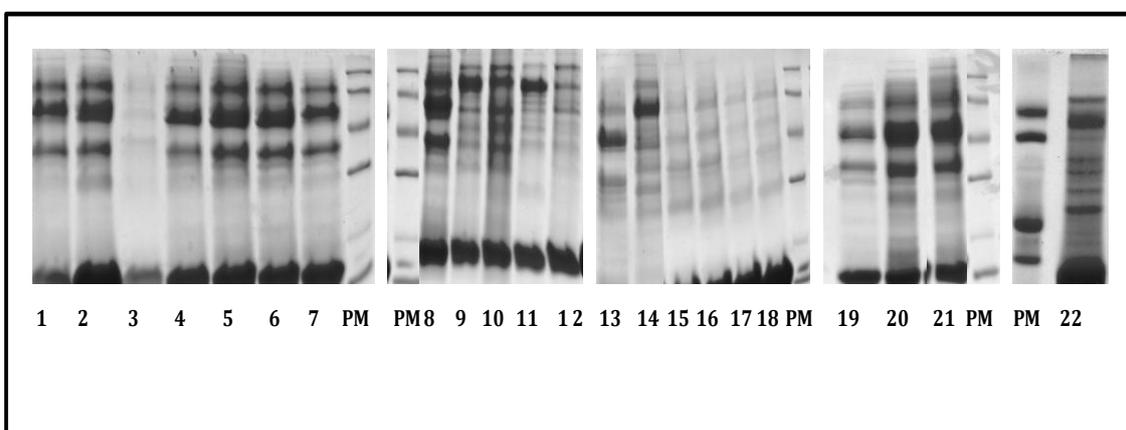


Figura 9: Perfil de proteínas de célula entera de los microorganismos aislados mediante SDS-PAGE en gel continuo 12,5% de acrilamida /bis acrilamida 1:CIDCA 83211, 2:CIDCA 83212, 3:CIDCA 8339, 4:CIDCA 83310, 5:CIDCA 83311, 6:CIDCA 8352, 7:CIDCA 8361, 8:CIDCA 8371, 9: CIDCA 8381, 10:CIDCA 8385, 11:CIDCA 83101, 12:CIDCA 83102, 13:CIDCA 83103, 14:CIDCA 830111, 15:83120, 16:CIDCA 83121, 17:CIDCA 83123, 18:CIDCA 83124, CIDCA 8318, 20:CIDCA 8319, 21:CIDCA 83122, 22:CIDCA 83125.

La similitud existente entre las cepas de referencias y los microorganismos en estudio fue evaluada utilizando el coeficiente de Jaccard y se realizó un análisis de cluster mediante el método de agrupamiento de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). El dendrograma resultante se presenta en la Figura 10.

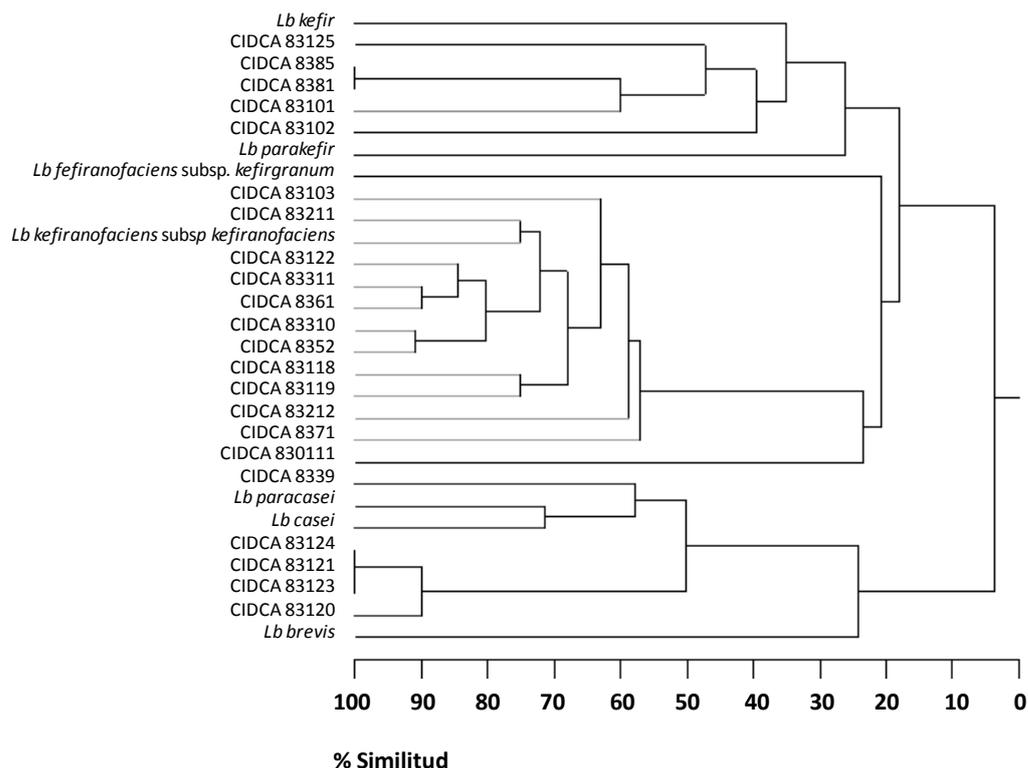


Figura 10: Dendrograma obtenidos por análisis estadístico (Coeficiente de Jaccard-agrupamiento de ligamento promedio no ponderado (UPGMA)) de los perfiles SDS-PAGE de los microorganismos aislados de kefir y los utilizados como referencia. *Lb brevis* JCM 1059, *Lb kefir* JCM 5818, *Lb parakefir* JCM 8573, CIDCA 83102, CIDCA 83101, CIDCA 8381, CIDCA 8385, CIDCA 83125 y CIDCA 830111; *Lb paracasei* LMG 40006; *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* JCM 6985, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* DSMZ 5016, *Lb plantarum* DSMZ 20174, *Lb acidophilus* DSMZ 20079, y los aislados CIDCA 8371, CIDCA 83212, CIDCA 83211, CIDCA 8361, CIDCA 83311, CIDCA 83122, CIDCA 83310, CIDCA 8352, CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83103, CIDCA 83120, CIDCA 83123, CIDCA 83121, CIDCA 83124, CIDCA 8339.

De este análisis surge que los microorganismos agrupan formando 2 clusters bien definidos. Uno de ellos está constituido por *Lb casei*, *Lb paracasei* y los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 y con menor porcentaje de similitud se une a los anteriores *Lb brevis*. El otro cluster se subdivide en dos grupos, uno formado por *Lb kefir*, *Lb parakefir*, CIDCA 8381, CIDCA 8385, CIDCA 83125, CIDCA 83101, CIDCA 83102 y el otro que agrupa a *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132 y los aislados CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83311, CIDCA 8310, CIDCA 83103, CIDCA 830111.

2.2.3.- Características genotípicas: Amplificación de secuencias repetitivas.

La amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP) es un tipo de PCR que emplea oligonucleóticos diseñados para hibridar con secuencias de ADN repetidas distribuidas en el cromosoma y amplifica las regiones que las separan. Por lo tanto, el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones del ADN. Como resultado se obtienen múltiples amplicones de distintos tamaños que luego son separados por electroforesis en gel de agarosa. Los perfiles electroforéticos obtenidos son característicos para cada cepa bacteriana y son utilizados para su identificación. Esta técnica es ampliamente utilizada para diferenciar una gran cantidad de lactobacilos asociados a alimentos a nivel especie y subespecie, cuando el número de bandas presentes en los perfiles electroforéticos varía entre 10 y 20 (Gevers *et al.*, 2001).

En este trabajo se amplificó el ADN de los 22 aislados utilizando los oligonucleóticos sintéticos (GTG)₅' y los amplicones obtenidos se corrieron en geles de agarosa 1,5 % p/v. Las imágenes resultantes fueron procesadas utilizando el programa Bionumerics v5.1 y como referencia, para la comparación e identificación de los perfiles, se utilizó la base de datos del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Gent (LM-UGent).

En la Figura 11 podemos observar los perfiles electroforéticos y el dendrograma construido a partir de los resultados obtenidos. El análisis estadístico se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Del análisis de cluster puede decirse que los aislados forman dos grandes grupos que presentan una muy baja homología (0,5 %). Uno de los grupos posee un bajo número de bandas en los perfiles y otro un elevado número de bandas. El cluster que presenta los aislados con un bajo número de bandas incluye a las cepas de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lb kefir*. El cluster que agrupa a los aislados con mayor número de bandas incluye a las cepas de referencia *Lb paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb paracasei* subsp. *tolerans* y *Lb parakefir*.

Puede observarse que los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123 y CIDCA 83124 presentan una homología del 96 % entre sí y de 40,9 % con cepas de *Lb paracasei* subsp. *paracasei* LMG 13087 y LMG 7955 y *Lb paracasei* subsp. *tolerans* LMG 919. El aislado CIDCA 8339 se asemeja a *Lb paracasei* de la base de datos de LMU-Gent mostrando un porcentaje de similitud de 65,8 %.

Los aislados CIDCA 83125 y CIDCA 83101 tienen una homología de 60,4% con el microorganismo *Lb parakefir* LMG 15133.

En cuanto a los aislados CIDCA 8352, CIDCA 83310, CIDCA 83118, CIDCA 8371, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 8361 agrupan con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132 y *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* LMG 19149 mostrando una similitud de 62,4 %.

Los aislados CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83119, CIDCA 83102, CIDCA 83122, CIDCA 830111, CIDCA 8381 y CIDCA 8385 presentaron bajo número de bandas fueron.

Los aislados CIDCA 83119, CIDCA 83102, CIDCA 83122, CIDCA 830111, CIDCA 8385, CIDCA 8381, CIDCA 83311 y las cepas de *Lb kefir* LMG 11454, LMG 11496, LMG 9480 y LMG 11453 de la colección LM-UGent forman un subgrupo con una homología de 69,5 %. Dentro de este último subgrupo se encuentran seis de los siete aislados con bajo número de bandas en sus perfiles electroforéticos.

En el análisis no se incluye el perfil del aislado CIDCA 83103 ya que no se logró amplificar el ADN en las condiciones ensayadas.

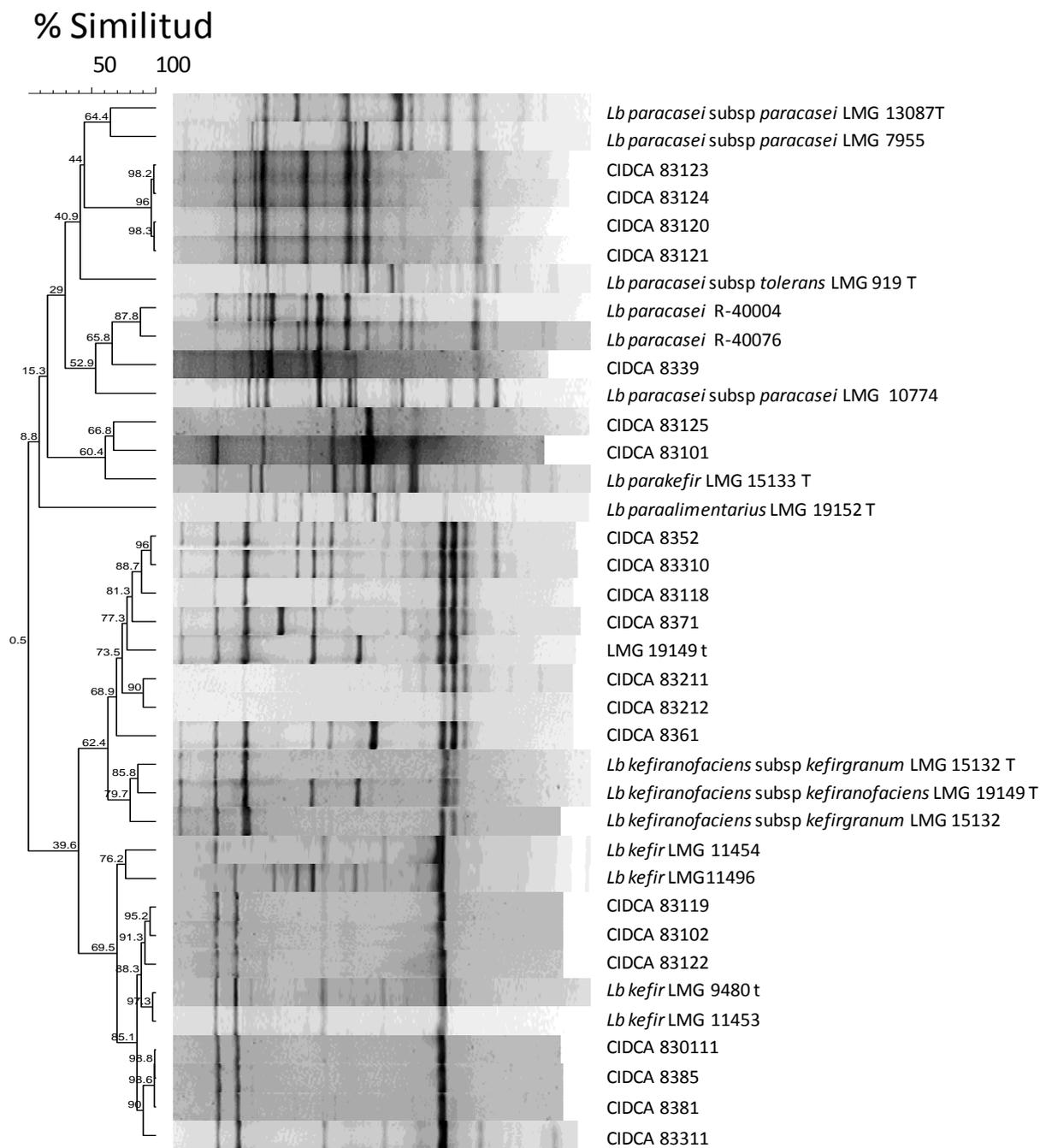


Figura 11: Dendrograma obtenido por análisis estadístico (correlación de Pearson) de los perfiles de rep-PCR (GTG)5' de los lactobacilos aislados en comparación con las cepas de referencia de la base de datos LM-Ugent.

Es de destacar que los grupos de similitud encontrados por esta metodología son iguales a los encontrados por perfil de proteínas totales (SDS-PAGE) para la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, los

aislados CIDCA 83119, CIDCA 83122 y CIDCA 83311 no mostraron resultados coincidentes analizado por ambas metodologías. Según esta técnica dichos microorganismos presentan homología con el microorganismo *Lb kefir* mientras que su perfil de proteínas totales indica una similitud, con altos porcentajes de homología, con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*.

2.2.4. Características genotípicas: Secuenciación del gen que codifica el tARN de la fenilalanina sintasa (pheS).

La secuenciación de los genes de la subunidad α del tARN de la fenilalanina sintasa (pheS) y de la subunidad α de la ARN polimerasa (rpoA) es usada para identificación como una alternativa a la secuenciación del ARNr 16S y tiene un poder discriminatorio muy alto para especies del género *Lactobacillus* (Naser *et al.*, 2007).

En este trabajo se secuenció el gen que codifica para el tARN de la pheS con el método dideoxi de Sanger. Para ello, se amplificó el ADN de los aislados con los oligonucleóticos conservados 21F/22R y 21F/23R. Los amplicones obtenidos (400-450 kpb) fueron purificados por técnicas de ultrafiltración y la calidad y cantidad del ADN se verificó utilizando electroforesis en geles de agarosa al 2%, los datos obtenidos se ensamblaron para obtener una secuencia consenso.

Los resultados encontrados para los aislados fueron comparados con las cepas de referencia de la base de datos LM-UGent y el porcentaje de similitud fue calculado usando el coeficiente de Pairwise.

Los aislados analizados por esta metodología fueron aquellos que presentaron discrepancias en los métodos anteriormente descritos. No se muestran resultados para los aislados CIDCA 83211, CIDCA 83102 y CIDCA 830111 debido a que no fue posible amplificar su ADN con la combinación de primers 21/22, 21/23 y temperaturas de *annealing* utilizadas.

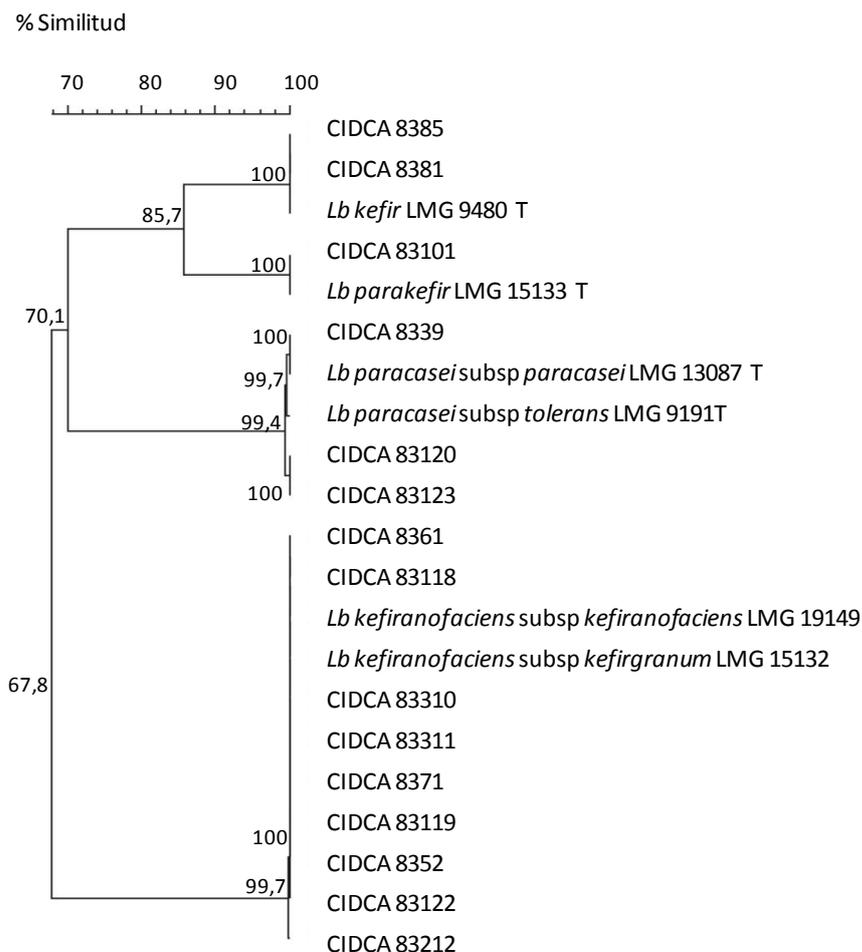


Figura 12: Dendrograma obtenido a partir de los datos de secuenciación de gen de la pheS de los lactobacilos aislados en comparación con los resultados de cepas de referencia de la base de datos de LM- UGent.

Los resultados del análisis numérico se muestran en la Figura 12. Se puede observar que la secuenciación de éste gen diferencia muy bien a las especies *Lb kefiranofaciens*, *Lb kefir*, *Lb parakefir* y *Lb paracasei* en estudio. Los aislados se agrupan con las cepas de referencia en 3 cluster. Uno de ellos está constituido por los aislados CIDCA 83212, CIDCA 83122, CIDCA 8352, 83119, CIDCA 8371, CIDCA 83311, CIDCA 83310, CIDCA 8361, y CIDCA 83118 y presenta una similitud de 100% con las cepas de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* y *Lb kefirnofaciens* subsp. *kefirgranum*. El segundo grupo se divide en dos subgrupos. En uno de ellos se encuentran

los aislados CIDCA 8339, CIDCA 83120 y CIDCA 83123 mostrando porcentajes de similitud cercanos al 100 % con *Lb paracasei* subsp. *paracasei* y *Lb paracasei* subsp. *tolerans*. El segundo subgrupo se subdivide, mostrando por un lado al aislado CIDCA 83101 que posee una homología del 100 % con *Lb parakefir* y por otro lado los aislados CIDCA 8381 y CIDCA 8385 que presentaron una semejanza del 100% con *Lb kefir*.

La secuenciación del gen de la pheS de los aislados CIDCA 83118, CIDCA 8352, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83101, CIDCA 8339, CIDCA 83120, CIDCA 83123, CIDCA 8381 y CIDCA 8385 confirmó los resultados obtenidos por (GTG)₅' y perfil de proteínas totales. Los aislados CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83311 presentaron resultados que no se correspondieron con los obtenidos por rep PCR (GTG)₅' pero sí a los obtenidos por SDS-PAGE.

2.2.5. Perfil obtenido por electroforesis en geles con gradiente desnaturizante químico (DGGE) de los microorganismos aislados de gránulo de kefir y secuenciación del ADNr 16S.

Se realizaron perfiles DGGE de los 22 microorganismos aislados. Para ello su ADN fue amplificado utilizando los oligonucleótidos sintéticos 518R y 341F-GC y los amplicones se analizaron por electroforesis utilizando un gradiente desnaturizante de urea/formamida 40-60% (Figura 13). Las posiciones relativas de las bandas se contrastaron con las encontradas para las cepas de referencia *Lb casei* DSMZ 20011, *Lb parakefir* DSMZ 10551, *Lb kefir* JCM 5818, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* LMG 15132, *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 y *Lb plantarum* DSMZ 20174 (Figura 4).

En la Figura 13 se observan, a modo de ejemplo, los perfiles electroforéticos encontrados para algunos de los aislados y la cepa de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985.

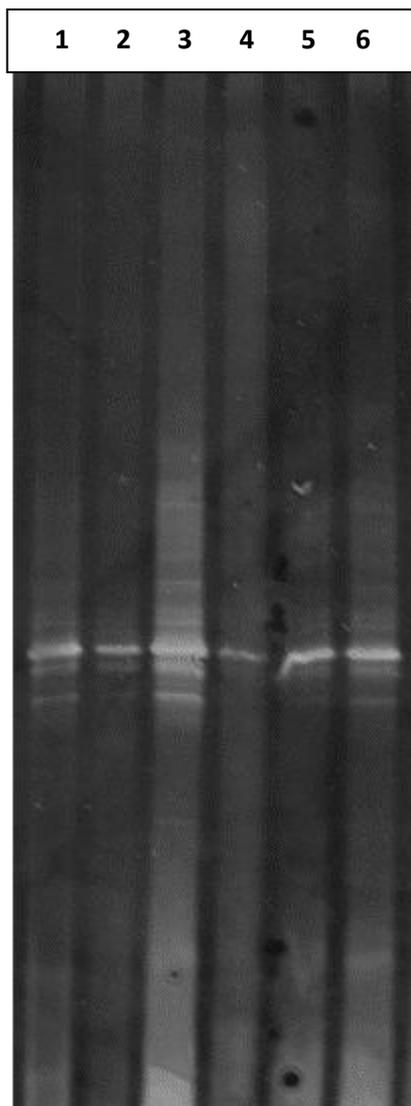


Figura 13: Perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de amplicones de la región V3 del ARNr 16S de las cepas de referencia JCM 6985 y algunos de los microorganismos aislados en este trabajo. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar dicha secuencia fueron 518R y 341F-GC. En éste gel se utilizó un gradiente de urea/formamida 40-60 % y corridas electroforéticas de 16 horas a 100 V. Los gels fueron teñidos con Sybr Gold. Calles: 1: *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985; 2: CIDCA 83118; 3: CIDCA 83119; 4: CIDCA 83122; 5: CIDCA 83212; 6: CIDCA 83212; 7: CIDCA 83310.

Los aislados CIDCA 83103, CIDCA 83122, CIDCA 83119, CIDCA 83118, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8371, CIDCA 8352, y CIDCA 8361 poseen perfiles idénticos entre sí y con las cepas *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 y *Lb kefiranofaciens* subsp.

kefirgranum LMG 15132; los microorganismos aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83113, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 mostraron equivalencia en sus perfiles y con la cepa de referencia *Lb casei* DSMZ 20011. Para dilucidar la identidad de éstos microorganismos las bandas mayoritarias de cada uno de los aislados y las cepas de referencia *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* JCM 6985 obtenidas en el punto anterior fueron cortadas, amplificadas con oligonucleótidos 518R y 341F, purificadas y secuenciadas. Las secuencias obtenidas fueron contrastadas en el GenBank utilizando el algoritmo BLAST. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Porcentaje de similitud entre las secuencias parciales del ADNr 16S encontradas para las bandas mayoritarias de los aislados y las presentes en la base de datos de NCBI. NA: Número de Acceso al GenBank.

| Aislado | Resultado |
|---|---|
| <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> CIDCA 83118 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA:HM218529.1)/ <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1) 100% |
| CIDCA 83119 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100% |
| CIDCA 83120 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: HM218539.1)98% |
| CIDCA 83121 | <i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1)95% |
| CIDCA 83122 | <i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 95% |
| CIDCA 83123 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100% |
| CIDCA 83124 | <i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 97% |
| CIDCA 83125 | <i>Lb casei</i> (NA: GU560041.1)/ <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1)/ <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 99% |
| CIDCA 83212 | <i>Lb parakefir</i> (NA: AB447485.1) 100% |
| CIDCA 8339 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)97% |
| CIDCA 83310 | <i>Lb casei</i> (NA: AB494735.1), <i>paracasei</i> (NA: AB494720.1), <i>rhamnosus</i> (NA: GU560042.1) 100% |
| CIDCA 83311 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100% |
| CIDCA 8352 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)99% |
| CIDCA 8361 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1) 97% |
| CIDCA 8371 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1) 97% |
| CIDCA 8381 | <i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB372208.1) 100% |
| CIDCA 8385 | <i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1) 100% |
| CIDCA 83101 | <i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1)/ <i>otakiensis</i> (NA: AB366392.1) 100% |
| CIDCA 83102 | <i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1)/ <i>otakiensis</i> (NA: AB366392.1) 96% |
| CIDCA 83103 | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> (NA: FJ915793.1) / <i>kefirgranum</i> (NA: AB372208.1)100% |
| CIDCA 830111 | <i>Lb buchneri</i> (NA: AB425940.1)/ <i>sunki</i> (NA: AB366385.1)/ <i>kefir</i> (NA: AB429371.1)/ <i>otakiensis</i> (NA: AB366392.1) 98% |

Las secuencias parciales del gen que codifica para el ARNr 16S encontradas para los microorganismos CIDCA 83103, CIDCA 83122, CIDCA 83119, CIDCA 83118, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8352, CIDCA 8371 y CIDCA 8361 presentaron una homología que varió entre 97 y 100% con las secuencias depositadas en el GenBank de ambas

subespecies de *Lb kefiranofaciens*. Asimismo, los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 presentaron similitud con las secuencias de *Lb casei*, *Lb paracasei* y *Lb rhamnosus* en porcentajes que variaron entre 95 y 100%. Finalmente, las secuencias encontradas para los aislados CIDCA 83101, CIDCA 8381, CIDCA 8385, CIDCA 83102 y CIDCA 830111 mostraron homología entre 95 y 100% con cepas de *Lb buchneri*, *Lb sunki*, *Lb kefir* y *Lb otakiensis* (Tabla 7).

Los resultados aplicando distintas metodologías, con la finalidad de identificar los 22 microorganismos aislados, se analizaron de manera conjunta. Para facilitar el análisis se agruparon los aislados de acuerdo a los grupos definidos inicialmente por morfología de colonia y producción de gas a partir de glucosa.

Grupo I

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos al utilizar diferentes metodologías para identificar los microorganismos CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 y CIDCA 8339 pertenecientes al grupo I de morfología de colonia. Estos microorganismos son Gram positivos, catalasa negativa, tienen la capacidad de crecer en leche y no producen gas a partir de glucosa.

De acuerdo al análisis de los perfiles de proteínas estos aislados agrupan con los microorganismos del grupo *Lb casei* (Felis & Dellaglio, 2007).

Los perfiles electroforéticos obtenidos por DGGE de los microorganismos del grupo I muestran que los fragmentos de ADN de la región V3 del ARNr 16S es idéntica entre ellos y con *Lb casei* DSMZ 20011 (ATCC 393). Esto podría relacionar a los aislados con este microorganismo de referencia. Sin embargo se sabe que para el grupo *Lb casei* (*Lb casei*, *Lb paracasei* y *Lb rhamnosus*) la movilidad electroforética de dicho fragmento es idéntica (Walter *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008). Además, los resultados de

la secuenciación (ARNr 16S) mostraron altos porcentajes de similitud con las 3 especies del grupo *casei* (*Lactobacilos casei*, *paracasei* y *rhamnosus*). Por lo tanto, esta metodología solo nos permite afirmar que los microorganismos del grupo I se encuentran dentro del grupo *Lb casei*.

En cuanto a los perfiles encontrados por rep-PCR (GTG)_{5'} los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 mostraron una alta homología entre sí (96%) y una homología menor (40%) con *Lb paracasei* subsp. *paracasei* presente en la base de datos de LMU-Gent. En cuanto al microorganismo CIDCA 8339 se debe destacar que se encuentra en un cluster diferente a los microorganismos anteriormente mencionados con un porcentaje de similitud de 29%. Este microorganismo presenta una homología de 65,8% con *Lb paracasei*.

Como resultado de la secuenciación del gen que codifica para la pheS, los microorganismos CIDCA 83120, CIDCA 83123 y CIDCA 8339 mostraron homologías cercanas al 100 % con ambas subespecies de *Lb paracasei*. Naser *et al* (2007) señala que esta metodología puede ser utilizada para separar este grupo a nivel especie.

Tabla 8: Crecimiento en leche, producción de gas a partir de glucosa e identificación de los aislados CIDCA 83120, CIDCA 83121, CIDCA 83123, CIDCA 83124 Y CIDCA 8339 pertenecientes al **grupo I** de morfología de colonia mediante perfil de proteínas totales por SDS-PAGE, rep PCR (GTG)5' y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y pheS.

| Aislado | Crecimiento en leche | Gas de glucosa | SDS-PAGE | Secuenciación ARNr 16S | rep PCR (GTG) 5' | pheS |
|---------|----------------------|----------------|---------------------------|---|---------------------|---|
| 83120 | + | - | <i>Lb casei/paracasei</i> | <i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 95% | <i>Lb paracasei</i> | <i>Lb paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 99.5% / <i>L paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> 99,2% |
| 83121 | + | - | <i>Lb casei/paracasei</i> | <i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 95% | <i>Lb paracasei</i> | nd |
| 83123 | + | - | <i>Lb casei/paracasei</i> | <i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 97% | <i>Lb paracasei</i> | <i>Lb paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 99.5% / <i>L paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> 99,2% |
| 83124 | + | - | <i>Lb casei/paracasei</i> | <i>Lb casei/paracasei/rhamnosus</i> 99% | <i>Lb paracasei</i> | nd |
| 8339 | + | - | <i>Lb casei/paracasei</i> | <i>Lb casei, paracasei, rhamnosus</i> 100% | <i>Lb paracasei</i> | <i>Lb paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 100% |

Los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE, secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S y rep PCR (GTG 5') nos permitieron determinar que estos microorganismos pertenecen al grupo *Lb casei*, no obstante, no se pudo determinar de manera inequívoca si los aislados son *Lb casei* o *Lb paracasei*. Estas dos especies están íntimamente relacionadas y aún existe controversia sobre la clasificación taxonómica de los integrantes de este grupo. Sin embargo, Naser *et al* (2007), mostró que la secuenciación del gen que codifica para la pheS es una metodología que presenta un alto poder discriminatorio entre los microorganismos de este grupo. Por lo tanto,

y en base a los resultados obtenidos por esta metodología los aislados fueron identificados como *Lb paracasei*.

Grupos II y III

El grupo II de morfología de colonia está constituido por los microorganismos CIDCA 83101, CIDCA 8381 y 83125 y el grupo III está formado por CIDCA 8385, CIDCA 83102 y CIDCA 830111. Ambos grupos resultaron diferentes en su morfología de colonia pero similares en los demás resultados obtenidos; debido a esto fueron analizados conjuntamente.

Estos microorganismos son Gram positivos, catalasa negativos, producen gas a partir de glucosa y no tienen la capacidad para crecer en leche.

Los perfiles de proteínas de los aislados, analizado mediante SDS-PAGE, mostraron el porcentaje de similitud más elevado con la cepa de referencia *Lb kefir*. Excepto el perfil proteico del aislado CIDCA 830111 que presento mayor similitud con la cepa *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* de referencia.

Los resultados de secuenciación del ARNr 16S mostraron que los microorganismos CIDCA 8385, CIDCA 83102, CIDCA 830111, CIDCA 83101 y CIDCA 8381 tienen altos porcentajes de similitud con *Lb kefir* y el aislado CIDCA 83125 tiene una similitud del 100% con *Lb parakefir*.

Los resultados de rep-PCR(GTG)^{5'} mostraron que los microorganismos CIDCA 8385, CIDCA 83102, CIDCA 830111 y CIDCA 8381 agruparon con varias cepas de *Lb kefir* presente en la base de datos de LMU-Gent. En cuanto a los microorganismos CIDCA 83125 y CIDCA 83101 agruparon con *Lb parakefir* de la misma base de datos.

Los resultados de la secuenciación del gen que codifica para la pheS mostró una similitud de 100% entre el aislado CIDCA 83101 y *Lb parakefir*

y el mismo porcentaje de similitud entre los microorganismos CIDCA 8381 y CIDCA 8385 y *Lb kefir* (Tabla 9).

Tabla 9: Crecimiento en leche, producción de gas a partir de glucosa e identificación de los aislados CIDCA 83125, CIDCA 8381, CIDCA 83101, CIDCA 8385, CIDCA 83102, CIDCA 83011 pertenecientes al grupo **Grupo II y III** de morfología de colonia mediante perfil de proteínas por SDS-PAGE, rep PCR (GTG)5' y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y pheS .

| Aislado | Crecimiento en leche | Gas de glucosa | SDS-PAGE | Secuenciación ARNr 16S | rep PCR (GTG) 5' | pheS |
|---------|----------------------|----------------|---|---|---------------------|--------------------------|
| 83125 | - | + | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb parakefir</i> 100% | <i>Lb parakefir</i> | nd |
| 8381 | - | + | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir</i> 100% | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb kefir</i> 100% |
| 83101 | - | + | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb buchneri/sunki/kefir/otakiensis</i> 100% | <i>Lb parakefir</i> | <i>Lb parakefir</i> 100% |
| 8385 | - | + | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir</i> 100% | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb kefir</i> 100% |
| 83102 | - | + | <i>Lb kefir</i> | <i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir/ otakiensis</i> 96 % | <i>Lb kefir</i> | nd |
| 830111 | - | + | <i>Lb kefir</i> <i>kefir</i> <i>anofaciens</i> subsp <i>kefir</i> <i>anofaciens</i> | <i>Lb buchneri/sunkii</i> / <i>kefir/ otakiensis</i> 98% | <i>Lb kefir</i> | nd |

En trabajos previos ya se había aislado cepas de *Lactobacillus kefir* y de *Lactobacillus parakefir* a partir de gránulos de kefir. La identificación de estos microorganismos se llevó a cabo teniendo en cuenta la fermentación de azúcares, crecimiento a 15 y 45 °C, la producción de gas de glucosa y su perfil de proteínas de célula entera (Garrote *et al.*, 2001), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (Bosch *et al.*, 2006) y análisis de perfiles de enzimas de restricción de amplicones del ADNr 16 S y *Random*

Amplified Polymorphic ADN (RAPD-PCR) (Delfederico *et al.*, 2005). Esta última metodología permitió discriminar a *Lb kefir* inclusive a nivel de cepas utilizó análisis mediante para diferenciar microorganismos de *Lb kefir* (Delfederico *et al.*, 2005).

Sin embargo, no se han encontrado datos de la aplicación de las metodologías usadas en este trabajo para la diferenciación entre *Lb kefir* y *Lb parakefir*.

Para la identificación de *Lb kefir* y *Lb parakefir* mediante pruebas bioquímicas y FTIR fue necesario discriminar previamente a los microorganismos en homofermentativos y heterofermentativos. Cabe señalar que por los métodos planteados en el presente trabajo de tesis no fue necesario discriminar previamente a los microorganismos por su capacidad de producir gas de glucosa para poder agruparlos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los distintos métodos los aislados CIDCA 8381, CIDCA 8385 y CIDCA 83102 fueron identificados como *Lb kefir* con todas las metodologías empleadas, por lo tanto fueron identificados como tales. Los aislados CIDCA 83101 y CIDCA 83125 mostraron resultados diferentes según la metodología utilizada por lo tanto fueron definidos como miembros del grupo *Lb buchneri*. El aislado CIDCA 830111 fue identificado como *Lactobacillus kefir*, descartándose los resultados obtenidos por SDS-PAGE debido a que produce gas a partir de glucosa.

Grupos IV y V

Los microorganismos constituyentes de estos grupos son: CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83103. Todos son bacilos Gram positivos, no productores de gas a partir de glucosa y con capacidad de crecer en leche, excepto el aislado CIDCA 8361 (Tabla 10).

La secuenciación de la región V3 del ARNr 16S de este grupo de microorganismos resulta en porcentajes de similitud superiores al 97 % con *Lb kefiranofaciens* sin diferenciar subespecies. Varios autores concuerdan en que ambas subespecies poseen una semejanza en la secuencia del ADNr 16S del 100% (Vancanneyt *et al.*, 2004; Ninane *et al.*, 2007). Por lo tanto esta metodología nos permite diferenciar a este grupo de microorganismos de otras especies pero no es posible diferenciar las subespecies a las que pertenecen. Los mismos resultados se encuentran mediante el estudio de la secuencia de la porción α de la pheS.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de los perfiles encontrados por rep-PCR (GTG)_{5'} no permitieron diferenciar ambas subsp de *Lb kefiranofaciens*. Los aislados CIDCA 83119, CIDCA 83311 y CIDCA 83122 mostraron un bajo número de bandas en sus perfiles con esta metodología, por tal razón los resultados obtenidos para estos microorganismos fueron descartados en el análisis.

El análisis numérico de los perfiles de proteínas totales mostró que estos aislados presentaron los mayores porcentajes de homología con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (superiores al 90 %) y porcentajes menores con *Lb kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (inferiores al 80%). Vancanneyt *et al.* (2004), también utilizó esta metodología para diferenciar ambas subespecies de *Lb kefiranofaciens* obteniendo resultados positivos.

Tabla 10: Crecimiento en leche, producción de gas a partir de glucosa e identificación de los aislados CIDCA 83118, CIDCA 83119, CIDCA 83122, CIDCA 83211, CIDCA 83212, CIDCA 83310, CIDCA 83311, CIDCA 8352, CIDCA 8361, CIDCA 8371, CIDCA 83103 pertenecientes a los grupos **Grupo IV y V** de morfología de colonia mediante perfil de proteínas por SDS-PAGE, rep PCR (GTG)5' y secuenciación de los genes que codifican para el ARNr 16S y pheS.

| Aislado | Crecimiento en leche | Gas de glucosa | SDS-PAGE | Secuenciación ARNr 16S | rep PCR (GTG) 5' | pheS |
|---------|----------------------|----------------|----------------------------------|--|---|--|
| 83118 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% |
| 83119 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 98% | - | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% |
| 83122 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% | - | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/Kefirgranum</i> 100% |
| 83212 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 97% | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens</i> 100% |
| 83310 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% |
| 83211 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | -- | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> | nd |
| 83311 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% | -- | <i>Lb kefiranofaciens kefiranofaciens/Kefirgranum</i> 100% |

| | | | | | | |
|-------|---|---|---|--|---|--|
| 8352 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 99% | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% |
| 8361 | - | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 97% | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% |
| 8371 | + | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 97% | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% |
| 83103 | - | - | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> | <i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens/kefirgranum</i> 100% | nd | nd |

Por lo tanto los resultados de la diferenciación genotípica mediante rep PCR (GTG)^{5'}, secuenciación de la región V3 del ARNr 16S y secuenciación de la porción α de la pheS de este grupo de microorganismos nos permite decir que los 11 aislados corresponden a la especie *Lb kefiranofaciens* y la diferenciación fenotípica, mediante el perfil de proteínas, nos permite diferenciarlos a nivel subespecie, resultando que todos los microorganismos aislados pertenecen a la subespecie *kefiranofaciens*.

Conclusiones

- La composición microbiológica, analizada mediante metodologías independientes de cultivo, de los 9 gránulos de kefir de la colección CIDCA resultó diferente.
- El estudio de las comunidades bacterianas mediante DGGE permite inferir que hay un porcentaje de la comunidad microbiana que está presente en todos los gránulos pero ninguna de las poblaciones es idéntica entre sí.
- La clonación y secuenciación de las bandas presentes en el gel permitió determinar la presencia de *Lb kefiranofaciens* (subsp. *kefirgranum* y subsp. *kefiranofaciens*), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o subsp. *cremoris*, *Lactobacillus kefir*, *Lb parakefir* existiendo otros *Lactobacillus sp* sin diferenciar especie en los gránulos de kefir estudiados.
- Algunos microorganismos encontrados por métodos dependientes del cultivo no están representados en los perfiles DGGE de los gránulos.
- Las bandas cuyas secuencias presentaron alta homología con *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* y/o *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefirgranum* se detectaron en todos los gránulos estudiados.

- Teniendo en cuenta resultados anteriores obtenidos por métodos dependientes de cultivo y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se puede decir que en los gránulos de kefir de la colección CIDCA están presentes los microorganismos *Lb plantarum*, *Lb kefir*, *Lb parakefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y subsp. *diacetylactis*, *Acetobacter*, *Leuconostoc mesenteroide* y *Lb kefiranofaciens*.
- Este método permitió confirmar la presencia de microorganismos de difícil crecimiento o bien no cultivables en condiciones de laboratorio.
- Aplicando las metodologías de aislamiento que incluyen la solubilización del gránulo en agua templada y el uso de medios selectivos se obtuvieron 22 lactobacilos Gram +, catalasa – que se pudieron agrupar de acuerdo a la morfología de colonia en 5 grupos.
- La identificación de los aislados mediante la evaluación de la producción de gas a partir de glucosa, perfil de proteínas de célula entera glucosa, rep PCR(GTG)5' y la secuenciación del gen de la pheS permitió identificar a los 22 lactobacilos.
- De los 22 microorganismos aislados en este trabajo de tesis 11 resultaron ser *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens*, 5 *Lactobacillus paracasei*, 4 *Lactobacillus kefir* y 2 resultaron pertenecientes al grupo *Lactobacillus buchneri*.
- Las metodologías utilizadas en este trabajo resultaron satisfactorias para el aislamiento de *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp *kefiranofaciens* de gránulos de kefir de la colección CIDCA

