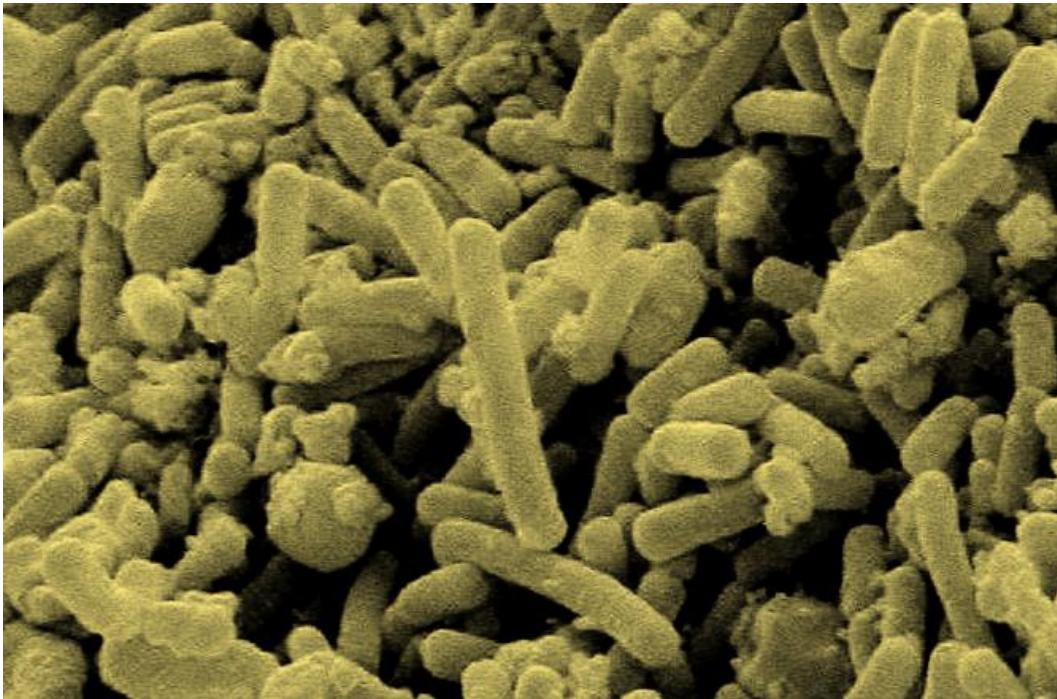


Materiales y Métodos



Material es y Métodos

1.- Medios de cultivo

Leche: Se utilizó leche descremada estéril (UHT) (Sancor, Santa Fe, Argentina).

Caldo MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, 1960): Se utilizó caldo MRS Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) con la siguiente composición:

Peptona universal.....	10 g/l
Extracto de carne.....	5 g/l
Extracto de levadura.....	5 g/l
D(+)glucosa.....	20 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Tween 80.....	1 g/l
Citrato acido de amonio.....	2 g/l
Acetato de sodio.....	5 g/l
MgSO ₄	0,1 g/l
MnSO ₄	0,05 g/l
pH final: 6,5	

Caldo MRS pH 5: Caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960) llevado a pH 5 con una solución diluida de HCl.

Agar MRS: (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960): Caldo MRS adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 15 g/L.

Agar MRS pH 5: Caldo MRS pH 5 adicionado con agar (Parafarm, Argentina) en concentración 18 g/L.

Caldo LB: composición:

Triptona.....10 g/l

Extracto de levadura.....5 g/l

NaCl.....5 g/l

H₂O.....c.s.p. 1 l

pH final: 7.0

Caldo 111: composición:

Triptona.....10 g/l

Extracto de levadura.....10 g/l

Lactosa.....10 g/l

H₂O..... c.s.p. 1 l

pH final: 6,5

2.- Buffers comunes a varias metodologías

Buffer PBS: composición:

KH₂PO₄ 0,144 g/l

NaCl.....9,0 g/l

Na₂HPO₄..... 0,795 g/l

H₂O.....c.s.p. 1 l

Buffer TAE 50x: composición:

Tris-base242 g/l
Acido Acético Glaciar.....0,0571 l
0,5 M EDTA (pH 8.0).....0,1 l
Agua milliQ.c. s. p. 1000 ml
Conservar a 4 °C.

Buffer TE: composición:

Tris-HCl (pH 8.0).....10 mM
EDTA (pH 8.0).....1 mM
pH final: 8.0
Conservar a 4 °C.

3.- Coloración de Gram

Soluciones de trabajo

Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada.

Safranina (solución madre): 25 g/l de etanol etanol.

Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10 en agua destilada.

Lugol: 10 g I₂ + 20 g KI en 1 litro de agua destilada.

Decolorante: etanol-acetona en relación 4:1.

Las soluciones deben ser filtradas antes de ser utilizadas.

Protocolo:

La coloración se llevo a cabo a partir de cultivos frescos de los microorganismos. Se procedió a fijar las muestras a la llama y posteriormente

se aplicaron las soluciones y se realizaron los sucesivos lavados siguiendo el esquema que se detalla a continuación:

Cristal violeta.....	2 min
Lugol.....	30 s
Lugol.....	30 s
Lavar con agua	
Decolorante.....	10 s
Lavar con agua	
Safranina.....	2 min

4.- Gránulos de kéfir utilizados

Se utilizaron nueve gránulos de kefir de leche pertenecientes a la colección CIDCA denominados: CIDCA AGK1, CIDCA AGK2, CIDCA AGK3, CIDCA AGK5, CIDCA AGK6, CIDCA AGK7, CIDCA AGK8, CIDCA AGK10 y CIDCA AGK11.

Los gránulos de kefir fueron conservados a -20° C en leche estéril. Para los experimentos se utilizaron gránulos activos. Con este fin los gránulos fueron reactivados mediante sucesivos repiques en leche descremada estéril (UHT) (Sancor, Santa Fe, Argentina) utilizando una relación de 10 g de gránulo cada 100 ml de leche. Cada subcultivo fue incubado a 20 °C por 24 h y posteriormente separado mecánicamente, por filtración, del producto fermentado. Previo a cada subcultivo los gránulos fueron lavados con agua destilada.

5.- Microorganismos de referencia. Condiciones de cultivo

En la Tabla 1 se detallan los microorganismos pertenecientes a colecciones internacionales utilizados en este trabajo de tesis y sus respectivas condiciones de cultivo.

Las condiciones de anaerobiosis necesarias para el cultivo de algunos microorganismos se obtuvieron utilizando el kit comercial AnaeroPack-Anaero (Mitsubishi Gas Chemical CO, Inc. Tokyo, Japan).

Tabla 1: Microorganismos de referencia con sus respectivas condiciones de cultivo.

Microorganismo	Condiciones de Cultivo	Colección
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	Anaerobiosis, MRS pH5, 30°C, 7 días	^a JCM 6985
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	Anaerobiosis, MRS pH5, 30°C, 7 días	^b DSMZ 5016
<i>Lb kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	Anaerobiosis, MRS pH5, 30°C, 7 días	^d LMG 15132
<i>Lb plantarum</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 24 horas	^b DSMZ 20174
<i>Lb parakefir</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 48 horas	^b DSMZ 8328
<i>Lb casei</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 48 horas	^b DSMZ 20011
<i>Lb acidophilus</i>	Aerobiosis, MRS, 37 °C, 48 horas	^c ATCC 314
<i>Lb brevis</i>	Aerobiosis, MRS, 30 °C, 48 horas	^c ATCC 8287
<i>Lb kefir</i>	Aerobiosis, MRS, 37 °C, 48 horas	^a JCM 5818

^a JCM: Japan Collection of Microorganisms (Reiken, Japón);

^b DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig Alemania);

^c ATCC: American Type Culture Collection (Manassas, Estados Unidos de América);

^d BCCM/LMG: Belgium Co-ordinated Collection of Micro-organism, Ghent, Bélgica).

6.- Microorganismos de la colección CIDCA. Condiciones de cultivo.

Se utilizaron microorganismos aislados de gránulos de kefir y de fermentos artesanales pertenecientes a la colección CIDCA. En la Tabla 2 se detallan dichos microorganismos y las condiciones de cultivo empleadas.

Tabla 2: Condiciones de cultivo utilizadas para microorganismos de la colección CIDCA (Centro de Investigación en Desarrollo y Criotecnología de Alimentos, La Plata, Argentina).

Especie	Nombre	Condiciones de cultivo
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CIDCA 8312, CIDCA 8313, CIDCA 8316, CIDCA 8318, CIDCA 8321, CIDCA 8323, CIDCA 8324, CIDCA 8327, CIDCA 8329, CIDCA 8331, CIDCA 8333, CIDCA 8334, CIDCA 8336, CIDCA 8337, CIDCA 8338, CIDCA 8342, CIDCA 8346, CIDCA 8349, CIDCA 83112, CIDCA 83114, CIDCA 83210	Medio MRS / 30 °C / Aerobiosis / 24 horas
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	CIDCA 332, CIDCA 333	Medio MRS / 37 °C / Aerobiosis / 8 horas
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CIDCA 8211, CIDCA 8212, CIDCA 8213, CIDCA 8224, CIDCA 8225, CIDCA 8226, CIDCA 8229, CIDCA 8231, CIDCA 8232, CIDCA 8233, CIDCA 8242, CIDCA 8243, CIDCA 8244, CIDCA 8245, CIDCA 8247, CIDCA 8248, CIDCA 8249, CIDCA 82212, CIDCA 82210, CIDCA 8221, CIDCA 8241, CIDCA 8214	Medio 111 / 30 °C / Aerobiosis / 24 horas

7.- Metodologías para el aislamiento de microorganismos a partir de gránulos de kefir.

7.1.- Disgregación de gránulos

Se realizaron aislamientos a partir de los 9 gránulos de kefir activos pertenecientes a la colección CIDCA mencionados en el inciso 4 de Materiales y Métodos.

Con el objetivo de facilitar la liberación de los microorganismos de la matriz de polisacáridos y proteínas en la cual se encuentran, se utilizaron tres procedimientos distintos. El **procedimiento 1** consistió en resuspender 1 g de

gránulo en 5 ml de agua destilada estéril e incubar la suspensión durante 60 minutos en un baño termostático a 40 °C. El **procedimiento 2** se basó en el mismo principio que el anterior pero, luego de la disolución del gránulo en agua, se procedió a homogeneizar mecánicamente (Ultraturrax) para lograr la desintegración completa de la estructura del gránulo. Finalmente, en el **procedimiento 3** se procedió a congelar 1 g de gránulo en nitrógeno líquido (- 196 °C), disgregarlo en mortero y disolverlo en 5 ml de agua destilada.

7.2.- Cultivo y selección de microorganismos

Se tomaron alícuotas de 100 µl de las suspensiones obtenidas mediante cada uno de los procedimientos descritos en el punto anterior y se adicionaron a tubos con 5 ml de medio de cultivo líquido selectivo (Caldo MRS pH 5.0). Seguidamente, los tubos fueron incubados a 30 °C durante 7 días en atmósfera anaerobia. Los cultivos resultantes se emplearon para hacer estrías en placas conteniendo medio de cultivo sólido selectivo (agar MRS pH 5.0) que fueron incubadas en las mismas condiciones que los tubos.

Luego de la incubación se escogieron de las placas colonias con distintas morfologías. Cada una de ellas fue repicada mediante estrías a otra placa con el mismo medio de cultivo y crecida en idénticas condiciones. Este procedimiento se repitió sucesivas veces hasta asegurar obtener colonias que provengan de un único microorganismo (método de aislamiento por estrías). La pureza de los cultivos fue constatada mediante la observación microscópica de las muestras. Los aislados bacterianos puros se almacenaron utilizando leche como crioprotector a -80 °C.

8.- Reacción de la catalasa

La prueba se realizó a partir cultivos líquidos frescos de los microorganismos. Para determinar la presencia de esta enzima en la célula se

agregó sobre un portaobjeto una gota de agua oxigenada y sobre ésta una gota del cultivo a ensayar. El ensayo se consideró positivo cuando se observó la formación de burbujas de oxígeno.

9.- Producción de gas a partir de glucosa (10 g/l).

Los microorganismos fueron inoculados en tubos conteniendo caldo MRS con campana de Durham. Los mismos, fueron incubados en las condiciones descritas en las Tablas 1 y 2 de Materiales y Métodos a menos que se indique lo contrario. La presencia de una burbuja retenida en la campana indicó la producción de gas a partir de la glucosa presente en el medio.

10.- Capacidad de fermentar la leche

Los microorganismos fueron sembrados en leche estéril en una relación de 0,1 ml de cultivo cada 10 ml de leche y se incubaron a 30 °C en atmósfera anaerobia durante 7 días. Pasado este periodo se determinó la capacidad de fermentar la leche mediante observación de formación de coágulo y medida del pH resultante.

11.- Perfil de proteínas de célula entera por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Soluciones de trabajo

Solución de acrilamida -bisacrilamida (N-N´metilen-bisacrilamida)

Acrilamida.....30,0 g
Bisacrilamida.....0,8 g
Agua bidestilada.....c.s.p 100 ml

Para preparar esta solución se procedió a disolver los sólidos en 70 ml de agua bidestilada, filtrarlos y luego completar el volumen de 100 ml con agua bidestilada. La solución se conservó en heladera en frasco color caramelo para preservarla de la luz. Para preparar la solución se utilizaron guantes y barbijo.

Buffer de corrida (5X)

Glicina.....72,0 g
Tris base.....15,0 g
SDS.....5,0 g
H₂O bidestilada.....c.s.p. 1 l
Llevar a pH 8,3 con HCl .

Buffer gel separador (4X)

SDS.....0,6 g
Tris base.....27,2 g
TEMED 0,6 ml
H₂O bidestilada.....c.s.p. 150 ml
Llevar a pH 8,8 con HCl.

Buffer gel apilador (4X)

SDS.....0,4 g
Tris base.....6,0 g
TEMED.....0,4 ml
H₂O bidestilada.....c.s.p.100 ml
Llevar a pH 6,8 con HCl.

Buffer de muestra

Buffer apilador.....	4,0 ml
SDS.....	0,16 g
Glicerol	4.0 ml
β -mercaptoetanol.....	5 %
Azul de bromofenol.....	2 mg

Solución colorante y fijadora

Disolver 1,92 g de Coomassie R en 400 ml de metanol. Adicionar 160 ml de ácido acético y 400 ml de agua. Agitar bien y filtrar.

Solución Decolorante

Metanol o etanol.....	250 ml
Acido acético.....	100 ml
Agua destilada.....	650 ml

Protocolo

Para la obtención de los extractos celulares las bacterias fueron cultivadas en medio líquido hasta fase estacionaria en sus respectivas condiciones de cultivo (Tabla 3). Seguidamente fueron cosechadas por centrifugación (10.000 g, 10 min) y el *pellet* resultante fue lavado dos veces y resuspendido en cantidad suficiente de *buffer* PBS como para alcanzar DO₅₅₀: 20.

Se separaron alícuotas de 100 μ l de las soluciones bacterianas obtenidas y se les adicionó 6 μ l de solución de lisozima (Sigma Co., St.Louis, USA) en concentración 10 mg/ml. Luego fueron incubadas durante 3 horas a una temperatura de 37 °C. Finalizado el tiempo de incubación se agregaron 10 μ l de una solución de SDS (20 % p/v) a cada una y se las llevó a ebullición durante 2

minutos. Finalmente, cada solución fue adicionada de un volumen igual de *buffer* de muestra con β -mercaptoetanol y se las llevó a ebullición durante 2 minutos.

Los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE según el método de Laemmli (1970) en geles de 9 x 8 x 0,1 cm, disociantes y continuos. Se utilizó una concentración de 12,8 % p/v de acrilamida en el gel separador y 4 % p/v en el gel apilador. La preparación de las soluciones de acrilamida para cada uno de los geles se detalla en la Tabla 3. El equipo utilizado fue un sistema vertical Bio- Rad Mini Protean II (Bio Rad Lab, C.A.). La siembra se realizó con jeringa Hamilton, los volúmenes de siembra variaron entre 15 y 20 μ l. La corrida electroforética se llevó a cabo a 120 V.

Tabla 3: Volúmenes necesarios de cada reactivo para preparar un gel con separadores de 1mm de espesor.

Reactivos	Gel Separador 12,8 %	Gel Apilador 4 %
<i>Buffer</i> gel separador	1,25 ml	--
<i>Buffer</i> gel apilador	--	875 μ l
Agua destilada	3,25 ml	980 μ l
Glicerol	--	980 μ l
Acrilamida-bis 30,8%	4,25 ml	455 μ l
Persulfato de amonio 10%*	70 μ l	45 μ l

* agregar inmediatamente antes de cargar las placas

Para la tinción se introdujo el gel en la solución colorante y fijadora por un periodo de 2 horas con agitación. Pasado éste tiempo se colocaron en solución decolorante hasta observar las bandas nítidamente. Los geles se conservaron en agua destilada con una gota de ácido acético.

Para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en las diferentes muestras se incluyó en una de las calles del gel un patrón de proteínas de peso molecular conocido. Se emplearon patrones de bajo peso

molecular (Sigma) conteniendo: fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y lactalbúmina (14,4 kDa).

Los geles proteicos fueron escaneados y la imagen fue analizada. Los perfiles obtenidos fueron comparados estadísticamente utilizando el programa SYSTAT 12.

12.- Obtención de ADN genómico de bacterias presentes en gránulos de kefir.

Soluciones de trabajo

Buffer liticosa

Sorbitol.....0,9 M
Tris-HCl pH 8.....0,1 M
EDTA.....0,1 M

Buffer lisozima

Tris-HCl.....50 mM
EDTA.....5 mM
Sacarosa.....50 g/l
pH final: 8

Protocolo

Se colocó 1 g de gránulo de kefir seco en 20 ml de agua destilada estéril y la suspensión se mantuvo a 100 °C en un baño termostático. Las células fueron luego separadas por centrifugación (15 min a 15.000 g) en una centrifuga Sorvall RC-5B plus (Sorvall Products, L.P. Newtown, CT, USA) y resuspendidas en 10 ml de agua destilada estéril. Este paso de precipitación y disolución se

llevó a cabo dos veces. El *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µl de *buffer* liticosa adicionado de 10 µl de liticosa 2,5 mg/ml (Sigma Chemical, St. Louis, USA) y se incubó a 37 °C por 1 hora en baño termostático. Luego, se agregaron 40 µl de *buffer* lisozima y 40 µl de lisozima 10 mg/ml (Sigma Chemical, St. Louis, USA) y se incubó durante 15 min a una temperatura de 20 °C. El proceso de extracción y purificación se llevó a cabo utilizando un kit comercial AccuPrep Genomic ADN Extraction kit (BIONEER, Korea) de acuerdo al protocolo del proveedor. El ADN obtenido fue almacenado hasta su uso a -20 °C en *eppendorf* libres de ADN.

13.- Obtención de ADN genómico a partir de bacterias aisladas.

Soluciones de trabajo

Buffer TES

Tris-base50 mM

EDTA.....1 mM

Sacarosa.....6,7 %

pH final: 8.0

Filtrado, esterilizado y conservado a temperatura ambiente.

Buffer STET

Tris-base50 mM

EDTA.....50 mM

Sacarosa.....8 %

Triton-X-1005 %

pH final: 8.0

Filtrado, esterilizado y conservado a temperatura ambiente.

Ribonucleasa A (ARNsa)

ARNsa200 mg
NaCl0,8766 g
Agua milliQ.....c. s. p. 100 ml
pH final: 5.0
Almacenado a -20 °C.

Buffer RS

NaCl..... 0,15 M
EDTA (pH 8.0).....0,1 M

Solución de lisozima/ mutanolisina

Lisozima 3 ng
Mutanolisina 5000 U ml⁻¹ (Sigma).....30 µl
Buffer TES.....62,5 µl
Proteinquinasa K12,5 µl

Protocolo

Los microorganismos fueron crecidos en medio líquido, en sus respectivas condiciones de cultivo, hasta fase estacionaria. Luego, se extrajo el ADN genómico utilizando un kit comercial (AccuPrep Genomic ADN Extraction kit, BIONEER, Korea) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El ADN obtenido fue almacenado hasta su utilización a -20 °C en *eppendorf* libres de ADN.

Cuando el ADN se obtuvo a partir de los microorganismos desarrollados en medio sólido las células fueron sembradas en placa y crecidas en sus respectivas condiciones de cultivo. Luego fueron recolectadas con ansa y la masa celular obtenida fue resuspendida en 1 ml de *buffer* RS. Esta solución fue

centrifugada a 4 °C durante 2 minutos a 8.000 g y el *pellet* se congeló a -20 °C por un periodo mínimo de 1 hora (tiempo máximo: 1 semana). Una vez descongelado el *pellet* se resuspendió en 1 ml de *buffer* TES, se centrifugó (2 min, 8.000 g, 4 °C) y se descartó el sobrenadante. Para la lisis se procedió a resuspender el *pellet* obtenido en 275 µl de *buffer* STET. Luego, se agregaron 105 µl de solución recién preparada de lisozima-mutanolisina y se incubó a 37 °C durante 60 min. Concluido dicho período de incubación se adicionaron 40 µl de SDS 20 % p/v en *buffer* TE termostatzado a 37 °C y se le agregaron perlas de vidrio. Se agitó en *vortex* dos veces durante 10 s. Finalmente, se realizaron dos incubaciones sucesivas de 10 min cada una, a 37 °C y 65 °C respectivamente. Una vez finalizada la lisis se procedió a purificar las muestras. Para ello se adicionó a cada muestra 100 µl de *buffer* TE y se transfirió el contenido a un tubo *ependorf phase-lock gel* (Heavy 2 ml-200, 5 prime GmbH, mat: 2900309). Se agregaron bajo campana 515 µl de fenol/cloroformo/isoamliialcohol (24:24:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó (5 min, 10.000 g a temperatura ambiente). Cuando la fase superior no se observó completamente clara, se repitió la extracción agregando 500 µl de fenol/cloroformo/isoamliialcohol. La parte superior fue separada con micropipeta y transvasada a un tubo *ependorf*. Para precipitar el ADN purificado se agregó a cada tubo 70 µl de NaCl 5 M y 0,5 ml de isopropanol. Los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 15 min, se agitaron hasta hacer visible el ADN en forma de nube blanquecina y se centrifugó 30 min, 11.000 g, 4 °C. Al *pellet* obtenido se le adicionaron 500 µl de etanol 70 % a 4 °C y se centrifugó durante 5 min a 11.000 g y temperatura ambiente. Los tubos se dejaron abiertos bajo una lámpara para el secado por evaporación del etanol. Posteriormente se adicionaron 100 µl de una dilución 1/10 de *buffer* TE y 5 µl de ARNasa 10 mg/ml y se incubó a 37 °C durante 10 min. El ADN obtenido se conservó a 4 °C.

14.- Obtención de ADN a partir de contenido intestinal y materia fecal

Quinientos miligramos (500 mg) de contenido intestinal/materia fecal fueron colocados en 1 ml de *buffer* PBS. A partir de dicha suspensión se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando un kit comercial específico para este tipo de muestra (AccuPrep Stool ADN Extraction kit, BIONEER, Korea)). Para ello se siguieron las instrucciones descritas por el proveedor. El ADN obtenido se almacenó en *ependorf* libres de ADN a - 20 °C hasta su uso.

15.- Determinación de la concentración de ADN

La concentración y calidad del ADN fue determinada por medida de la absorbancia a 260, 280 y 234 nm, usando un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific Nano Drop 2000 spectrofotometer, USA).

Se determinaron las absorbancia de soluciones diluidas (1/10 a 1/100 a partir de la solución stock) asignando las mismas del siguiente modo: A_{234} a péptidos y aminoácidos aromáticos, A_{260} a ADN y ARN y A_{280} a proteínas y ARN. Se consideró puro al ADN si la relación $A_{260/280}$ presentó valores entre 1,8 y 2,2

Para calcular la concentración de la solución stock se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{l ml}^{-1} = A_{260} \times 5.000$$

La solución de trabajo se preparó a una concentración de 50 ng μl^{-1} y se almacenó a -20 °C.

16.- Amplificación del ADNr 16S

Se amplificó la región V3 del gen que codifica para el ARNr 16S, utilizando los oligonucleótidos sintéticos 518R/341F-GC, BIF164F/BIF662-GC,

LAC1/LAC2-GC (Invitrogen, USA), cuyas secuencias nucleotídicas se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencia nucleotídica y referencias de los oligonucleótidos 518R/341F-GC, BIF 164F/ BIF662-GC, LAC1/LAC2-GC.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Referencia
518R/341F-GC	518R (5'ATTACCGCGGCTGCTGG- 3') 341F (5VCCTACGGGAGGCAGCAG- 3V) con 5' GC (5' CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGG GGG- 3')	193 p b	Muyzer <i>et al., 1993</i>
BIF164F/BIF 662-GC	BIF164F (5'GGGTGGTAATGCCGGATG-3') BIF662(5VCCACCGTTACACCGGAA-3')con 5' GC (5'- CGCCCCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGG GG- 3')	523 p b	Satokari <i>et al., 2001</i>
LAC1/LAC2-GC	LAC1 (5'AGCAGTAGGGAATCTTCA- 3') LAC2 (5'ATTYCACCGCTACACATG- 3') con 5' GC (5'CGCCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCG GGG- 3')	327 p b	Walter <i>et al., 2000</i>

Para la amplificación se procedió a preparar una mezcla inicial de reacción o *premix* que consta de los reactivos básicos necesarios para la amplificación. En la Tabla 5 se presentan, a modo de ejemplo, los reactivos necesarios para realizar la amplificación de una muestra con un volumen final de 50 µl. Los volúmenes varían según el número de muestras y el volumen final deseado. Tanto para la preparación del material como para la manipulación se utilizaron guantes con el objetivo de proteger a la muestra de enzimas que degradan el ADN o de la contaminación con material extraño.

Tabla 5: Mezcla de reacción (*premix*) necesaria para amplificar un volumen final de 50 microlitros.

Premix	Volumen (μl) para un total de 50 μl
Buffer Taq 10 x (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	5
MgCl ₂ (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	5
dNTP's (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	5
Oligonucleótidos sintéticos (Invitrogen, USA)	2,5 μ l de cada uno
Taq polimerasa (Inbio -Highway, Tandil, Argentina)	0,25
Agua miliQ	26,42

En el caso de la amplificación de ADN proveniente de materia fecal con los oligonucleótidos LAC1/LAC2-GC y BIF164F/BIF662-GC, se duplicó la concentración de enzima polimerasa utilizada.

La mezcla de reacción se mantuvo en baño de hielo para conservar la actividad de la enzima polimerasa. Luego se fraccionó en tubos *ependorf* y se adicionó a cada uno de ellos el ADN molde que se deseaba amplificar. La cantidad de ADN molde utilizado varió según el origen. Para la amplificación de ADN proveniente de microorganismos aislados se utilizó 1 μ l de ADN molde; para amplificar el ADN proveniente de gránulo de kefir y de materia fecal se utilizaron 3 μ l de ADN molde.

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) programado previamente con las temperaturas adecuadas a cada par de oligonucleótido. Los programas utilizados para cada par de oligonucleótidos ensayados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones impuestas al termociclador para la amplificación de la región V3 del ADNr 16S con los pares de oligonucleótidos sintéticos 518R-341F-GC; BIF164F/BIF662-GC; LAC1/LAC 2-GC.

Oligonucleótido sintético 518R/341F-GC			
Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
94	5 min	1	Desnaturalización inicial
94	30 s	30	Desnaturalización
60	60 s		<i>Annealing</i>
72	30 s		Extensión
72	5 min	1	Extensión final
Oligonucleótido sintético BIF164F/BIF662-GC			
Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
98	5 min	1	Desnaturalización inicial
94	45 s	40	Desnaturalización
52	50 s		<i>Annealing</i>
72	50 s		Extensión
72	7 min	1	Extensión final
Oligonucleótido sintético LAC1/LAC2-GC			
Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
94	2 min	1	Desnaturalización inicial
94	30 s	35	Desnaturalización
61	60 s		<i>Annealing</i>
68	60 s		Extensión
68	7 min	1	Extensión final

Los amplicones obtenidos se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

17.- Electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

Los amplicones evaluados mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (*denaturing gradient gel electrophoresis*: DGGE) fueron los obtenidos por amplificación de un ADN molde con oligonucleótidos ricos en GC.

Soluciones de trabajo

Solución de Acrilamida-Bisacrilamida 40%

Acrilamida.....38,93 g

Bisacrilamida.....1,07 g

Agua destilada.....c.s.p 100 ml

Filtrada a través de un filtro de 0,45 μm y conservada a 4 °C.

Buffer muestra

Azul de bromofenol 2%.....0,25 ml

Xileno cianol 2%0,25 ml

Glicerol 100%.....7,00 ml

Agua destilada.....2,50 ml

Solución de teñido

Sybr Gold (Invitrogen).....30 μl

Buffer TAE.....300 μl .

Preparada en el momento de ser utilizada y conservada al reparo de la luz.

Gel apilador

Acrilamida/Bisacrilamida 40%	5 ml
Temed.....	5 μ l
Persulfato de amonio 10%.....	5 μ l

Gel separador

El gel separador contiene 8% de acrilamida y se prepara a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida 40%. Para preparar la solución 80% de agente desnaturante (80%) se le agrega urea y formamida de acuerdo al protocolo que se detalla en la Tabla 7

Tabla 7: Composición de las soluciones 0 y 80 % desnaturizantes necesaria

Reactivos	Solución 0% desnaturizante	Solución 80% desnaturizante
Acrilamida-Bis 40%	20 ml	20 ml
Buffer TAE 50X	2 ml	2 ml
Urea	-	33,6 g
Formamida deionizada	-	32 ml
Agua destilada	c.s.p 100 ml	c.s.p 100 ml

A partir de estas soluciones se preparan los gradientes que se requieren para cada gel.

Protocolo:

Para el armado de los geles se utilizaron dos vidrios perfectamente limpios y secos, uno pequeño y uno grande. El vidrio grande se recubrió con una goma y se colocaron separadores en la parte interior del vidrio tratando de minimizar el espacio que los separa. Los separadores fueron previamente embebidos en grasa con el objetivo de disminuir efectos provocados por la corriente y que deforman el gel (*smile*). Luego, se colocó el vidrio pequeño

sobre el vidrio grande y ambos se ajustaron con seis broches. Se constató que el sistema no tenga pérdidas introduciendo agua en el mismo. Luego se vació y escurrió sobre papel de filtro.

En la Tabla 8 se presentan a modo de ejemplo, los volúmenes de las soluciones desnaturizantes 0 y 80 % necesarios para obtener soluciones desnaturizantes 40, 45, 60 y 65 %. Una vez combinadas las soluciones, e inmediatamente antes de comenzar a formar el gradiente, se les adicionó 4,4 µl de Temed y 44 µl de persulfato de amonio 10 % y se agitó. Luego se procedió a la formación de los geles en gradiente.

Tabla 8: Volúmenes de las soluciones desnaturizantes 0 y 80 % necesarios para obtener soluciones desnaturizantes 40, 45, 60 y 65 % de urea/formamida.

Concentración desnaturizante (%)	Solución desnaturizante* (ml)	0%	Solución desnaturizante* (ml)	80%
40	5,75		5,75	
60	2,87		8,63	
65	2,2		9,3	

*Volúmenes necesarios para la preparación de 11,5 ml de cada solución.

El gradiente desnaturizante se formó utilizando un sistema de vasos comunicantes y bomba de vacío. Los vasos comunicantes se colocaron sobre un agitador magnético y se introdujo un buzo magnético en el vaso más cercano al orificio de salida que contendrá la solución de mayor concentración de agente desnaturizante. Se verificó que la comunicación entre los vasos esté cerrada y se introdujeron ambas soluciones. Finalmente se colocó una manguera entre el orificio de salida de los vasos y el espacio entre el sistema de vidrios. Se procedió a encender la bomba de vacío, se abrió la comunicación entre vasos y comenzó a formarse el gel en gradiente. Se emplearon velocidades de formación del gel lo más lentas posible y las mismas fueron constante para los distintos geles de modo tal de lograr reproducibilidad.

Luego, se colocó el peine y se dejó polimerizar. En los casos en que los geles se contrajeron y quedaron espacios vacíos se completó el volumen con gel de apilamiento. Una vez polimerizados, se retiraron los peines y se procedió al montaje de los geles sobre los soportes. El equipo consta de dos soportes con una capacidad de cuatro geles por corrida. Cada uno soporta dos geles que se montan con broches plásticos. Una vez armados los soportes se procedió a liberar la zona de la base del gel quitando la goma contenedora de manera tal que la corriente pueda circular. El sistema se introdujo dentro de la cuba previamente cargada con *buffer* TAE y precalentada a 60 °C. Se encendió el sistema de recirculación de líquido del equipo y se procedió a la siembra de las muestras.

Previo a la siembra las muestras fueron combinadas con un volumen de *buffer* muestra (25 µl de muestra + 5 µl de *buffer* muestra) y luego sembradas con jeringa Hamilton.

El equipo se conectó a una fuente a 100 V de modo que la corriente que pase por cada gel sea de aproximadamente de 35 mA. Las corridas electroforéticas fueron de 16 horas a 60 °C.

Se utilizó un equipo DGGE-2401 C.B.S (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA) (Figure 1) con geles de 15 x 20 x 0,75 cm de tamaño (Figura 1).

Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles fueron incubados en la solución de tñido (*Sybr Gold*, Invitrogen, USA) en oscuridad durante 30 minutos. Las bandas se observaron con luz UV en un transiluminador.

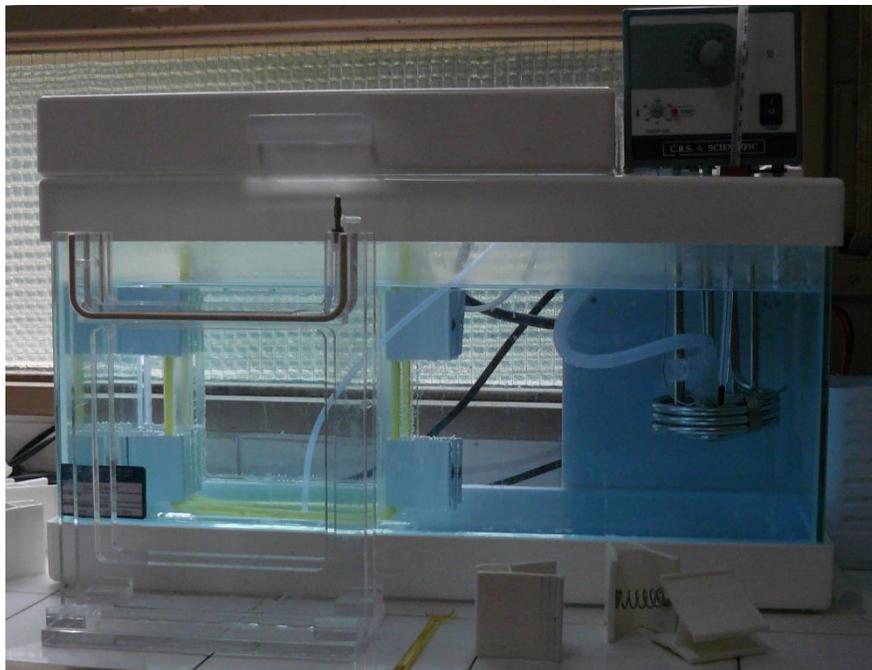


Figura 1: Cuba para electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (C.B.S. Scientific Co., Del Mar, CA, USA)

18.- Secuenciación

Soluciones de trabajo

TSS-2X

PEG 8000.....2 gr

MgCl₂ (1M)..... 0,7 ml

DSMO (dimetilsulfoxido)..... 1 ml

Medio LB estéril..... c.s.p. 10 ml

Filtrada a través de filtro de 0,22 µm. Conservada a -20 °C

Protocolo

Las bandas de interés observadas en los geles de DGGE se cortaron e introdujeron en *ependorf* estériles que contenían 50 µl de *buffer* TE. Para permitir que el ADN difunda del gel hacia el *buffer* los tubos se conservaron

durante toda la noche a 4 °C. Luego, se realizó una amplificación del ADNr 16S, utilizando éste ADN como molde y los oligonucleótidos sintéticos 518R/341F-GC.

Los productos de la amplificación fueron purificados utilizando un kit comercial (Invitrogen, USA).

Para determinar la pureza y estimar la concentración de los amplicones obtenidos, los mismos fueron analizados en un gel de agarosa 1% en el cual también se incluyó un patrón de PM de concentración conocida (Inbio-Highway, Argentina). Por comparación de la intensidad de las bandas obtenidas con las correspondientes al patrón de PM se estimó la concentración del ADN. Para verificar que los amplicones tuvieran el tamaño esperado se compararon en el gel las distancias recorridas por la muestra y el patrón.

Posteriormente se prepararon células competentes de *E coli* utilizando un método químico. Un inóculo inicial de *E coli* en medio LB se incubó a 37 °C durante toda la noche. Luego, 1 ml de este cultivo fue sembrado en 100 ml de medio LB y se cultivó a 37 °C, en agitador orbital (225 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,45-0,55. Luego, el cultivo se colocó en hielo durante 15 min. Se centrifugó (3.000 rpm, 4 °C, 8 min), se descartó el sobrenadante cuidadosamente y el *pellet* fue resuspendido en 5 ml de medio LB más 5 ml de TSS-2X. La solución resultante se incubó en baño de hielo durante 15 a 30 min., se fraccionó en tubos *ependorf* estériles y se congeló empleando N₂ líquido. Las células competentes fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

Para el clonado se utilizó el kit pGEM-T y pGEM-T Easy Vector Systems (Promega Co., USA). La inserción del plásmido y el clonado se llevó a cabo según las instrucciones del proveedor. Las colonias seleccionadas fueron luego enviadas para su secuenciación a Macrogen (Seul, Korea) y las secuencias obtenidas fueron analizadas por comparación con la base de datos del GenBank. Se utilizó el software BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) y se

determinó la similitud de estas secuencias parciales del ADNr 16S con otras secuencias conocidas.

En algunos experimentos se envió a secuenciar directamente las bandas amplificadas y purificadas, sin previa clonación.

19.- Tipificación por rep PCR (GTG)5´

Soluciones de trabajo

Buffer Gitscheir 5X

(NH₄)₂SO₄(Merk).....1 M
Tris pH 8.0.....1 M
MgCl₂1 M
EDTA pH 8.8..... 0,5 M
β-mercaptoetanol.....14.4 M
Conservadas a 4 °C.

Marcadores de referencia

35 µl de PCR ruler (Bio-rad, #170-8206)
28 µl de 500 bp molecular ruler (Bio-rad, #170-8203)
75 µl de *buffer* de muestra
100 µl *buffer* TE

19.1.- Amplificación de secuencias repetidas: rep PCR

La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos sintéticos (GTG)5´ (Tabla 9). Estos oligonucleótidos hibridan con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep) que se encuentran distribuidas en el cromosoma.

Tabla 9: Secuencia nucleotídica del oligonucleótido sintético (GTG)₅'.

Oligonucleótido	Secuencia
(GTG) ₅	5'GTGGTGGTGGTGGTG-3'

La mezcla de reacción se preparó como se detalla en la Tabla 10

Tabla 10: Mezcla de reacción para la amplificación de secuencias repetidas intragénicas.

Reactivo	Cantidad por muestra (μl)
5x Gitschier <i>buffer</i>	5
Seroalbúmina bovina (BSA) (20mg/ml) (Roche)	0,2
Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% (Fluka)	2,5
Agua MiliQ	13,65
dNTP's (25mM) (Pharmacia)	1,25
Oligonucleótido (GTG) ₅ ' 0,3 μg/μl	1
Taq ADN polimerasa (5 U μl ⁻¹ , Red Goldstar, Eurogentec)	0,4

En tubos *epENDORF* estériles se colocaron 24 μl de la mezcla de reacción y 1 μl de ADN molde (50 ng μl⁻¹) Se utilizó el ADN obtenido a partir de medio sólido ya que con este método se obtiene ADN de mejor calidad y en mayor concentración. El programa utilizado en el termociclador se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11: Condiciones fijadas al termociclador para el ensayo de rep PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
95	7 min	1	Desnaturalización inicial
94	1 min	30	Desnaturalización
40	1 min		<i>Annealing</i>
65	8 min		Extensión
65	16 min	1	Extensión final

Los productos PCR que no se utilizaron inmediatamente fueron conservados a

- 20 °C.

19.2.- Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles con un porcentaje de 1,5 % p/v de agarosa en *buffer* TAE. Se utilizó un equipo de electroforesis con un soporte de 20 x 15 cm y peines de 20 posiciones de 1,5 mm de ancho cada una.

Para la preparación del gel se pesaron 2,25 g de agarosa en frasco de vidrio y se le adicionó 150 ml de *buffer* TAE (previamente preparado utilizando material volumétrico y empleando agua MilliQ). A la solución resultante se le determinó el peso y se calentó en microondas hasta disolución completa. Se pesó nuevamente y se corrigió al peso original adicionando agua MilliQ. Esta solución fue termostatzada a 55 °C en un baño y luego se volcó sobre el soporte de electroforesis cubriendo luego el mismo con papel de aluminio para evitar la evaporación. Una vez solidificado se procedió a la siembra de las muestras.

Para la preparación de las muestras se combinaron 25 μl de cada producto PCR con 5 μl de *buffer* de corrida (6x). De cada una de éstas soluciones se tomaron 7,2 μl y se sembraron en las diferentes posiciones del gel

La electroforesis se desarrolló a 4 °C, a un voltaje constante de 55 V durante 960 min. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos por inmersión en solución de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de bromuro de etidio en *buffer* TAE, durante 30 minutos. Luego, los mismos se colocaron durante 10 min en agua MilliQ y se tomó de ellos una imagen digital. Las calles fueron individualizadas y las imágenes resultantes fueron normalizadas utilizando el programa Corel Photo Paint 7.

Los resultados fueron analizados empleando el software Bionumerics v2.5 (Applied Maths, B) utilizando la base de datos LMG de la Universidad de Gent, Belgica (www.belspo.be/bccm).

20.- Secuenciación del gen de la fenilalanina sintasa

20.1.- Amplificación del gen de la fenilalanina sintasa

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes de la fenilalanina sintasa (*pheS*) se detallan en la Tabla 12 (Naser *et al.*, 2005):

Tabla 12: Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de secuenciación del gen de la *pheS*.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-----> 3'
pheS 21 F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC
pheS 22 R	CCWARVCCRAARGCAAARCC
pheS 23 R	GGRTGRACCATVCCNGCHCC

Una solución de ADN molde se llevo a $\text{DO}_{260} = 0,2$ con agua Milli-Q. El ADN utilizado en este ensayo fue obtenido a partir de bacterias crecidas en

medio sólido y su calidad fue previamente constatada según se detalla en el punto 15 de Materiales y Métodos.

En la Tabla 13 se detallan las cantidades de cada reactivo necesarias para la obtención de la mezcla de reacción que se utilizó en la reacción de amplificación.

Tabla 13: Mezcla de reacción utilizada para la amplificación del gen de la pheS.

Reactivo	Cantidad por muestra (µl)
PCR <i>buffer</i> 10X	2,5
Agua MQ	18
dNTP's (2mM)	2,5
oligonucleótido 1(50µM)	0,25
oligonucleótido 2(50µM)	0,25
Taq ADN polimerasa	0,5

En cada tubo *ependorf* estéril se agregaron 24 µl de la mezcla de reacción y 1 µl de ADN (0,2 ng µl⁻¹). La temperatura de *annealing* utilizada en la reacción de amplificación fue de 50 °C. En caso de amplificación negativa se ensayaron, además, las siguientes temperaturas de *annealing*: 42, 46, 55, 60, y 65 °C.

En caso de que los productos PCR no fueran utilizados inmediatamente, se conservaron a -20 °C.

20.2.- Control de los amplicones

Para constatar que los amplicones obtenidos tuviesen el tamaño esperado (460 bp) los mismos fueron separados en un gel de agarosa (1 p/v %) mediante electroforesis junto a un patrón de peso molecular de concentración y tamaño conocidos.

20.3.- Purificación

Los amplicones se colocaron sobre un sistema constituido por una membrana de ultrafiltración (kit NucleoFast 96 PCR) unida a una bomba de vacío (Tecan, Suiza). Como resultado los contaminantes (oligonucleótidos sintéticos, dNTPs y sales) fueron expulsados y los amplicones purificados permanecieron en la membrana. Luego, los mismos fueron resuspendidos en distintos volúmenes de agua MilliQ de manera de obtener iguales concentraciones en todas las muestras.

20.4.- Reacción de amplificación para la secuenciación

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen pheS se describen en la Tabla 14.

Tabla 14 : Oligonucleótidos utilizados para el ensayo de secuenciación de la pheS.

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-----> 3'
pheS 21 F	CAYCCNGCHCGYGAYATGC
pheS 23 R	GGRTGRACCATVCCNGCHCC

Las cantidades de cada reactivo necesarias para formular la mezcla de reacción que se utilizó en la reacción de amplificación se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15 : Mezcla de reacción para la reacción de amplificación del gen de la pheS .

Reactivo	Cantidad por muestra
BugDye v3.1 (OPL-0,48)1/14	0,286 μ l
5X Buffer de secuenciación(OPL-0,49)	1,857 μ l
Agua MiliQ	1,857 μ l
Oligonucleótido sintético (4 μ M)	3 μ l

Para la amplificación se combinaron 7 μ l de la mezcla de reacción y 3 μ l de ADN molde en cada tubo *ependorf* estéril y las mezclas se llevaron a un

termociclador. Los ciclos de calentamiento y enfriamiento se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16: Condiciones impuestas al termociclador para amplificar el gen de la pheS.

Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos	Descripción
96	15 sec	30	Desnaturalización
35	1sec		<i>Annealing</i>
60	4 min		Extensión
4	7 min		Extensión final

Los productos PCR que no se utilizaron inmediatamente fueron conservados a -20 °C.

20.5.- Purificación y Secuenciación

Para purificar los productos de la amplificación del ADN se utilizó el kit BigDye Xterminator. En este caso las impurezas (sales, dNTPs, etc) quedaron retenidas en la fracción insoluble mientras que los productos de amplificación marcados permanecieron en el sobrenadante.

Luego de la purificación, los productos fueron colocados en una placa de 96 pocillos (3100 Genetic Analyzer Plate Septa) y secuenciados.

Los resultados obtenidos fueron analizados usando el programa Applied Biosystems Sequencing Analysis Software versión 5.1

21.- Caracterización reológica de las leches fermentadas

21.1.- Obtención de leches fermentadas.

A partir de 50 µl de los cultivos conservados a -80 °C de cada uno de los microorganismos a utilizar se hicieron repiques en 5 ml de leche descremada

estéril y se cultivaron en sus respectivas condiciones de crecimiento. La pureza de los cultivos obtenidos se verificó mediante la evaluación de la morfología microscópica utilizando la tinción de Gram. Se realizaron dos repiques sucesivos previo a la ejecución de cada ensayo en las condiciones descriptas.

Para la evaluación reológica los microorganismos se inocularon en leche parcialmente descremada esterilizada por tratamiento de ultra alta temperatura (UAT) al 1% v/v y se incubaron durante los tiempos y temperaturas indicados anteriormente (Tablas 1 y 2). Los cultivos destinados a la evaluación se realizaron en frascos de boca ancha, estériles, conteniendo 100 ml de leche para permitir la toma de muestra sin romper la estructura del gel ácido. Previo a la evaluación reológica, las leches fermentadas fueron almacenadas por un período de 24 horas a 4 °C. Asimismo se determinó el pH final de la fermentación utilizando un peachímetro asociado a un microelectrodo combinado de vidrio/calomel (Cole-Parmer).

21.2.- Obtención de geles lácteos acidificados con δ -gluconolactona.

A 10 ml de leche se le adicionó 0,1 g de δ -gluconolactona (ICN Biomedicals Inc., Ohio 44202, USA). Se agitó en un agitador magnético durante 1 minuto y luego se incubó a 37 °C por 3 horas. El pH de los geles obtenidos luego de la incubación se encontró en un rango entre 4,3 y 4,5. Los geles se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis.

21.3.- Evaluación del comportamiento de flujo y determinación de viscosidad.

Para la evaluación del comportamiento de flujo y la evaluación de viscosidad se utilizó un reómetro Haake Rheostress 600 (Alemania), en su modo de viscosímetro rotacional empleando la geometría plato-plato rugosos. El ensayo se llevó a cabo a 25 °C (Termohaake DC50) y la secuencia de rotación

empleada fue: ascenso del gradiente de velocidad de 0 a 500 s⁻¹ en 2 minutos, mantenimiento del gradiente de velocidad en 500 s⁻¹ durante 1 minuto y descenso del gradiente de velocidad de 500 a 0 s⁻¹ en 2 minutos. Se registró el esfuerzo de corte en función del gradiente de velocidad de deformación y se determinó la viscosidad aparente (η_{ap}) a un gradiente de velocidad de 300 s⁻¹.

21.4.- Evaluación del espectro mecánico de los geles ácidos

Las leches fermentadas fueron evaluadas mediante ensayos oscilatorios de pequeña amplitud de deformación. Las medidas fueron efectuadas en un reómetro de esfuerzo controlado RheoStress 600 (Termo Haake, Karlsruhe, Germany) utilizando la geometría plato-plato rugosos de 35 mm de diámetro como sistema sensor, con una separación de 1 mm entre platos.

La temperatura de las se mantuvo a 25°C utilizando un baño anexo al equipo (DC50, Haake).

En un primer ensayo, se determinó el rango de viscoelasticidad lineal. Para ello se realizó un barrido de esfuerzo de 0,01 a 20 Pa a una frecuencia fija de 1Hz. A partir de los mismos se seleccionó un esfuerzo dentro de dicho rango para realizar los barridos de frecuencia y así obtener los espectros mecánicos de las muestras.

Se determinaron los módulos elástico (G') y viscoso (G''), la tangente del ángulo de deformación ($\text{tg } \delta$) y el módulo complejo (G^*) como funciones de la frecuencia (0,1–10Hz) y se escogieron los valores de esos parámetros a la frecuencia de 1Hz para efectuar las comparaciones correspondientes.

22.- Obtención y purificación de polisacáridos.

22.1.- Extracción de exopolisacáridos a partir de cultivos de microorganismos aislados.

Los microorganismos activos fueron inoculados en leche parcialmente descremada estéril y se incubaron en sus respectivas condiciones de cultivo. Una vez finalizados los tiempos de fermentación se evaluó el pH y se procedió a la extracción de polisacáridos utilizando el método de precipitación con alcohol en frío y diálisis descrito por Rimada & Abraham (2001).

Inicialmente, las leches fermentadas fueron calentadas en baño a ebullición con el objetivo de inactivar enzimas que puedan degradar los EPS y modificar la estructura de las proteínas de la leche de modo de facilitar su posterior separación. A continuación se centrifugaron a temperatura ambiente durante 15 minutos a 10.000 g utilizando una centrifuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., USA). Al sobrenadante se le adicionó dos veces su volumen de etanol frío (-20 °C) y la solución resultante se llevo a -20 °C durante 24 horas.

Los polisacáridos, que en estas condiciones precipitan, fueron separados por centrifugación (4 °C, 20 min, 10.000 g) y luego resuspendidos en agua caliente.

Para obtener una muestra con bajos contenidos de proteínas y sin lactosa se procedió a repetir el proceso de precipitación y disolución y luego se dializó con membrana con valor de corte de 1.000 Da (Spectra/Por, Spectrum laboratorios, USA). La diálisis se realizó en vasos de precipitado de 4 litros contra agua bidestilada en agitación continua a 4 °C. El periodo de diálisis fue de 48 horas y se realizó un cambio de agua a las 24 horas.

De las soluciones obtenidas se separó una alícuota para determinar el contenido de azúcares totales (método de antrona) y constatar la ausencia de carbohidratos de bajo peso molecular (TLC) y proteínas (método de Bradford).

Finalmente, las soluciones fueron liofilizadas y almacenadas en recipientes herméticos a temperatura ambiente.

22.2.- Extracción de exopolisacáridos de gránulos de kefir

Se realizó la extracción de polisacáridos del gránulo de kefir CIDCA AGK1 utilizando el método de precipitación con alcohol en frío descrito por Rimada & Abraham (2001).

Los gránulos lavados, escurridos y pesados fueron disueltos en agua destilada en una proporción de 10 % p/v y se calentaron a 100 °C durante un periodo de 30 minutos. Luego se centrifugaron a temperatura ambiente por 15 minutos a 10.000 g utilizando una centrifuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., USA). El sobrenadante se separó y se le adicionó dos veces su volumen de etanol frío (-20 °C). Esta solución se mantuvo a -20 °C por 24 horas. El polisacárido precipitado fue separado por centrifugación (4 °C, 20 min, 10.000 g) y resuspendido en agua caliente. Se repitió el proceso de precipitación y disolución y finalmente se dializó con membranas con valor de corte de 1.000 Da (Spectra/Por, Spectrum laboratorios, USA). De las soluciones obtenidas se separó una alícuota para determinar el contenido de azúcares totales (método de antrona) y constatar la ausencia de carbohidratos de bajo peso molecular (TLC) y proteínas (método de Bradford). Finalmente las soluciones fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

22.3.- Cromatografía en capa fina

Soluciones de trabajo

Solvente de corrida

n-propanol.....70 ml

Ácido acético.....20 ml

Agua10 ml

Solución de revelado

Ácido p-amino benzoico.....7 g/l

Ácido o-fosfórico.....30 g/l

Metanol.....c.s.p. 1 l

Protocolo

Como medida de la pureza de las muestras se verificó la ausencia de lactosa mediante cromatografía en capa fina (TLC). Como referencia se utilizó lactosa Sigma (St Louis MO 63178 USA) al 0,5 % p/v en una solución de etanol:agua 50:50.

Se utilizaron placas de Silica gel G (Merck D-64271, Alemania) que fueron cortadas teniendo en cuenta que cada muestra debe sembrarse separada una distancia de 1 cm de la siguiente y del borde inferior. Las placas fueron previamente activadas en estufa a 100 °C durante 1 min y la siembra se realizó con jeringa Hamilton. El volumen de siembra fue de 3 µl. Una vez concluida la siembra, la placa fue introducida en una cuba previamente saturada con solvente de corrida. Se permitió el avance de fase la móvil hasta una distancia de 2 cm de la parte superior de las placas.

Finalizada la corrida, se retiró la placa de la cuba, se secó utilizando aire caliente y se procedió al revelado. Para ello, se bañó la placa con solución de revelado, se secó por evaporación y se llevó a estufa a 100 °C durante 5 min para visualizar los hidratos de carbono. Las placas fueron escaneadas para el análisis (Zweig & Sherma, 1978).

22.4.- Cuantificación de proteínas: Método de Bradford

Soluciones de trabajo

Reactivo de Bradford

Coomassie Brilliant Blue G-250.....100 mg

Ácido fosfórico 85%100 ml

Etanol 95%50 ml

NaOH 1M.....50 ml

Agua destilada..... c.s.p. 1 l

Protocolo

Como medida del grado de pureza de las muestras se procedió a cuantificar el contenido de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se colocó en un tubo de hemólisis 50 µl de solución a analizar y 1 ml de reactivo de Bradford. La mezcla de reacción se agitó por inversión y se midió la absorbancia de la muestra a 590 nm en un espectrofotómetro (Metrolab). Las muestras se procesaron simultáneamente con una curva de calibración que se preparó a partir de seroalbumina bovina en concentraciones entre 50 y 300 µg/ml.

22.5.- Cuantificación de azúcares totales: Método de antrona

Soluciones de trabajo

Reactivo de antrona

antrona (9,10 dihidro-9-oxoantraceno, Mallinckrodt)0,5 gr

H₂SO₄ 66% (v/v) c.s.p. 1 l

Para la disolución del ácido sulfúrico (H_2SO_4) en agua se trabajó en un baño de hielo debido a que se trata de una reacción exotérmica. Para facilitar la disolución de el 9,10 dihidro-9-oxoantraceno el mismo se agregó a una temperatura aproximada de 70 °C. El reactivo se conservó entre 0 y 4 °C por no más de 30 días.

Protocolo

La cuantificación de azúcares totales se realizó utilizando el método de antrona (Southgate, 1976). La evaluación de las muestras se realizó simultáneamente con la de una curva de calibración. Esta última se preparó empleando soluciones de glucosa en el rango de 25-500 $\mu\text{g/ml}$.

En tubos de vidrio con tapa se agregaron 0,2 ml de las soluciones a ensayar y 2 ml de reactivo de antrona. Luego, las muestras fueron llevadas a un baño de agua a 100 °C por 15 minutos y luego colocadas en un baño de agua a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente se realizó la medida de la absorbancia a 620 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro. Los resultados de absorbancia correspondientes a las muestras se interpolaron con los resultados correspondientes a la recta de calibración.

23.- Caracterización de exopolisacáridos.

23.1.- Determinación de peso molecular

Los polisacáridos disueltos en agua fueron filtrados utilizando filtros de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore, San pablo, Brasil) e introducidos en viales para la determinación de peso molecular mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando una columna de exclusión molecular OH-PAK SB 805 HQ (Shoedex, Japón). El equipo consta de un aspirador automático para la toma de muestra modelo 717 (Waters, Milford), un controlador modelo 600

(Waters, Milford) y un refractómetro diferencial modelo 410 (Waters, Milford). La elución de las muestras se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando como eluyente NaNO_3 0,1 M a flujo constante (0,95 ml/min, presión: 120:130 psi). El volumen de muestra inyectado fue de 50 μl . Como patrones de peso molecular se utilizaron dextranos en el rango de 97.000 a 3.800.000 Da (ALO-2770, Phenomenex, Torrence, CA).

23.2.- Composición de azúcares mediante cromatografía de intercambio aniónico

23.2.1.- Hidrólisis para la determinación de azúcares

Muestras de los polisacáridos liofilizados (entre 0,4 y 1,2 mg) fueron disueltas en 200 μl de agua Milli-Q e hidrolizada en ácido trifluoroacético 0,2, 2,0 y 4 N durante 3 horas a 100 °C. Luego, las mismas se llevaron a sequedad en rotavapor, con sucesivos agregados de agua para eliminar el ácido. Finalmente las muestras se secaron en SpeedVac (ThermoSavant, USA). Cada una de las muestras fue redisuelta en 100 μl de agua destilada.

23.2.2.- Cromatografía de intercambio aniónico

Para el análisis de la composición de azúcares mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución se utilizó una columna Carbopac PA-10 (4 x 250 mm) con pre-columna PA-10 (Dionex) y un detector de pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) en un equipo Dionex DX-300.

Se utilizaron como patrones D-glucosamina, D-galactosamina, L-fucosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa, D-fructosa (Sigma) y D-glucosa (Merk) secados previamente en desecador al vacío durante 48 hs. Los patrones fueron pesados para preparar soluciones a partir de las cuales se realizaron las diluciones necesarias para el análisis. Las soluciones se mantuvieron congeladas hasta su utilización a -20 °C. La cuantificación de los azúcares

neutros se realizó utilizando 2-deoxi-glucosa (Sigma) como estándar interno, relacionando el área correspondiente a 2-deoxi-glucosa con el área de pico obtenida para cada azúcar. Este azúcar se utiliza por similitud estructural con la glucosa y por ser un azúcar no natural.

Los solventes de corrida utilizados fueron NaOH 200 mM y agua. Se empleó en la corrida un programa isocrático con un flujo de 1 ml/min y una concentración de NaOH de 16 mM. Los resultados son promedios de dos corridas realizadas para cada muestra.

24.- Efecto de polisacáridos sobre la microbiota fecal de ratones.

24.1.- Animales de laboratorio

Se utilizaron hembras de ratones Balb/C de seis semanas de edad, libres de patógenos específicos, obtenidos del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP. Los animales se mantuvieron en jaulas plásticas, con temperatura y ciclo día/noche controlados; y fueron alimentados con una dieta balanceada convencional.

24.2.- Soluciones de polisacáridos

Los polisacáridos se resuspendieron en agua mineral (Villa del Sur, Argentina) en concentración 300 mg/l y se administraron a los ratones como agua de bebida para su consumo *ad libitum*. Las soluciones fueron reemplazadas todos los días.

24.3.- Tratamiento 1: Diseño del Experimento

Para determinar el efecto de la administración oral de polisacárido sobre la microbiota intestinal, se realizaron experimentos *in vivo*. La ingesta diaria de solución de polisacárido fue de 2,5 a 3,4 ml / ratón/ día, lo que equivale a una dosis de 0,75 -1 mg polisacárido / ratón/ día.

Los ratones fueron divididos en 3 grupos de 5 ratones:

Grupo control: recibieron una dieta balanceada durante 7 días.

Grupo k/2d: recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de polisacárido (300 mg/l) en el agua de bebida durante 2 días.

Grupo k/7d: recibieron una dieta balanceada y se incluyó la incorporación de polisacárido (300 mg/l) en el agua de bebida durante 7 días.

Las soluciones de polisacárido fueron administradas de manera que todos los animales de diferentes grupos experimentales fuesen sacrificados en el mismo día. El contenido intestinal fue extraído, resuspendido en PBS y congelado a -80 °C hasta su análisis (Figura 2). Se realizaron tres experimentos independientes.

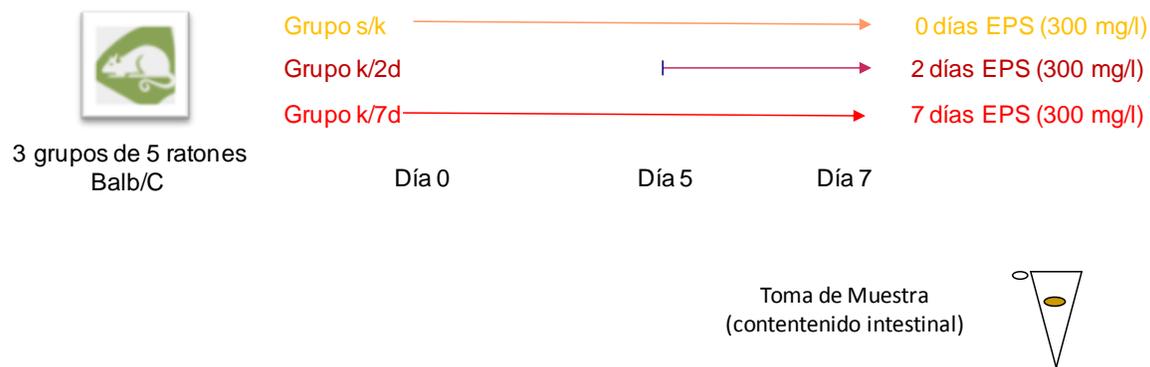


Figura 2: Esquema del diseño experimental.

24.3.1.- Análisis de las muestras de contenido intestinal

Las muestras de contenido intestinal fueron analizadas por PCR-DGGE. Para ello, el ADN de la materia fecal fue extraído como se detalló en el ítem 14 de Materiales y Métodos y utilizado como molde para amplificar la región V3

del gen que codifica para el ARNr 16S. Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en la amplificación fueron 518R/341F-GC, BIF164F/BIF662-GC y LAC1/LAC2-GC. Las mezclas de reacción y temperaturas de amplificación empleadas para cada par de oligonucleótidos se describen en el ítem 16. **Amplificación del ADNr 16S** de Materiales y Métodos. Los amplicones obtenidos fueron sembrados en un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturizante de urea formamida (ítem 17 de Materiales y Métodos).

En la selección de las condiciones de corrida para la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturizante se utilizaron los gradientes 30/60, 40/60, 45/65 y 45/70. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Systat 12.

24.4.- Tratamiento 2: Diseño del Experimento

Con el objetivo de realizar un seguimiento a lo largo del tiempo de la microbiota fecal de los ratones se realizó un ensayo en el cual los mismos fueron individualizados dentro de cada grupo. La ingesta diaria de solución de polisacárido fue de 2,5 a 3,4 ml / ratón/ día, lo que equivale a una dosis de 0,75 -1 mg polisacárido / ratón/ día.

Los ratones fueron divididos en tres grupos (Figura 3).

Grupo control: (ratones 1 a 6) recibieron una dieta balanceada durante 21 días.

Grupo k/21d: (ratones 7 a 12) recibieron una dieta balanceada y se incorporó kefir en el agua de bebida en una concentración de 300 mg/l.

Grupo 83124/21d: (ratones 13 a 18) recibieron una dieta base suplementada con el polisacárido aislado de la cepa CIDCA 83124 en una concentración de 300 mg/l durante 21 días.

Los polisacáridos (kefir an de gránulo o proveniente de la cepa CIDCA 83124) fueron suministrado *ad libitum* en al agua de bebida en una concentración de 300 mg/l durante 21 días.

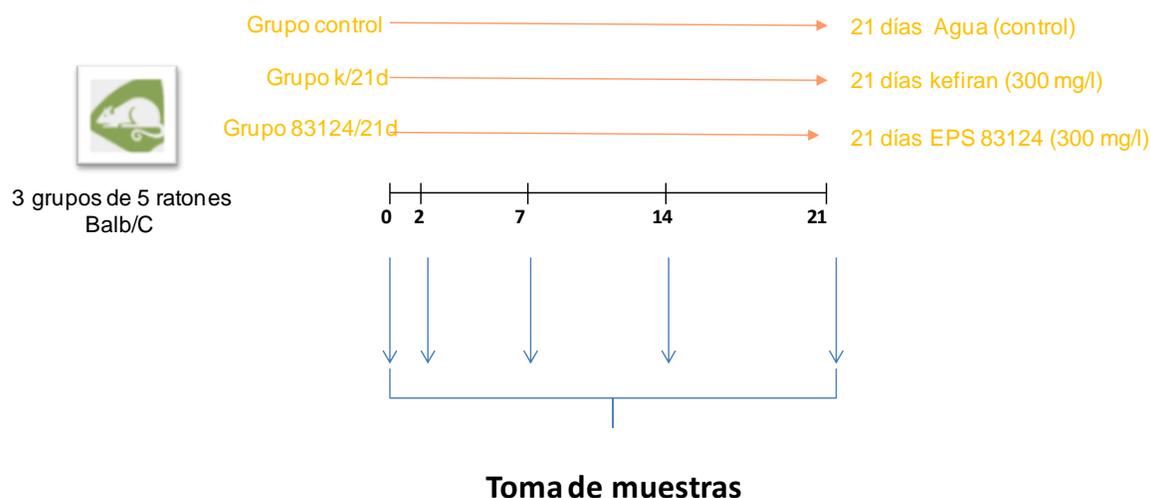


Figura 3: Esquema del diseño experimental.

Las muestras de materia fecal fueron tomadas los días 0, 2, 7, 14 y 21 y procesadas en el momento de la toma de muestra o bien conservadas a -80 °C hasta su análisis.

24.4.1.- Análisis de las muestras de material fecal

24.4.1.1.-Recuento de lactobacilos y bifidobacterias

A las muestras de materia fecal tomadas de todos los ratones los días 0 y 21 se le realizó recuento de microorganismos viables dirigido a las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos.

Para ellos se tomaron 5 *pellets* de materia fecal, se pesaron y se introdujeron dentro de un tubo estéril con 1 ml de de PBS/Cys 0,05 %. Luego, se disgregaron en esterilidad y finalmente, se procedió a realizar el recuento de microorganismos viables. Se empleó MRS/Cys 0,05 % como medio de cultivo y solución fisiológica (NaCl 0,85 %) como diluyente. Las condiciones de

crecimiento fueron 37 °C, 48 hs y anaerobiosis. El resultado se expresó como ufc/ml.

24.4.1.2.- Peso de los ratones

Se evaluó el efecto de las distintas dietas sobre el peso de los ratones. Para esto cada ratón fue pesado los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento. Para analizar los resultados se calcularon las diferencias entre el peso inicial (Pi) y final (Pf) para cada ratón y luego se promediaron los valores obtenidos para los ratones pertenecientes a cada grupo.

24.4.1.3.- PCR-DGGE

Las muestras de materia fecal tomadas a cada ratón los días 0, 2, 7, 14 y 21 del tratamiento fueron analizadas por PCR-DGGE. La extracción del ADN, amplificación y el ensayo de DGGE fueron llevados a cabo empleando la misma metodología descrita para el tratamiento 1 (ítem 24.3.1 de Materiales y Métodos).

24.4.1.4.- Análisis mediante hibridación fluorescente *in situ*- Citometría de flujo

Soluciones de trabajo

Solución de hibridación

NaCl.....	5,26 g
Tris base.....	0,24 g
SDS.....	0,01 g
Formamida	30 ml
Agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Solución de lavado

NaCl.....	0,57 g
Tris-HCl pH8.....	0,36 g
EDTA pH8.....	0,03 g
SDS.....	0,015 g
Agua bidestilada c.s.p.....	150 ml

Protocolo

Las poblaciones celulares se evaluaron mediante la marcación con sondas fluorescentes específicas (Invitrogen) para los siguientes grupos poblacionales: Eubacterias (Eub 338), NONEubacteria (NON 338), Bifidobacterias (Bif 164) y Lactobacilos (Lab 158). La sonda Eub 338 se usó como control positivo. La sonda NON 338, se utilizó como control negativo.

En la Tabla 17 se detallan los marcadores específicos utilizados para cada grupo de bacterias.

Tabla 17: Sondas utilizadas para la hibridación fluorescente *in situ* y secuencia a la cual se unen.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Marcador fluorescente
Eub 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FITC
NON 338	ACATCCTACGGGAGGC	FITC
Lab 158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	AlexaFluor 532
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	AlexaFluor 647

El proceso de fijación y marcación de las muestras de materia fecal se llevo a cabo mediante el protocolo descrito por Snart *et al.*, 2006 como se detalla a continuación:

1) La materia fecal fue recolectada, pesada e introducida en tubos *eppendorf*, luego fue homogeneizada mecánicamente con palillos de madera y diluida 1/10 en PBS.

2) Se tomaron 300 μl de la suspensión resultante y se le agregaron 900 μl de paraformaldehído 4 % (p/v).

3) Las muestras obtenidas se almacenaron a 4 °C durante toda la noche. Pasado este periodo de tiempo se centrifugaron (7.600 g, 5 min, 4 °C) y el *pellet* resultante se resuspendió en 1 ml de PBS y se centrifugo nuevamente (7.600 g, 5 min, 4 °C). Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 400 μl de PBS y se le agregó 400 μl de etanol frío. Se prepararon 6 tubos de cada muestra. Las muestras fijadas se almacenaron a -80 °C en tubos hasta su análisis.

4) Para cada análisis se hizo un pool con 3 tubos de los anteriormente fijados, para ello cada tubo se centrifugó (14.600 g, 5 min) y los *pellets* bacterianos resultantes fueron reunidos en un solo tubo y resuspendidos en 1 ml de PBS.

5) Las células bacterianas fueron cosechadas por centrifugación (14.600 g, 5 min) y resuspendidas en 1 ml de *buffer* Tris-EDTA.

6) Después de ser lavadas con este *buffer* los *pellets* fueron resuspendidos en *buffer* Tris-EDTA con 1 mg of lisozima por ml y se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente.

7) Seguidamente, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 1 ml de solución de hibridación.

8) Alícuotas de 50 μl fueron usadas para unirse a cada sonda. La concentración final de cada sonda fue de 4 ng/ μl . Las mezclas de hibridación fueron mantenidas a 35 °C durante toda la noche en tubos para microcentrifuga y al abrigo de la luz.

9) Luego de la hibridación se agregó 150 μ l de solución de hibridación a cada tubo y las células bacterianas fueron cosechadas por centrifugación (14.600 g, 5 min).

10) Seguidamente, las células fueron resuspendidas en 200 μ l de solución de lavado, incubadas a 37 °C durante 20 min y centrifugadas (14.600 g, 5 min). Luego de esta centrifugación las células fueron resuspendidas en 100 μ l de PBS y se les adicionó 500 μ l de PBS previamente filtrado para la posterior adquisición de datos en el citómetro.

Se determinó el *forward* (FSC) y *side scatter* (SSC) en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson Biosciencias, San Jose, USA) utilizando el programa Cell Quest Pro para la adquisición de los datos (50000 eventos). Se estableció el *gate* o región correspondiente para cada tipo celular. El análisis de datos fue realizado con los programas Cell Quest Pro (Becton Dickinson) y WinMDI (versión 2.9; Joseph Trotter).

24.4.1.5.- Microscopía laser confocal

Las muestras de materia fecal marcadas con sondas fluorescentes siguiendo el mismo protocolo que se describe en el punto anterior fueron analizadas en un microscopio laser confocal. Para ello, una gota de la muestra marcada con sonda fluorescente fue depositada entre un portaobjeto y un cubreobjeto y conservada en oscuridad hasta el momento de la observación. La observación se llevó a cabo en un microscopio confocal LEICA TCS SP5 con láseres de Argón y HeNe. Las microfotografía obtenidas fueron evaluadas mediante el programa LAS AF Lite.