

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS AISLADAS DE KEFIR

MOLECULAR CHARACTERISATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA ISOLATED FROM KEFIR

Salas-Sánchez, S.I.; Valadez-Moctezuma, E.*

Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo México. CP 56230.

*Autor responsable: evaladez@correo.chapingo.mx

RESUMEN

El kefir es un alimento probiótico, compuesto principalmente de bacterias ácido-lácticas y levaduras. Su ingesta ayuda al buen funcionamiento del intestino humano por el incremento de la flora benéfica. Dependiendo del lugar, este producto presenta características organolépticas distintivas proporcionadas por el tipo de microorganismos asociados y la calidad de la leche utilizada. Actualmente existe interés en industrializarlo, pero es necesario seleccionar el inóculo adecuado para estandarizar su sabor y calidad. Con base en lo anterior, se caracterizaron e identificaron molecularmente bacterias ácido-lácticas aisladas de kefir artesanal. Todas las bacterias caracterizadas fueron de forma bacilar, Gram positivas, catalasa negativas, sin esporulación, y acidificaron la leche en valores de pH diferentes. La leche fermentada presentó consistencia viscosa, olor característico, y generalmente estaba gasificada. Todos los aislamientos fueron diferenciados con RAPDs, RAPD-CAFs, separados en cuatro grupos, y las secuencias del gen 16S los identificó como *Lactobacillus kefir*.

Palabras clave: leche fermentada, marcadores genéticos, RAPD-CAFs, rDNA, *Lactobacillus kefir*.

ABSTRACT

Kefir is a probiotic food composed mainly of lactic acid bacteria and yeasts; intake helps the proper function of the human intestine by increasing the beneficial flora. Depending on the geographic site, this product has distinctive organoleptic characteristics provided by the type of associated microorganisms and the quality of the milk used. Kefir has undergone industrialization, but to standardize the taste and quality, it is necessary to select the appropriate inoculum. Lactic acid bacteria isolated from artisanal kefir were identified and characterized molecularly. All the bacteria were rod shaped, Gram positive, catalase negative and with no sporulation; the bacteria also acidified the milk with different pH values. The fermented milk showed viscous consistency, characteristic odor and most frequently it was gasified. Bacterial isolates were differentiated with RAPD and DAF-PCR, and classified into four groups. The sequences of the 16S gene identified them as *Lactobacillus kefir*.

Key Word: fermented milk, genetic markers, organoleptic properties, DAF-PCR, rDNA, *Lactobacillus kefir*.

INTRODUCCIÓN

La preservación de los alimentos por fermentación es uno de los métodos más antiguos conocidos por la humanidad. La leche ha sido uno de los primeros productos pecuarios utilizados por el hombre, e incluso, de los primeros alimentos sometidos a procesos fermentativos (Cheesman, 1984). Las leches fermentadas se elaboran generalmente con leche de vaca (Liu y Lin 2000; Je-Ruei et al., 2002), utilizando selectos cultivos lácticos en modernos procesos. El consumo de estos productos a nivel mundial se ha incrementado debido a que favorecen la flora intestinal y ayudan a prevenir el incremento de organismos patógenos en el intestino por la propia acidificación del producto (Roberfroid, 2000). El kefir (de origen caucásico) es una bebida láctea viscosa, ligeramente carbonatada, que contiene pequeñas cantidades de alcohol; se conoce como kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi y kippi (Farnworth, 2005; Karagözlü et al., 2007). Se clasifica en el grupo de leches fermentadas y acidificadas por una microflora mixta basada en bacterias y levaduras (Marshall y Cole, 1985; Ot-es y Cagindi, 2003). Los gránulos de kefir, comúnmente conocidos en México como "búlgaros", se utilizan como inóculo y se obtienen a partir de la proliferación de gránulos preformados (Garrote et al., 1998), que son estructuras de polisacáridos, gelatinosas, blancas o amarillentas, irregulares y de tamaño variable (Figura 1) donde conviven en simbiosis bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y, ocasionalmente, bacterias acéticas incrustadas en una matriz formada por Kefiran (Frengova et al., 2002; Ninane et al., 2005). Las BAL se localizan principalmente en la capa superficial y las levaduras en el centro de los gránulos, ocasionando fermentación ácido-alcohólica durante la cual se acumulan metabolitos como ácido láctico (producido por las bacterias), alcohol etílico y ácido carbónico (producido por levaduras) que le confieren propiedades organolépticas distintivas a este alimento milenario (Yilmaz et al., 2006). Además de otros beneficios atribuidos a su consumo, la cantidad de microorganismos y la variedad de componentes bioactivos que pueden formarse durante la fermentación hacen del kefir un probiótico complejo (Farnworth, 2005).

El kefir es consumido principalmente en Europa, pero se produce comercialmente en otras partes del mundo. Actualmente la elaboración a escala comercial requiere de cultivos seleccionados y eficientes que permitan contro-

lar la microflora involucrada para obtener producción de calidad y estandarizada; así como extender la vida útil del producto y facilitar los aspectos nutrimentales, considerando altos valores de bacterias viables, además de buenas propiedades químicas y organolépticas. A la fecha se ha intentado producir leche similar al kefir tradicional, combinando *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* subsp *lactis* y *Saccharomyces cerevisiae* aislada de kefir con las cepas para yogur, *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Beshkova et al., 2002). Con la misma finalidad, en Estados Unidos (EUA) se produce kefir comercial, que contiene *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc plantarum*, *L. casei*, *L. cremoris* y *S. florentinus* (Hertzler y Clancy 2003). Debido a las propiedades nutricionales que ofrece este producto lácteo y al interés por industrializarlo de forma estandarizada, un grupo de bacterias lácticas aisladas de kefir producido artesanalmente se caracterizó e identificó, utilizando marcadores genético-moleculares y comparando las secuencias del gen 16S del rDNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización de BAL con pruebas bacteriológicas

Se obtuvieron diferentes muestras de kefir de la Ciudad de Texcoco, Estado de México, México, producido artesanalmente. Se inoculó 10% (p/v) de gránulos de cada muestra en leche de vaca, semidescremada y ultrapasteurizada, marca Alpura®, y se incubaron a 30 °C por 48 h. Del nuevo kefir se hicieron diluciones en solución

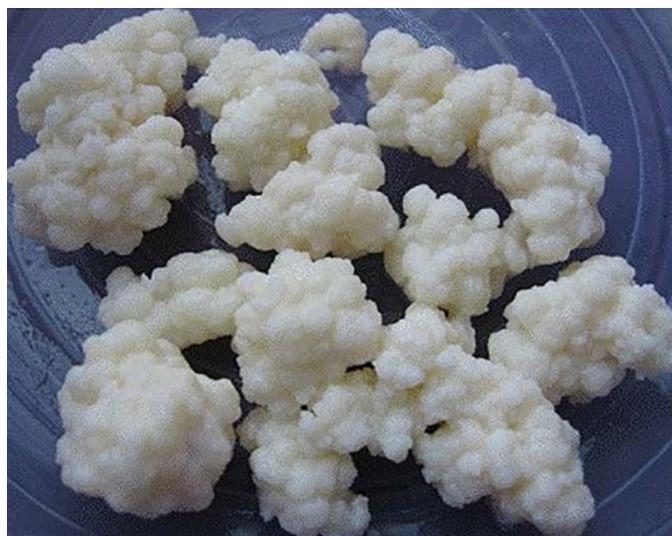


Figura 1. Gránulos de kefir (*Lactobacillus kefir*).

de Ringer de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , se sembraron en caldo para lactobacilos MRS (De Man *et al.*, 1960) por extensión en placa y se incubaron a 37 °C durante 72 h. Se aislaron colonias de bacterias color blanco-cremoso, Gram positivas y catalasa negativa. Para medir la acidificación de los diferentes aislamientos, cada cultivo se inoculó al 1% (v/v) en leche semidescremada ultra pasteurizada Alpura® y se incubó a 37 °C durante 24 h. La concentración de células se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop, ND100 a de 550 nm.

Extracción de DNA y PCR

Se extrajo ADN de los aislamientos de las bacterias lácticas de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989), además de *Streptococcus thermophilus* (Gram positiva) y de *Escherichia coli* (Gram negativa) que se utilizaron como grupos de comparación en los análisis de DNA. Todas las muestras se trataron con Ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg mL⁻¹ (fermentas) y el ADN se re-suspendió en buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 7.6 y 1 mM EDTA pH 8). La integridad del ADN se estimó por electroforesis en agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 µg mL⁻¹, y se observó con luz ultravioleta. El ADN se cuantificó con espectrofotómetro (ND100) a 260 nm. Para la caracterización y diferenciación de los aislamientos se utilizaron las técnicas RAPDs y una modificación a esta técnica, que consistió en digerir previamente el ADN con una enzima de restricción, con la finalidad de hacer menos compleja la topología de la molécula y facilitar el reconocimiento de fragmentos molde por parte del primer aleatorio, con el fin de incrementar considerablemente la reproducibilidad y la nitidez de los perfiles que se obtienen al separarlos en geles de acrilamida. En el presente trabajo a esta modalidad se propone el nombre de RAPD-CAFs (Random Amplified Polymorphic DNA-Claved Amplified Fragments). Esta técnica alternativa prácticamente tiene como base las que reportaron Konieczny y Ausubel (1993), quienes restringieron productos de PCR en lugar del ADN molde; y Caetano-Anollés y Gresshoff (1994), que tiñeron fragmentos DAF con sales de plata en geles de acrilamida en lugar de usar radioactividad. Los iniciadores para PCR se seleccionaron del kit L de Carl Roth Company. La mezcla de reacción para RAPD consistió en 100 ng de ADN, 20 pM de cada iniciador, 200 pM de dNTPs, 1X de amortiguador, 2.5 mM de MgCl₂ y 1.5 unidades de Taq ADN Polimerasa. El volumen final se ajustó a 25 µL con agua destilada estéril. El termociclaje consistió en: un ciclo a 94 °C durante dos minutos; 35 ciclos [94 °C, un minuto; 40 °C, un minuto; 72 °C, 1.5 minutos y un ciclo de extensión final de 72 °C por cinco minutos. Se seleccionaron los iniciadores L-03, L-06, L-07, L-08, L-10, L-12, L-18 y L-20, dada su funcionalidad para el tipo de muestras. Cabe hacer notar que aun cuando los RAPDs se alinean comúnmente entre 32 °C y 35 °C, en la presente evaluación se hizo a 40 °C con la finalidad de incrementar la especificidad y reproducibilidad (Luna *et al.*, 2007). Para RAPD-CAFs se digirió 1 µg de ADN de cada cepa con la enzima EcoRI (PROMEGA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Los productos de digestión se amplificaron con los mismos iniciadores empleados para RAPD y con el mismo programa de termociclaje referido. Los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida 8% y se tiñeron con nitrato de plata 0.2 % (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1994).

Análisis estadísticos de los perfiles electroforético

Se construyó una matriz binaria (0 y 1) a partir de los diferentes perfiles de ADN, donde "1" indicó la presencia de un fragmento y "0" su ausencia entre los aislamientos comparados. Se generó un dendrograma por el método de UPGMA, con coeficiente Nei & Li/Dice y 1000 re muestreos tipo Jackknife, eliminando dos bandas en cada corrida; esto se realizó con el software Free Tree 0.9.1.50 y se graficó con Tree View 1.6.6 (Hampl *et al.*, 2001; Page, 2001).

Amplificación del fragmento 16S rDNA y secuenciación

Para la amplificación del gen 16S del rDNA de las BAL se utilizaron 25 ng de ADN de cada aislamiento, 10 pM de cada uno de los iniciadores universales para bacterias, el 16S (8f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3' y U1492r: 5' ACCTTGTTACGACTT-3') (Ashelford *et al.*, 2005; Sasoh, *et al.*, 2006), 200 pM de dNTPs, 1X de amortiguador, 2.5 mM de MgCl₂ y 2 U de Taq DNA Polimerasa y agua libre de nucleasas en un volumen final de 25 µL. El programa de termociclaje consistió en un ciclo a 95 °C por dos minutos, 30 ciclos [95 °C, un minuto, 56 °C, un minuto; 72 °C, uno punto cinco minutos] y un ciclo de extensión final de 72 °C por cinco minutos. Se obtuvo un fragmento de alrededor de 1500 pb (pares de bases) y se limpió por el método Exo-Sap (Shrimp Alkaline Phosphatase-Exonuclease I de Invitrogen). Para la reacción de secuenciación se utilizaron 20 ng del fragmento purificado, 10 pM de cada iniciador U514F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') y 800R (5'-CTACCAGGGTATCTAAT-3') (Anzai *et al.*, 2000; Edgcomb *et al.*, 2002), 2 µL de amortiguador 5X,

4 μL de la solución RRM (incluye enzima AmpliTaq DNA polimerasa, MgCl_2 , amortiguador Tris-HCl, dNTPs y ddNTPs) y agua. La reacción de PCR se realizó por 25 ciclos [96 °C, 10s; 50 °C, 5s; 60 °C, 4 minutos]; posteriormente el ADN se limpió de acuerdo con las indicaciones del kit de secuenciación de Applied Biosystems. Las secuencias se realizaron con un Analizador Genético Applied Biosystems modelo 3130; se ensamblaron y editaron con los programas computacionales BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 y FinchTV 1.4.0 Geospiza Inc. Esta información se comparó con la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de bacterias y capacidad acidificante

El medio MRS resultó adecuado para crecimiento de BAL. En la Figura 2 se muestran colonias homogéneas de color blanco-crema y forma semejante que se caracterizaron como Gram (+) y catalasa (-). La cuenta de colonias se hizo con base en las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , dando un recuento en el orden de 3.8×10^5 a 1.45×10^7 ufc mL^{-1} respectivamente, lo que presupone que la forma de cultivo utilizada permite obtener la cantidad de bacterias BAL apropiadas para contribuir a la calidad del kefir. En este sentido, Siuta (2001) indica que la diferencia en cuentas microbianas en productos lácteos es un factor de determinación del sabor y aroma y, además, los probióticos de leches fermentadas deben estar presentes en cantidades apropiadas (1×10^6 UFC mL^{-1}) para prevenir adecuadamente problemas gastrointestinales.

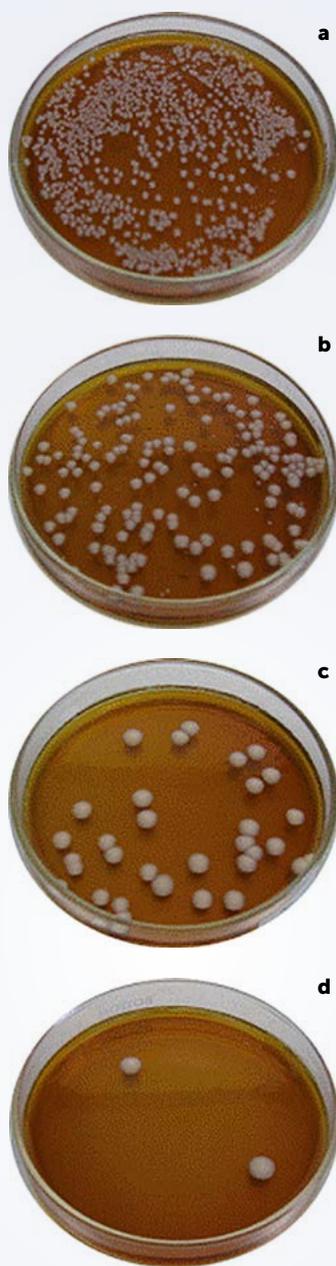


Figura 2. Desarrollo de bacterias lácticas aisladas de kefir. a-d: Diluciones a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , respectivamente.

Los valores de pH entre los 20 aislamientos variaron desde 4.9 a 6.1 (Cuadro 1). La fermentación de la leche también produjo un aumento en la viscosidad, desarrollo de olor característico y producción de gas.

Análisis de perfiles RAPDs y RAPD-CAFs

Los ocho iniciadores utilizados para

tipificar genéticamente con RAPD los 20 aislamientos de BAL mostraron pocos polimorfismos; sin embargo, fueron capaces de diferenciar claramente a *S. thermophilus* y *E. coli* (Figura 3). Con la técnica RAPD-CAFs solamente los iniciadores L-07 y L-12 fueron capaces de reconocer y amplificar todas las muestras que se compararon en el estudio (Cuadro 2).

Los perfiles de esta última técnica fueron diferentes a los obtenidos con RAPDs (Figura 3); las huellas obtenidas fueron abundantes y nítidas. La razón de esta diferencia se debió principalmente a que los iniciadores encuentran más fácilmente los sitios de alineación en los fragmentos de restricción que se utilizan en la PCR como ADN molde, favoreciendo una amplificación selectiva y proporcionando ampliaciones mejor definidas y reproducibles entre experimentos independientes. El ADN de alto peso molecular que normalmente se utiliza para obtener RAPD dificulta el potencial reconocimiento por parte de los iniciadores, dada la compleja topología de la molécula; esta es seguramente una de las razones por la que los RAPD son cuestionados entre laboratorios o experimentos. Sin embargo, en el presente caso las huellas tipo RAPD fueron capaces de diferenciar las cepas de BAL respecto a las bacterias comparadoras.

Por otro lado, los geles de acrilamida resultaron ser una excelente herramienta para la visualización de polimorfismos de ADN, ya que las diferencias entre ampliaciones con pesos moleculares cercanos se aprecian más fácilmente, proporcionando un mayor número de datos. Luna *et al.* (2007) reportaron resultados similares utilizando la misma

Cuadro 1. Valores de pH en leche acidificada por los aislamientos de bacterias ácido-lácticas obtenidas de kefir.

Cepa*	pH	Cepa*	pH
10	4.9	24	5.8
17	5.1	5	5.8
21	5.5	6	5.8
19	5.5	7	5.8
28	5.6	20	5.9
14	5.7	2	5.9
16	5.7	4	5.9
9	5.7	3	6.0
13	5.7	18	6.0
26	5.7	22	6.1

*Numeración asignada en el estudio.

técnica. Para los análisis estadísticos se utilizó un total de 105 fragmentos obtenidos en la técnica de RAPD-CAFs; 37% de éstos fueron propios de los dos aislamientos comparadores. El agrupamiento de las cepas de la Figura 4 definió seis grupos: dos independientes, donde se ubicaron los comparadores *E. coli* y *S. thermophilus*, y cuatro donde se distribuyeron las 20 cepas de BAL. El grupo principal estuvo integrado por 17 aislamientos, a su vez separados en diferentes subgrupos: [4, 17, 16, 2, 3, 7, 24, 28, 13 y 5]; [21, 22, 20, 14 y 26]; [18 y 19], pero las cepas 9, 6 y 10 se mantuvieron independientes entre sí y separadas del grupo mayor. Este nivel de diferenciación fue evidenciado solo utilizando los datos RAPD-CAFs, así como la variabilidad genética intrínseca de la especie, resultados que no se lograron con los datos RAPDs (no mostrados y no considerados). Al tratar de establecer

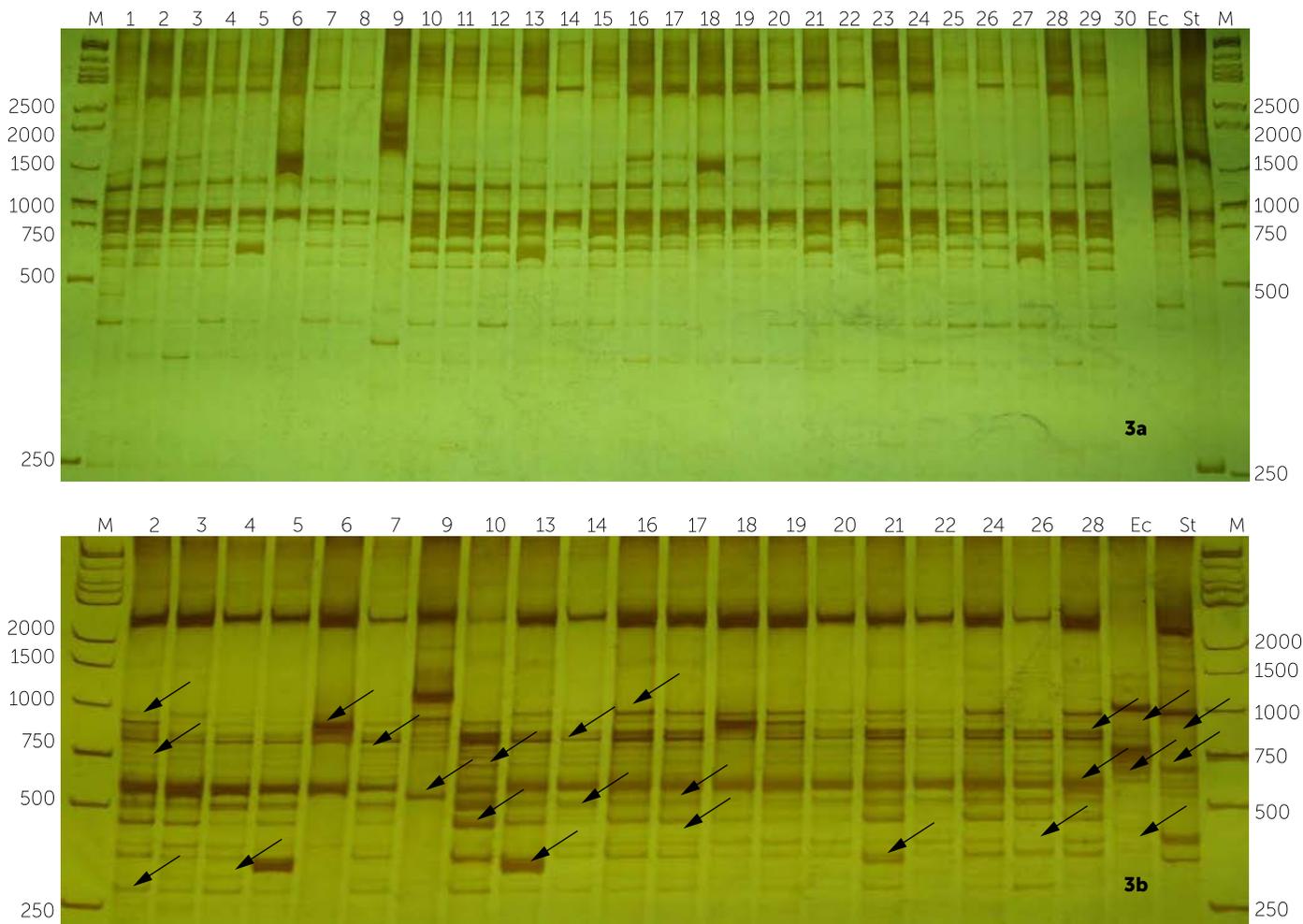


Figura 3. Perfiles RAPD (3a) y DAF-PCR (3b) obtenidos con el iniciador L-07 y separados en gels de poliacrilamida. Nótese la nitidez de los fragmentos de DNA y los polimorfismos detectados con DAF-PCR (señalados con flechas). El marcador de peso molecular (M) es de 1 kb (PROMEGA). Ec: *Escherichia coli*; St: *Streptococcus thermophilus*. Gel inferior contiene las cepas reportadas en el presente estudio. Gel superior, incluye otros aislamientos que resultaron iguales entre sí.

Cuadro 2. Respuesta de amplificación de las bacterias ácido-lácticas aisladas del kefir con ocho iniciadores aleatorios. Las hileras indican los iniciadores utilizados y las columnas, los aislamientos evaluados.

	2	3	4	5	6	7	9	10	13	14	16	17	18	19	20	21	22	24	26	28	Ec	St	
L-03							■															■	■
L-06					■			■	■														
L-07	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L-08					■		■		■				■									■	■
L-10					■		■										■		■			■	■
L-12	■				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
L-18		■		■				■														■	■
L-20	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	■		

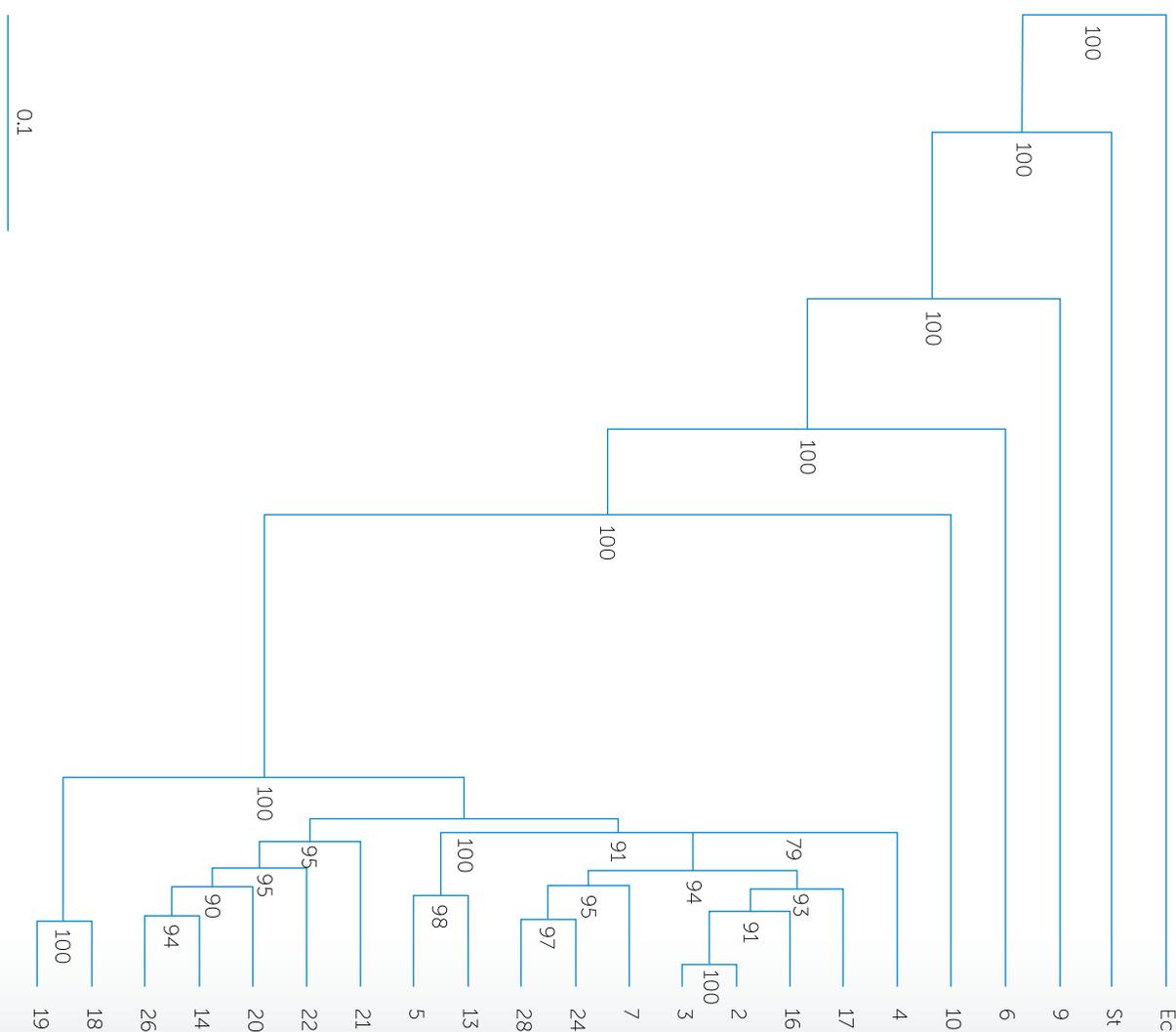


Figura 4. Dendrograma agrupado con UPGMA, utilizando 105 fragmentos RAPD-CAF de 20 cepas de *Lactobacillus kefir*, con la separación de los aislamientos 10, 6 y 9.

una correlación de los grupos de las BAL del dendrograma con los de acidificación de la leche (Cuadro 1), ésta fue negativa, a excepción posiblemente de la cepa 10 que tenía el pH más bajo (4.9).

Secuenciación. El fragmento secuenciado de alrededor de 1400 pb, correspondiente al gen 16S, que identificó con exactitud a las 20 cepas BAL, como *Lactobacillus kefiri*, de acuerdo con la base de datos NCBI (Figura 5, 6). La Figura 6 muestra el árbol de relación filogenética entre las cepas del presente estudio (LK) y algunas bacterias relacionadas, obtenidas del banco de genes GenBank; donde LK se encuentra más relacionado genéticamente con *L. kefiri*, *L. sanfranciscensis*, *L. brevis*, *L. casei* subsp. *casei* y *L. casei* que con el resto de las especies comparadas. Indudablemente, la comparación de secuencias conservadas de ADN, como fue el gen analizado en este trabajo, tiene gran importancia porque permite comparar a los microorganismos de manera muy fina. Torriani *et al.* (1999) y Blaiota *et al.* (2008) han indicado que las inferencias basadas en este solo gen no son del todo concluyentes al comparar bacterias, por lo que se sugiere utilizar otras secuencias o genes; por ejemplo, las regiones espaciadoras intergénicas (ISR) que ayudan a identificar serotipos o las regiones en los extremos de la subunidad 16S, llamadas V1-V3 o V6-V9 e, incluso, genes codificadores de proteínas heat shock, etcétera, que muestran mayor varia-

ción y permiten asegurar la separación de las especies con más precisión. Con base en nuestros resultados y para nuestro caso, resulta muy importante considerar otras zonas del genoma de las BAL; por ejemplo, las sugeridas por estos autores para conocer si las cepas 6, 9 y 10, que mostraron perfiles de ADN diferentes tanto con RAPDs (datos no mostrados) como con DAF, representan variación inter-específica de la especie o son otras especies de bacterias ácido lácticas presentes en el kefir de la zona de Texcoco, México.

CONCLUSIONES

Aislamientos de BAL obtenidos de kefir producido de forma doméstica fueron capaces de fermentar y acidificar la leche de vaca con valores de pH 4.9 a 6.1.

- La tipificación genética realizada con RAPD y RAPD-CAF permitió apreciar claramente la variabilidad intra-específica de los aislamientos de BAL.
- Los RAPD-CAFs fueron más eficientes que los RAPDs para revelar polimorfismos claros entre los aislamientos de BAL y entre las bacterias utilizadas como grupos comparadores (*Streptococcus thermophilus* y *Escherichia coli*); particularmente, el iniciador L-07 fue el más informativo.
- Los aislamientos de BAL se separaron en cuatro grupos: el principal se integró por 17 de los 20 aislamientos evaluados: [4, 17, 16, 2, 3, 7, 24, 28, 13 y

```

ATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCATAATACATGCAAGTCGAACGCGTTTCCGTTATTG
ATTTTAGGTGCTTGCATTTAAATGATTTAACACGAAACGAGTGGCGAAGTGGTGAAGTAACACGCTG
GGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACCAA
AACCACATGGTTTTTGGTTTAAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGCTATTA
GCTTGTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGC
CACATTTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCACAATG
GACGAAAGTTGTAAGCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCAAAAGCGGTGATGAAGGGTTTCGGCTC
TTGAGGAAAGAACAGGTGTCAGAGTAACGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGG
CTAACTAGCTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
AAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCCGGAGAAGTGCAT
CGGAAACCAGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCC
TAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGCTGGTCTGTAACAGCAGCTGAGGCTCG
AAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGCTAAG
TGTGGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGA
CCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT
TCGATGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTC
CCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACCTTAGCAAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAAAGGACGGTACAAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTCAAGCTAATCTCTTAAA
GCCGTTCTCAGTTCGGATTGCGAGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCGTG
GATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC
    
```

Figura 5. Fragmento de 1397 bases correspondiente al gel 16S del rDNA de bacterias ácido-lácticas de kefir de Texcoco, México obtenido con los iniciadores universales 8 Forward 5'-

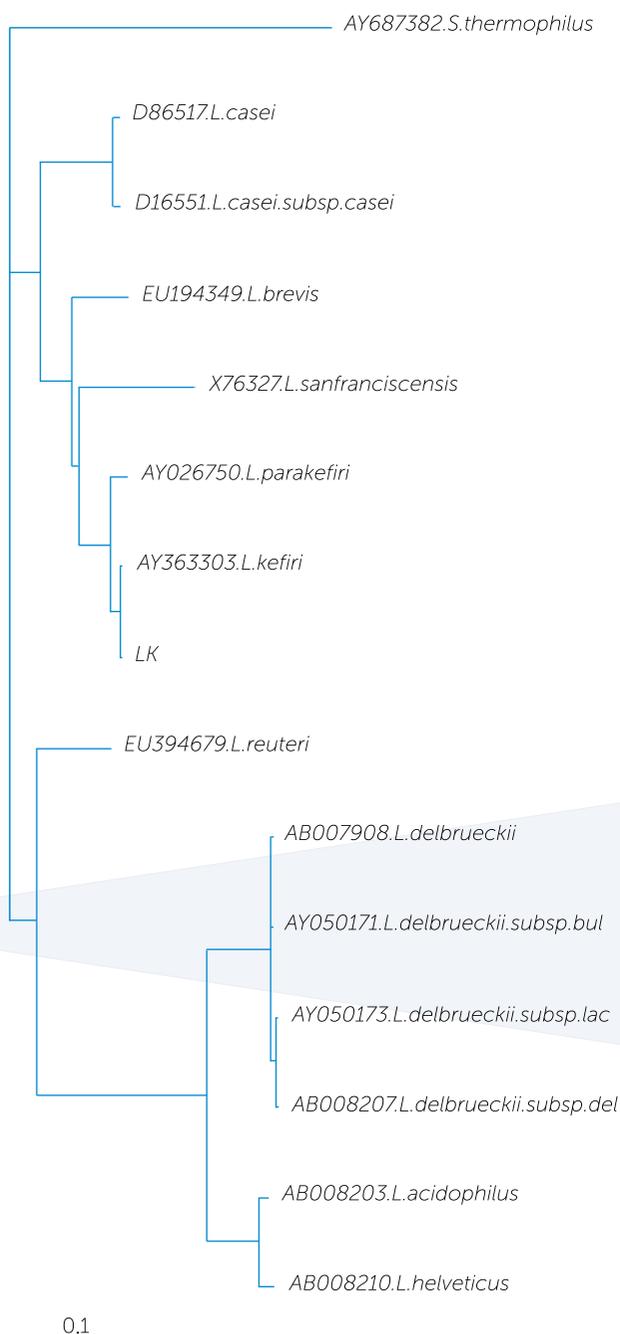


Figura 6. Relación filogenética de algunas especies de *Lactobacillus* spp., obtenidas del Genbank con cepas del presente estudio.

5]; [21, 22, 20, 14 y 26]; [18 y 19] con poca variación genómica; los otros tres grupos independientes entre sí estuvieron representados por los aislamientos 6, 9 y 10, respectivamente.

- Las 20 cepas de BAL se identificaron como *Lactobacillus kefiri*, al comparar las secuencias del gen 16S del rADN.

LITERATURA CITADA

- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 50: 1563.
- Ashelford K.E., Chuzhanova N.A., Fry J.C., Jones A.J., Weightman A.J. 2005. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7724-7736.
- Beshkova D.M., Simova E.D., Simov Z.I., Frengova G.I., Spasov Z.N. 2002. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology* 19: 537-544.
- Blaiota G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. 2008. *Lactobacillus* strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-Restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (1): 208-215.
- Cheesman M. 1984. Los Cultivos Lácticos. Traducido por Villegas, A. 1988 Universidad Autónoma Chapingo, Edo. Méx. 175 p.
- Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. 1994. Staining nucleic acids with silver: an alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes* 45: 13-18.
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23: 130-135.
- Edgcomb V.P., Kysela D.T., Teske A., Gomez A. de V., Sogin M.L. 2002. Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment. *PNAS.* 99 (11): 7658-7662.
- Farnworth E.R. 2005. Kefir - a complex probiotic. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* 2 (1): 1-17.
- Frengova G., Simova E.D., Beshkova D.M., Simov Z.I. 2002. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch* 57: 805-810.
- Garrote G.L., Abraham A.G., De Antoni G.L. 1998. Characteristics of kefir prepared with different grain [ratio] milk ratios. *Journal of Dairy Research* 65: 149-154.
- Hapl V., Pavlíček A., Flegr J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 731-735.
- Hertzler S.R., Clancy S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association* 103: 582-587.
- Je-Ruei L., Sheng-Yao W., Yuh-Yih L., Chin-Wen L. 2002. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer* 44 (2):182-187.
- Karagözlü N., Karagözlü C., Ergönül B. 2007. Survival characteristics of *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* and *S. aureus* during kefir fermentation. *Czech J. Food Sci* 25, 202-207.
- Konieczny A., Ausubel FM. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR markers. *Plant J.* 4 (2): 403-10.
- Liu J.R., Lin C.W. 2000. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose or sucrose. *Journal of Food Science* 65: 716-719.
- Luna-Páez A., Valadez-Moctezuma E., Barrientos-Priego A., Gallegos-Vázquez C. 2007. Caracterización de *Opuntia* spp., mediante semilla con marcadores RAPD e ISSR y su posible uso para

- diferenciación. Journal of the Professional Association for Cactus Development 9: 43-81.
- Marshall V.M., Cole W.M. 1985. Method for making kefir and fermented milks based on kefir. Journal of Dairy Research 52: 451-456.
- Ninane V., Berben G., Romnee J.M., Oger R. 2005. Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 9 (3): 191-194.
- Ot-es S., Cagindi O. 2003. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. Pakistan Journal of Nutrition 2: 54-59.
- Page R.D.M. 2001. TreeView version 1.6.6. Ayudas On-Line <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.htm>, Glasgow, Escocia, Reino Unido.
- Roberfroid B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? American Journal of Clinical Nutrition 71: 1682-1687.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA. 1659 p.
- Sasoh M., Masai S.E., Ishibashi S., Hara H., Kamimura N., Miyauchi K., Fukud M. 2006. Characterization of the Terephthalate Degradation Genes of *Comamonas* sp. Strain E6. Appl. Environ. Microbiol. 72: 1825.
- Siuta C. 2001. Improving probiotic survival rates. Food technology 55: 36-42.
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* ssp. *lactics*. Appl. Environ. Microbiol. (6): 4351-4356.
- Yilmaz L., Özcan Y.T., Akpınar B.A. 2006. The sensory characteristics of berry-flavoured kefir. Czech J. Food Sci. 24: 26-32.

