



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Aislamiento y caracterización de bacterias y levaduras a partir del consorcio de microorganismos denominado KOMBUCHA

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Gordillo Herrera, Melania Elizabeth

DIRECTOR: Cruz Sarmiento, Darío Javier, Ph.D.

LOJA- ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctor.

Darío Javier Cruz Sarmiento

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación “Aislamiento y caracterización de bacterias y levaduras a partir del consorcio de microorganismos denominado KOMBUCHA” realizado por: Gordillo Herrera Melania Elizabeth, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuando se aprueba la presentación del mismo

Loja, julio de 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Gordillo Herrera Melania Elizabeth declaro ser autora del presente trabajo de titulación: "Aislamiento y Caracterización de bacterias y levaduras a partir del consorcio de microorganismos denominado KOMBUCHA", en la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Darío Javier Cruz Sarmiento Ph.D., director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad".

F.....

Autor: Gordillo Herrera Melania Elizabeth

Cédula: 1104155401

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico:

A Dios.

Por brindarme fortaleza, salud y sabiduría para alcanzar esta meta académica, lo cual me conllevará a una vida profesional, para servir a la sociedad.

A mi Madre.

Por ser mi ángel en el cielo, por protegerme y guiar mis pasos desde donde estés, te amo infinitamente.

A mi Padre.

Por ser el pilar fundamental en mi vida, te dedico este logro, por saber educarme con valores y ser mi ejemplo para llegar a ser la persona que soy hoy, te admiro y amo con todo mi corazón, eres la razón por la cual tengo siempre las fuerzas necesarias para salir adelante.

A mi hermana.

Por ser mi alegría y la razón de mi fortaleza siempre, gracias princesa por tu ternura y amor en todo momento.

A mi familia.

Por sus consejos y apoyo incondicional durante los momentos más difíciles del transcurso de mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios, por la bendición de poder alcanzar esta meta académica tan importante, sé que con su amor y de su mano todo sale bien, gracias Señor, por guiar mi camino siempre hacia lo correcto y por ser mi luz en mis momentos más difíciles.

A mi Papá Francisco, por darme su amor, apoyo y sobre todo gracias al infinito esfuerzo y entrega para que siempre tenga lo mejor, por enseñarme a ser perseverante y a saber el significado de cada sacrificio que debo hacer por alcanzar mis sueños, siendo siempre testigo de cada uno de mis logros. Mi amor, admiración y gratitud siempre para ti.

A mis tíos por siempre estar presentes, de manera especial a mi tío Ángel, por su amor y apoyo durante los momentos difíciles que se presentaron durante mi proceso de formación académica.

Al Ph.D. Darío Cruz, por brindarme la oportunidad de pertenecer al Fungario, por la confianza y enseñanzas para la realización de mi trabajo de titulación, gracias por guiarme para así poder cumplir con la meta propuesta satisfactoriamente.

A mis amigas por brindarme su alegría, apoyo, cariño, por tantos momentos de felicidad, de tristeza y de lucha, esperando que la amistad perdure siempre.

Mi gratitud hacia todas las personas que desde el inicio de mi carrera se mantuvieron presentes apoyándome a través de sus consejos y cariño tanto para mi formación académica como personal.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, de manera especial a los docentes pertenecientes a la Titulación de Bioquímica y Farmacia por sus enseñanzas y disposición durante mi proceso de formación académica.

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| CARÁTULA..... | i |
| APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN..... | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS..... | iii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTOS..... | v |
| ÍNDICE | vi |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| CAPÍTULO I..... | 6 |
| MARCO TEÓRICO | 6 |
| 1.1 Microorganismos y consorcios microbianos..... | 7 |
| 1.1.1 Conorcios microbianos..... | 7 |
| 1.2 Dominio Bacteria | 8 |
| 1.2.1 Familia Acetobacteriaceae | 10 |
| 1.2.2 Funciones y aplicaciones de acetobacterias..... | 10 |
| 1.3 Reino Fungi | 11 |
| 1.3.1 Filo Ascomycota – Levadura | 12 |
| 1.3.2 Funciones y aplicaciones de hongos-levaduras..... | 13 |
| 1.4 Biotecnología aplicada a microorganismos | 13 |
| 1.5 Aislamiento y mantención de microorganismos | 14 |
| 1.6 Técnicas de caracterización morfológica y molecular de microorganismos..... | 17 |
| 1.7 Objetivos..... | 19 |
| 1.7.1 Objetivo General | 19 |
| 1.7.2 Objetivos Específicos | 19 |
| CAPÍTULO II..... | 20 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 2.1 Material de estudio y replicación del consorcio Kombucha | 21 |
| 2.2 Incremento de concentración de microorganismos del consorcio Kombucha..... | 21 |
| 2.3 Aislamiento de Microorganismos desde el medio líquido concentrado..... | 21 |
| 2.4 Caracterización morfológica y molecular de bacterias - levaduras | 22 |
| 2.5 Criopreservación de los aislamientos puros de bacterias y levaduras..... | 24 |
| CAPÍTULO III..... | 25 |
| RESULTADOS | 25 |
| 3.1 Obtención de réplicas jóvenes e incremento de microorganismos desde el consorcio madre Kombucha..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 3.2 Aislamientos obtenidos de bacterias y levaduras del consorcio denominado Kombucha | 26 |
| 3.3 Caracterización morfológica e identificación bioquímica. | 27 |
| 3.4 Caracterización molecular..... | 29 |
| CAPÍTULO IV | 31 |
| DISCUSIÓN..... | 31 |
| CONCLUSIONES | 36 |
| RECOMENDACIONES | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |
| ANEXOS..... | 45 |
| ANEXO 1. Protocolo de extracción de DNA para bacterias: PureLink™ Genomic DNA Mini Kit | 46 |
| ANEXO 2. Protocolo de extracción de DNA para levaduras: PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit | 47 |
| ANEXO 3. Protocolo de purificación de DNA: PureLink™ PCR Purification Kit..... | 48 |

RESUMEN

Kombucha es un té azucarado parcialmente fermentado por diversos microorganismos como bacterias y levaduras que forman una bio-película especial rica en celulosa. Es altamente consumido por su efecto refrescante y por atribuírsele beneficios para la salud. Este estudio busca caracterizar las bacterias y levaduras del consorcio Kombucha. A nivel de laboratorio se replicó e incrementó la concentración de los microorganismos, se usaron medios específicos para el aislamiento de bacterias y levaduras. Seguidamente se realizó una caracterización morfológica diferencial y bioquímica para la confirmación de bacterias Gram +, Gram - y levaduras. *Candida albicans* fue descartado por la prueba de tubo germinal. Todos los aislados fueron sometidos a caracterización molecular y posterior almacenaje. Correlacionando los criterios morfológicos, bioquímicos y caracterización molecular se identificó organismos pertenecientes a la Familia *Acetobacteriaceae* y levaduras del género *Zygosaccharomyces* conocidas y prevalentes del consorcio Kombucha. Otras especies bacterianas como *Baciillus* sp, *Bacillus amyloliquefaciens* y, *Stenotrophomonas maltophilia* así como la levadura *Meyerozyma guilliermondii* fueron identificadas, aunque menos prevalentes, pero reportados en otras fermentaciones. Estos organismos pueden constituirse en potenciales probióticos para la producción o mejoramiento de bebidas

Palabras Claves: bacterias, levaduras, fermentación, aislamiento de microorganismos, PCR, biotecnología.

ABSTRACT

Kombucha is a sugary tea partially fermented by diverse microorganisms such as bacteria and yeasts that form a special biofilm rich in cellulose. It's highly consumed for its refreshing effect and because it has been attributed health benefits. This study seeks to characterize the bacteria and yeasts of the Kombucha consortium. At the laboratory level, the concentration of Kombucha's microorganisms was replicated and increased, specific media were used for bacteria and yeast isolation, following, a differential morphological and biochemical characterization was carried out to confirm Gram + and – bacteria, and yeasts. *Candida albicans* was discarded by germ tube test. All isolates were characterized molecularly and subsequently storage. Correlating the morphological, biochemical and molecular criteria, different organisms belonging to the *Acetobacteriaceae* family and yeasts of the genus *Zygosaccharomyces* known and prevalent of the Kombucha consortium were identified. Other bacterial species such as *Baciillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* and *Stenotrophomonas maltophilia* as well as yeast *Meyerozyma guilliermondii* were identified, although less prevalent, but reported for other fermentations. These organisms could have probiotic potential for the production or improvement of beverages

Key words: *bacteria, yeast, fermentation, isolation of microorganisms, PCR, biotechnology.*

INTRODUCCIÓN

La presente investigación tuvo como objetivos el (1) aislamiento en medios específicos e identificación morfológica y molecular de las bacterias y levaduras desde el consorcio de microorganismos denominado Kombucha y, (2) el mantenimiento de estas cepas en el Cepario HUTPL (F) con fines futuros de bioprospección. Debido a la amplia información sobre los beneficios del té Kombucha, hemos considerado necesario realizar la identificación de este consorcio ya adaptado a nuestro medio local y actualizar datos de la posible nueva diversidad adaptada al consorcio originario de Kombucha.

Este trabajo está separado en cuatro capítulos, los mismos que poseen los siguientes apartados: Capítulo I, contiene el marco teórico en cual describe a los microorganismos (MO) del Dominio Bacteria y Reino Fungi, figurando sus clasificaciones con énfasis en la Familia *Acetobacteriaceae* (bacterias acéticas) y Filo Ascomycota (hongos-levaduras). Se detalla además, las funciones y aplicaciones de cada grupo de estos MO, así como información sobre aislamiento, caracterización morfo-molecular y métodos de conservación de MO. El capítulo II está enfocado en los materiales y métodos, donde se detalla de manera ordenada: la obtención del material de estudio que es el consorcio Kombucha, su replicación a cultivos jóvenes, aislamiento en medios sólidos específicos, caracterización morfológica aplicando tinciones para observar levaduras y bacterias, pruebas bioquímicas de relevancia como oxidasa, ureasa, tubo germinal entre otros, la amplificación molecular de los MO, secuenciación y criopreservación de las cepas en el Cepario HUTPL(F). El capítulo III detalla cada uno de los resultados obtenidos con la metodología aplicada. Por último, en el capítulo IV se hace la discusión y se mencionan las conclusiones obtenidas en nuestro estudio.

Este aporte es de importancia para el Cepario HUTPL (F), ya que permite visualizar a futuro diferentes proyectos aplicados principalmente a biotecnología de MO, industria farmacéutica e industria alimentaria (fermentación de bebidas, bebidas funcionales y medicina alternativa), aumentando el campo investigativo en la UTPL. Es probable que los análisis moleculares y bioquímicos combinados, como en nuestro estudio, proporcionarán información valiosa para comprender mejor el papel de la comunidad microbiana en las propiedades beneficiosas de la bebida. En cuanto a mi contribución profesional como Bioquímico-Farmacéutico, me permite ampliar mis conocimientos de los métodos tradicionales y actuales para una correcta identificación microbiana, así como a resolver los posibles problemas que se puedan presentar durante los procedimientos aplicados

Los avances tecnológicos en la biotecnología microbiana y la necesidad de potenciar el valor nutricional a diferentes alimentos (Segura, Kirchmayr, Flores, & Gschaedler, 2010) ha conducido al desarrollo de métodos cada vez más precisos para la obtención de cepas puras con gran potencial en las industrias de alimentos, farmacéutica, médica, agroindustria y biológica (Rendueles de la Vega & Díaz, 2014), por esta razón hemos considerado importante aislar y caracterizar la diversidad de MO, desde el consorcio microbiano Kombucha. El té de Kombucha es una bebida refrescante ligeramente dulce y ácida ampliamente consumida en todo el mundo. Esta bebida normalmente es obtenida mediante la fermentación de una asociación simbiótica de varias especies de bacterias y levaduras en té negro. Varios estudios afirman que beber Kombucha puede prevenir varios tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares así como promover las funciones hepáticas y estimular el sistema inmunitario (Jayabalan, Malbaša, Lončar, Vitas, & Sathishkumar, 2014).

Cada uno de los objetivos planteados desde el inicio de la investigación fueron realizados de manera ordenada, acompañados de procedimientos adecuados que se llevaron a cabo sin inconvenientes. En el Laboratorio de Conservación y Mantenimiento de MO, perteneciente al Cepario HUTPL (F), se brindaron todas las facilidades necesarias para el progreso de la investigación, materiales, equipos, reactivos etc., así como su respectiva tutela u orientación, que permitió el correcto cumplimiento de todos los objetivos

El consorcio stock de Kombucha fue obtenido de una persona local, quién supo indicar que probablemente el consorcio llegó desde Europa. Este fue replicado en té negro azucarado para favorecer su crecimiento y obtener material suficiente para los experimentos subsecuentes. Una vez se tuvo el material suficiente, se realizó el aislamiento de bacterias y levaduras en medios específicos sólidos a través del método de estriado (Fernández, García de la Fuente, Saéz, & Valdezate, 2010) en el laboratorio. Para la caracterización se empezó con los métodos tradicionales de identificación fenotípica bacteriana tales como: Tinción diferencial Gram, características microscopias de bacterias (ej.: cocos, bacilos, bordes, cadenas, tetradas, racimos (Fernández et al., 2010) y levaduras (ej.: conidios, pseudohifas, blastoconidios) (Mendoza, 2005), con enfoques al microscopio desde aumentos de 10 a 100x, y registrando fotográficamente las colonias. Adicionalmente se realizó pruebas primarias de identificación bioquímica cuyo fundamento es demostrar si el microorganismo es capaz de fermentar azúcares, producir ciertas enzimas, degradar algunos compuestos, producción de compuesto coloreados entre otras (Wolf-Hall & Ngranje, 2017).

Los procedimientos moleculares usados fueron extracción de DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), electroforesis y secuenciación. Los protocolos a emplearse para bacterias y levaduras

en cultivo fueron debidamente estandarizados, en distintos trabajos anteriormente realizados por los miembros del equipo que forman parte del Fungario. Los métodos de criopreservación se realizaron con el uso de agentes crioprotectantes (ACP) que reducen la lesión por congelación de los MO (Jang et al., 2017). Correlacionando los datos morfológicos y moleculares se determinaron especies dentro de 10 cepas puras para bacterias y 18 cepas puras para levaduras, debidamente preservadas a 4°C y -78.1°C.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1 Microorganismos y consorcios microbianos

Los microorganismos (MO), son organismos microscópicos unicelulares esenciales para el funcionamiento de otras formas de vida, así como del planeta y la industria (ej.: alimentaria, farmacéutica y médica) (Montaño, Sandoval, Ricalde, & Sánchez, 2010). La Microbiología está destinada al estudio de los MO, su funcionamiento, diversidad y evolución, abarcando los diferentes tipos de MO y como han ido surgiendo (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2016). En el año de 1978 Woese, propuso un nuevo sistema de clasificación conformado por tres dominios para los MO, que se basa en la estructura lipídica de la membrana, sensibilidad a los antibióticos y lo más significativo la diferencia evidente en el ARN ribosómico. Actualmente estos dominios son: Bacteria, que incluye a procariotas con peptidoglicano en su pared celular, Arquea, procariotas sin peptidoglicano en su pared celular, y Eukarya, conformado por todos los reinos eucariotas (Brooks, Carroll, Butel, Morse, & Mietzner, 2013). Dentro de este último dominio se encuentran los Protozoos, que son organismos móviles que poseen flagelos, pseudópodos o cilios, que pueden ser de vida libre y causar enfermedades al ser humano; las algas microscópicas que son fotosintéticas móviles flageladas o inmóviles, incluyendo las algas verdes, diatomeas, euglenoides etc.; y los hongos que poseen una organización unicelular o filamentosa, con paredes celulares de quitina o celulosa. Los hongos filamentosos están compuestos por hifas septadas que forman el micelio vegetativo (Flores & Condori, 2014). De modo convencional los virus, priones y viroides se consideran también como MO (Montaño et al., 2010).

Los MO viven en poblaciones que interactúan con otras poblaciones formando comunidades microbianas. Las actividades de los MO en las comunidades microbianas pueden afectar considerablemente las propiedades químicas y físicas de sus hábitats (Madigan et al., 2016). Los MO pueden ser tanto benéficos como perjudiciales para los seres humanos, aunque la cantidad de MO beneficiosos (o incluso esenciales) sea mucho mayor que los perjudiciales (Talaro & Chess, 2018).

1.1.1 Consorcios microbianos

Un consorcio microbiano es una asociación natural, que puede estar formado por dos o más poblaciones microbianas, de distintas especies, que funcionan en conjunto como una comunidad, donde todos obtienen beneficio de las actividades de los demás (cita). La asociación manifiesta estilos de vida sintróficos (significa “comiendo juntos”), donde el crecimiento y el flujo cíclico de los nutrientes se transporta de una manera más eficaz que en una población individual (López, Domínguez, & García, 2007). A nivel funcional, un consorcio microbiano mantiene su compatibilidad metabólica y ecológica, cuando las transformaciones ambientales a las que estén

expuestos permitan la coexistencia cercana entre las poblaciones microbianas (Ochoa & Montoya, 2010).

Un ejemplo de consorcios microbianos con importancia biotecnológica es el denominado Kombucha, una asociación simbiótica principalmente de varios tipos de bacterias y levaduras (Dufresne & Farnworth, 2000). Este consorcio microbiano se desarrolla en medio líquido azucarado como el té (Chu & Chen, 2006). Históricamente desde 220 a.C. se lo ha descrito al consorcio como té chino o Manchurian fungus (= Kombucha) extendiéndose su consumo a Rusia, Alemania (durante la segunda guerra mundial) y luego a Francia, y Estados Unidos donde su consumo se volvió muy popular (Dufresne & Farnworth, 2000).

El consorcio Kombucha presenta características singulares de cultivo generándose una masa gelatinosa, similar a una esponja en forma de disco plano, de un color cremoso, de crecimiento y multiplicación rápida (Rubio, 2007). Químicamente Kombucha desde bacterias y levaduras, presenta diversos ácidos orgánicos tales como; ácido acético, glucónico, glucurónico, cítrico, L-láctico, málico, tartárico, malónico, oxálico, succínico, pirúvico, también azúcares, tales como sacarosa, glucosa y fructosa, así como vitaminas B1, B2, aminoácidos, aminos biogénicas, entre otros que son resultado secundario de levadura y metabolitos bacterianos (Yang et al., 2010). Por esta razón, a la bebida Kombucha se la considera como "la última bebida saludable", sin embargo, existe un debate respecto a los beneficios para la salud y la toxicidad de la ingesta de Kombucha (Hartmann, Bursleson, Holmes, & Geist, 2000).

Los MO que se desarrollan en este consorcio son principalmente los géneros bacterianos; *Acetobacter* y *Gluconobacter* (*A. Aceti*, *A. xylinum*, *A. pasteurianus*, y *Gluconobacter oxydans*. *Gluconacetobacter* spp.) los cuales son los que permiten el desarrollo de una bio-película rica en celulosa (Illana, 2007). Además de las bacterias productoras de ácido acético, se ha descrito un amplio grupo de levaduras como: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Mycotorula* y *Mycoderma* (Gramza, Kulczynski, Xindi, & Gumienna, 2016).

1.2 Dominio Bacteria

Las Bacterias son parte de un dominio dentro de los Procariontes. Bacteria y Archaea comparten características de tamaño y organización celular, sin núcleo definido ni organelas (Montaño et al., 2010). Las diferencias entre Bacteria y Archaea se basa principalmente en la composición molecular de sus estructuras, ARN ribosómico y la bioquímica de sus vías metabólicas. Estos MO son unicelulares, logran vivir juntos en grandes colonias y en casi cualquier lugar (ej., dentro del

cuerpo humano, fabrican su alimento o consumen nutrientes del medio en que viven) (Pérez & Mota, 2010). Las bacterias generalmente miden de 1 a 30 μm y estas pueden ser facultativamente aerobias o anaerobias (Brooks et al., 2013), con pared celular bacteriana formada por peptiglicano (red de moléculas de polisacárido) conectados por enlaces polipeptídicos cruzados (Raven et al., 2011). Microscópicamente las bacterias se pueden diferenciar por sus formas; cocos (ovaladas o esféricas), bacilos (bastones o cilíndricos; curvos o rectos) y espirilos (espiral) (Thursby & Juge, 2017).

La identificación bacteriana se logra diferencialmente por uno de los procedimientos más importantes conocido como Tinción de Gram (tinción diferencial). Está técnica permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas (M. Hernández et al., 2014). Las bacterias se han clasificado dentro un dominio ~~reino~~ independiente gracias a datos moleculares por secuenciación de ARN ribosomal 16S (Figura 1) (Geme & Rempe, 2012).

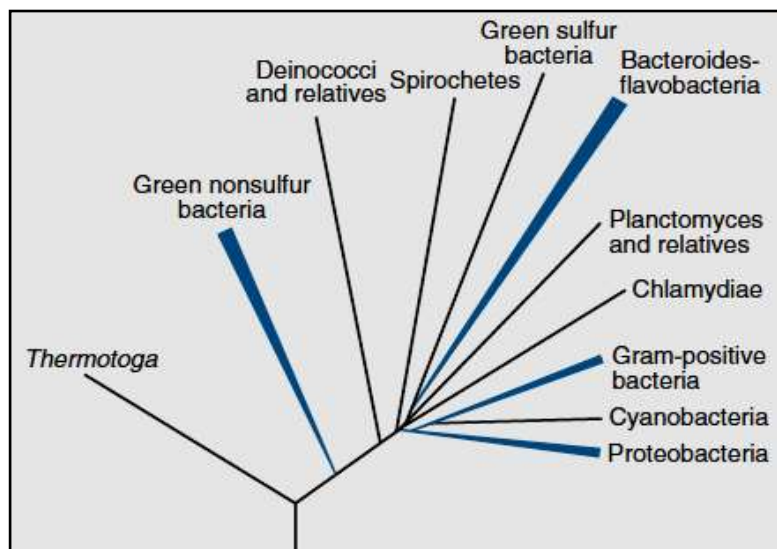


Figura 1. Árbol filogenético del dominio Bacteria basado en la comparación de secuencias del RNA ribosomal 16S
Fuente y elaboración: (Geme & Rempe, 2012)

El dominio Bacteria está dividido en doce linajes, los más antiguos integran a organismos hipertermófilos y anaerobios, y los más actuales están conformados por bacterias Gram-positivas, Cianobacterias y Proteobacterias (Morata de Ambrosini, Martín, & Merín, 2014). Dentro de este último linaje se encuentra la Familia *Acetobacteriaceae* de importancia aplicada en procesos de fermentación de alimentos (Roos & Vuyst, 2018).

1.2.1 Familia Acetobacteriaceae

La Familia *Acetobacteraceae* está incluida taxonómicamente en el orden Rhodospirillales de la clase Alphaproteobacteria (Komagata, Lino, & Yamada, 2014). Mediante la aplicación de técnicas moleculares, esta familia se ha sometido a revisiones taxonómicas y en la actualidad a este conjunto de bacterias pertenecen los géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter*, *Acidonomas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Neoasia* y *Granulibacter*, sin embargo, esta diversidad puede variar por lo que es constantemente investigada (Kersters, Lisdiyanty, Komagata, & Swings, 2006).

Fisiológicamente esta familia de bacterias principalmente aerobias, emplea al etanol como fuente de carbono, manteniéndose estable en un pH óptimo entre 5 a 6.5 (Komagata et al., 2014). Estas bacterias pueden soportar elevadas concentraciones de sacarosa y sus componentes (glucosa y fructosa). Mediante microscopía y por tinción diferencial se observan como bacterias Gram-negativas, con un tamaño entre 0,4 y 4,5 μm de largo y 0,4–1 μm de ancho, y por lo general se muestran individualmente, en pares o en cadenas (Brooks et al., 2013). Se reproducen por bipartición o fisión binaria que consiste en la división de la célula madre en dos células hijas, con funciones y estructuras idénticas a la célula madre (Madigan et al., 2016). Ecológicamente estas bacterias se distribuyen y sobreviven abundantemente en ambientes alcohólicos y ácidos, por lo que generalmente han sido aisladas de vinagre, vino, cerveza, sake, sidra, alimentos fermentados, frutas, flores entre otros materiales alcohólicos (Kersters et al., 2006).

1.2.2 Funciones y aplicaciones de acetobacterias

Las bacterias principalmente son responsables de la descomposición de materia orgánica en elementos más básicos para que estos regresen al suelo o aire. De esta manera se reciclan los compuestos para que puedan volver a ser utilizados para el funcionamiento de los ecosistemas (Tiwari et al., 2015). Otra función clave que llevan a cabo las bacterias es la capacidad de simbiosis que pueden realizar muchas especies de este dominio entre bacterias y otros organismos para diversos beneficios ambientales (Guerrero, 2001). Sin embargo, no todas las bacterias son beneficiosas, existen grupos de las mismas que son patógenas, debido a sus efectos químicos y gran capacidad de diseminar enfermedades infecciosas (Brooks et al., 2013).

Biotechnológicamente las bacterias se utilizan con múltiples fines, como por ejemplo los médicos para producción de antibióticos, vacunas, cosméticos, entre otros. En la industria alimentaria son muy aprovechadas por su capacidad fermentadora (Wink, 2011). Con esta capacidad de

fermentar está principalmente la familia *Acetobacteriaceae*, quienes transforman el alcohol en ácido acético (Kersters et al., 2006), siendo empleadas en la producción de vinagre, vitamina C, celulosa y fermentación de alimentos naturales como; cerveza Lambic, Kéfir de agua y Kombucha. No obstante, estas capacidades son incrementadas cuando actúan en simbiosis con otros MO, como las levaduras. Estas bacterias deben ser estudiadas en conjunto con sus consorcios, debido a que muchas son consideradas saboteadoras en fermentaciones alcohólicas como vino, cerveza y la sidra (Roos & Vuyst, 2018).

1.3 Reino Fungi

Son organismos Eucariontes, uni o multinucleados, no móviles que presentan una pared celular a base de quitina (Mueller, Bills, & Foster, 2004). Este grupo es grande y diverso con más de unas 100 000 especies descritas donde la mayoría han sido reportadas como terrestres. Expertos estiman un recuento mucho más alto, tal vez entre los 1.5 millones (Talaro & Chess, 2018). Tienen una distribución cosmopolita y cumplen funciones ecológicas importantes como saprofitos, simbioses, parásitos o hiperparásitos (Kuhar, Castiglia, & Papinutti, 2013). Ecológicamente los hongos crecen en lugares con pH de más o menos 5.6 pero varios de ellos pueden tolerar ambientes donde el pH varía de 2 a 9 (Salomon, Berg, & Martin, 2013). Estos organismos crecen como filamentos multicelulares llamados hifas que forman una masa enmarañada denominada micelio, que luego en algunos grupos forman estructuras llamadas cuerpos fructíferos (hifas fuertemente compactadas), que muchas veces se pueden observar a simple vista (Piepenbring, 2015), la estructura fértil llamada himenio forma los orgánulos reproductores, como basidias, ascas, esterigmas y esporas, necesarios para la reproducción (Watkinson, Boddy, & Money, 2016).

En los últimos años, ha surgido una gran necesidad por el estudio de la clasificación de los hongos debido al número progresivo de patógenos oportunistas y por su uso en la industria (Bial, 2002). Antiguamente, la clasificación de estos organismos estaba fundamentada en caracteres observables, es decir macroscópicamente (ej., color, tamaño de fructificaciones) y microscópicamente (ej., esporas, hifas, etc.) (Watkinson et al., 2016). La actualización y evolución de los estudios de ADN dio lugar a la secuenciación y uso de filogenias para posicionar los diferentes grupos de hongos descritos en la taxonomía clásica, dando lugar a una nueva reclasificación posicionando a 10 filos o grupos como miembros del Reino Fungi (Hibbett et al., 2011). Cuatro de estos filos son considerados los más importantes: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota. Los Ascomycota un grupo importante con forma levaduriforme puede comprender el 50% de hongos conocidos y un 80% de hongos patógenos, adicionalmente

también existen hongos en los que no se conoce su reproducción sexual, estos constituyen un grupo heterogéneo llamado Deuteromicetos, son imperfectos o mitosporicos y constituyen el segundo grupo más numeroso, incluidos patógenos humanos (Seifert, Morgan-Jones, Gams, & Kendrick, 2011).

1.3.1 Filo Ascomycota – Levadura

El filo Ascomycota es el grupo más extenso del reino Fungi, se estima que se incluyen más de 32.000 especies, pero se asume que aún faltan por descubrirse más especies. El nombre deriva de los términos griegos Askos = bolsa o saco y Mykes = hongo (Piepenbring, 2015). Entre sus características destacan sus formas que pueden ser muy variadas (copa, disco, botón, dedos y colmena entre otras), adicionalmente se caracterizan por la presencia de estructuras reproductoras microscópicas denominadas ascas. Las ascas se encuentran formadas por una célula especializada con forma de saco, y en su parte interior se forman las ascosporas (esporas) (Madigan et al., 2016). Los ascomicetos son muy diversos y a más de las formas antes mencionadas, se incluyen formas imperfectas como mohos-azul/verdoso o levaduriforme, o especies de levaduras teleomorfas con capacidad de fermentación o descomponedores de alimentos (Watkinson et al., 2016).

Las levaduras agrupan a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas (ej., *Candida albicans*), así como especies de gran importancia como las del género *Saccharomyces* que desde la antigüedad se han utilizado en la elaboración de cerveza, pan y vino (Kurtzman, Fell, & Boekhout, 2011). Presentan gran diversidad en relación a forma, tamaño, y color. Morfológicamente son ovoideas, pero también pueden observarse en forma esférica, elíptica cilíndrica o alargada, alcanzando un diámetro de 4 a 5 μm . Experimentalmente en medios de cultivo específicos las colonias son pastosas, brillantes, lisas, de color blanco, crema o ligeramente beige (Suárez, Garrido, & Guevara, 2016).

Las levaduras pueden ser diploides o haploides, es decir pueden reproducirse de manera sexual (teleomorfo) o asexual (anamorfo), así es que cuando la reproducción asexual es dada directamente por la formación de conidios (esporas), muchas veces sin hifas ni cuerpo fructífero (Johnson, 2013). Por el contrario, cuando la reproducción es sexual en una zona del cuerpo fructífero se forma un tejido fértil, en el cual se forman unas células con forma de bolsa conocidos como ascos (con ascosporas) siendo la principal característica de este grupo. Las ascosporas al ser liberadas por un orificio denominado opérculo, germinan en algunos casos creando micelios

haploides uninucleados y en otros casos fusionándose directamente entre células unicelulares (Kuhar et al., 2013).

1.3.2 Funciones y aplicaciones de hongos-levaduras.

El rol principal de los hongos en el medio ambiente es ser descomponedores que absorben nutrientes de desechos orgánicos, lo hacen digiriendo el alimento fuera de su cuerpo a través de fuertes enzimas hidrolíticas secretadas sobre el sustrato y así los complejos compuestos orgánicos son convertidos en moléculas más sencillas absorbibles (Ruiz, 2001).

Bajo estos conocimientos muchos de los hongos filamentosos se han convertido en fuentes para la biotecnología por su gran cantidad de productos; metabolitos primarios (ej.: ácido cítrico), metabolitos secundarios (ej.: antibióticos) y enzimas (Watkinson et al., 2016). Por lo que los hongos son excelentes modelos para estudios; bioquímicos, fisiológicos, genéticos, e inclusive estudios de evolución en Eucariontes (Bodger, 2012). Dentro de los hongos más conocidos en el grupo de Ascomycetes como modelos para investigaciones, gracias a su potencial biotecnológico son el *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp, sin embargo debido a la diversidad de hongos existentes especialmente en los trópicos, se han incorporado nuevas especies (Aguirre, Ulloa, Aguilar, Cifuentes, & Valenzuela, 2014).

Además de los hongos anteriormente mencionados, las levaduras se consideran con amplio potencial industrial gracias a cambios fisiológicos que desarrollan debido al estrés oxidativo y la respuesta antioxidante (Mejía, Montoya, Cortés, & Saavedra, 2016). Actualmente se incluyen estos organismos en procesos de fermentación de bebidas alcohólicas y varios alimentos conociéndose principalmente especies del género *Saccharomyces* quienes suelen ser incorporados como probióticos mejorando el producto y potenciando su valor nutricional (Segura et al., 2010).

1.4 Biotecnología aplicada a microorganismos

La biotecnología no es considerada como una ciencia, pero si un área multidisciplinar para intentar abordar desafíos en diversos campos científicos en beneficio principalmente del ser humano y el medio ambiente (Mauriz, Ordoñez, Prieto, & González, 2000). Este componente investigativo ha venido incorporando desde ya varios años atrás a los MO por sus grandes aportes de componentes que permiten mejorar la producción de alimentos y bebidas como por

ejemplo por medio de fermentación o biocatálisis, biotecnología ambiental e investigación en biología y biomedicina (Johnson, 2013).

El uso de las bacterias entre los estudios reportados más destacados está la fermentación láctica, utilizada en la elaboración de derivados lácteos (ej.: yogurt, queso, etc.), empleando bacterias lácticas del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, potenciadas o modificadas muchas veces a través de la biotecnología ya que se encuentran naturalmente en la leche sin ser esterilizada o pasteurizada (Wink, 2011). Otro proceso como la fermentación acética en cual intervienen bacterias de la Familia *Acetobacteraceae*, permite por ejemplo a partir del vino producir el vinagre por el proceso oxidativo que genera, en donde el etanol es oxidado hasta convertirse en ácido acético (Roos & Vuyst, 2018). En la industria farmacéutica, la biotecnología ha influenciado en la obtención de vacunas, gracias a tecnología como por ejemplo la del ADN recombinante que ha permitido la elaboración de vacunas tanto para virus como bacterias. Por otra parte, en la agricultura la fijación del nitrógeno atmosférico es importante y es realizada por bacterias principalmente de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, quienes generan simbiosis con plantas como las leguminosas. Dentro de las bacterias hay especies como *Alcaligenes eutrophus* que puede producir compuestos biodegradables como polihidroxicanoatos que son plásticos biodegradables (Rendueles de la Vega & Díaz, 2014).

Otros organismos que están tomando fuerza en la biotecnología son los hongos, de quienes se reportan distintas investigaciones científicas por lo que cada vez es más importante descubrir nuevas especies con potencial industrial (Piepenbring, 2015). La industria alimentaria es la que más involucrado a los hongos como facilitadores de muchos procesos, así están las levaduras aplicadas en la fermentación: de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*), vino (*Saccharomyces ellipsoideus*), o la maduración de quesos (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium candidum* y *Geotrichum candidum*) e incluso especies como *Agaricus bisporus*, *Pleurotus*, *Tricholoma matsutake* conocidos generalmente como champiñones y usados en cocina (Pitt & Hocking, 2009). Así mismo hay productos eficientes en la medicina extraídos u obtenidos a partir de hongos como por ejemplo la penicilina desde *Penicillium notatum* o *P. chrysogenum*, o la cefalosporina desde *Cephalosporium chysogenum*, antibióticos utilizados ampliamente para control bacteriano (Adrio & Demain, 2003).

1.5 Aislamiento y mantención de microorganismos

Una de las tareas de la biotecnología y microbiología, es desarrollar procedimientos que permitan aislamiento y selección de MO de interés biotecnológico, industrial o médico combinando actividades de microbiología, química, bioquímica e ingeniería (Mateos, 2014). Es por ello que se

debe partir la exploración de bioprospección con los cultivos de MO desde muestras (ej.: suelos, alimentos, líquidos corporales entre otros), donde se origina intencionalmente el desarrollo de MO (ej.: bacterias, hongos, levaduras) en medios de cultivo específicos y condiciones de laboratorio controladas para posterior manipulación (Silva, Hiroto, Junqueira, Silveira, & Romeiro, 2013).

Los diferentes medios de cultivo para MO, no sólo deben considerar el aspecto nutricional que proveen o su consistencia líquido o sólido, además de esto se debe ajustar el pH, concentración de sales, además de la temperatura de incubación así como la aireación o la luminosidad acorde a las especies y sus nichos ecológicos (Brooks et al., 2013).

Hay diversos métodos y técnicas para aislamiento y purificación de MO donde las más sobresalientes tenemos:

- ✚ Siembra por estría en placa Petri.
- ✚ Vaciado en placa.
- ✚ Cultivo por dilución seriada y agitación.
- ✚ Alisamiento con varilla angular de vidrio.
- ✚ Aislamiento con aplicadores de algodón.
- ✚ Siembra por picadura (Olivas & Alarcón, 2004).

El método más sencillo y utilizado para obtener cultivos puros, es el de siembra por estría en placa Petri, demostrándose efectivos para el aislamiento de bacterias y hongos (levaduras) (Tiwari et al., 2015). La técnica requiere un asa de siembra, con la que se toma una muestra de la población en estudio y a continuación se realizan estrías sobre la superficie del medio sólido preparado en una caja Petri. Este método permite que conforme se van haciendo las estrías en forma de zigzag con el asa vaya disminuyendo la concentración de MO. A continuación, las cajas Petri con nuestra siembra se incuban a temperaturas adecuadas de acuerdo a los requerimientos de las especies en estudio (Silva et al., 2013).

Una vez que se realiza los diferentes aislamientos, se requiere una correcta mantención de MO, donde se utiliza principalmente la criopreservación, cuyo objetivo es mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (Ávila et al., 2006). Gracias a los avances que se han venido alcanzando en el área biológica, médica e industrial, por medio de los MO con énfasis en la biotecnología y la investigación científica, ha surgido la necesidad de la creación de colecciones de cultivos *in vivo* para así facilitar la continuidad de procesos y experimentos (Tiwari et al., 2015). Una variedad de factores puede influenciar en la mantención o criopreservación de MO (ej.: especies, tamaño, forma, temperatura, pH, etc.). Aunque a veces

se ha observado una buena supervivencia de microbios congelados sin un aditivo como un agente crioprotector (ACP), este último aumenta la supervivencia (Hubálek, 2003). El ACP es un fluido que reduce la lesión por congelación del proceso de criopreservación, deben ser capaces de penetrar en las células y tener baja toxicidad (Jang et al., 2017)

Acorde a lo mencionado es importante que se mencione que los métodos de preservación pueden ser de corto y largo plazo:

Métodos a corto plazo:

1.- Subcultivo: inoculación del cultivo en un medio especial para su crecimiento y almacenamiento, el cultivo se replica cada vez a un medio fresco, antes de que el cultivo pierda sus capacidades de replicación (Ávila et al., 2006).

2.- Inmersión en Aceite: diversas bacterias sobreviven en aceite mineral estéril, la bacteria crece en tubo sobre la superficie del agar, hasta lograr fase logarítmica ó esporulación, se cubre con aceite en condiciones de completa asepsia (Instituto de Biotecnología, 2016).

3.- Congelación ordinaria: la temperatura oscila de 0 a 20°C, su éxito depende de la especie de MO, no es recomendable cuando la temperatura cae por debajo de los 0°C, el líquido extracelular se empieza a congelar y forma cristales de hielo (Rendueles de la Vega & Díaz, 2014).

4.- Por baja congelación: almacenamiento a -70°C, para gran variedad de MO (bacterias, hongos, protozoos, micoplasmas y virus), se basa en la preparación de una suspensión celular en caldo con glicerol (30 - 50% v/v) (Tiwari et al., 2015).

5.- Secado: consiste en remoción del agua y prevenir la rehidratación, utilizado para la conservación de hongos (Jang et al., 2017).

6.- Método en suelo, Arena; algunas especies de hongos sobreviven alrededor de cinco años, sin pérdida de sus características (Adrio & Demain, 2003).

7.- Métodos adicionales como: discos de gelatina: para conservación de bacterias heterótrofas; Silica Gel (levaduras, hongos y bacterias) y perlas de vidrio o porcelana porosas: variedad bacterias heterotróficas (Silva et al., 2013).

Métodos a largo plazo:

1.- Liofilización: método efectivo para variedad de bacterias y bacteriófagos, mantenimiento de la viabilidad por más de 50 años y preparación de réplicas simultáneamente, a través de ampollas o viales. De acuerdo a las necesidades e infraestructura de cada laboratorio, hay diversos tipos de liofilizadores (Zimbro, Power, Miller, Wilson, & Johnson, 2009).

2.- Ultracongelación o almacenamiento en nitrógeno líquido: congelación a -140°C (fase vapor) y -196°C (fase líquida), para la preservación de MO y cultivos celulares que no ha sido posible preservar por otros métodos, este método universal es empleado para preservación de bacterias, hongos, algas, virus, protozoos, levaduras, plantas, células animales con adición de un ACP (Instituto de Biotecnología, 2016).

1.6 Técnicas de caracterización morfológica, bioquímica y molecular de microorganismos

La caracterización o identificación de MO, es el conjunto de métodos y procedimientos, que nos permiten establecer la identidad de uno o varios MO en estudio. Para establecer la identidad de un MO se los separa en dos categorías: características fenotípicas que se basa en lo que podemos observar con facilidad (ej.: aspecto, color, forma) y características genotípicas que incluye la composición genética del MO, naturaleza de sus genes y ácidos nucleicos que lo constituyen (Forbes, Sahm, Weissfeld, & Trevino, 2009).

Las características fenotípicas y genotípicas permiten accionar respuestas en los diferentes organismos a diferentes ambientes y luego esto permitirá que estas características especiales permitan una clasificación dentro de tres criterios fundamentales:

Criterio Morfológico:

Mediante análisis fenotípico se considera características macroscópicas: donde la morfología de los MO como por ejemplo creciendo en colonias es fundamental en la identificación preliminar y diferenciación de los mismos. Se examina colonias de cultivos frescos en medios selectivos o específicos, lo cual es muy importante en aislamiento de MO, ya que un cultivo puro debería estar compuesto por un solo tipo de MO, las colonias de una misma especie, tienen en común tamaño, forma, consistencia e incluso color (Fernández et al., 2010). Un estudio microscópico en fresco y tras tinciones revela la forma, manera de agruparse, estructura y tamaño (Brooks et al., 2013).

El uso de tinciones es el primer paso, para la identificación de MO como las bacterias, hongos y levaduras. Tenemos tinciones simples (ej.: tinta china, azul Metileno de Loeffler, Azul de lactofenol) e hidróxido de potasio al 10% (KOH), estos permiten observar y diferenciar tipos de hongos, levaduras. Otras tinciones diferenciales emplean varios colorantes combinados como la técnica de Tinción de Gram y Ziehl-Neelsen, que permitirán dilucidar sobre bacterias Gram + y - (Hernández et al., 2014)

Criterio Bioquímico:

Estas pruebas permiten determinar características metabólicas de los MO, algunas de estas pruebas son rápidas, debido a que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura puede variar de segundos a unas pocas horas. Otras requieren para su lectura el crecimiento del MO (incubación de 18 a 48h) (Silva et al., 2013). En general, se trata de reacciones enzimáticas. Estas pruebas se clasifican en: pruebas que se utilizan en la identificación preliminar: catalasa y oxidasa; pruebas rápidas: hidrólisis del hipurato, β -galactosidasa, aminopeptidasa, ureasa, e indol; pruebas lentas (lectura de 18 a 48h): óxido- fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, voges-Proskauer, agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, ADNasa, entre otras (Fernández et al., 2010).

Criterio Molecular:

La caracterización molecular involucra técnicas moleculares como la PCR (Polymerase Chain Reaction) y posterior secuenciación. Estas pruebas son sencillas, precisas y altamente confiables (Mukadam, Punjabi, Deshpande, Vaidya, & Chowdhary, 2016) Esta caracterización está basada en el estudio de secuencias de ADN genómico, usando secuencias cortas específicas de oligonucleótidos (Wink, 2011).

Para la caracterización bacteriana los criterios basados en biología molecular, buscan principalmente la secuenciación de la región 16S rRNA (Geme & Rempe, 2012), debido a que los genes de esta región contienen algunas secuencias que han sido altamente conservadas a lo largo del curso de la evolución y otras que son altamente variables. Este marcador *housekeeping* está presente en todas las especies de bacterias, provee información útil y rápida sobre su identificación y filogenia, a través de la comparación con bases de datos conocidas, constituyendo así el análisis del 16S rRNA como marcador inicial y en muchas situaciones suficiente para efectuar una identificación confiable (Fernández et al., 2010).

Los cebadores universales para bacterias más empleados son 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; Hogg & Lehane, 1999) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT; Turner, Pryer, Miao, & Palmer, 1999) y la combinación 341F (CCTAC GGGAGGCAGCAG; Muyzer, De Waal, & Uitterlinden, 1993) y 907R (CCGTCAATTCMTTGTGRTT; Adl et al., 2005).

De igual manera para la identificación molecular de hongos filamentosos y levaduras se han hecho pruebas de ADN con secuencias específicas, uno de los marcadores más utilizado y que es considerado como barcode universal es la región ITS (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer), debido a su factible obtención e información disponible en bases de datos que facilitan la relación filogénica en diferentes niveles (Seifert et al., 2011). Se usan múltiples primers dependiendo del grupo de hongos, sin embargo los primers universales son: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'; White et al., 1990), que permiten obtener la región ITS-5.8S y 18S parcial. Para levaduras dos regiones ribosomales son secuenciadas: el dominio D1/D2 de la Subunidad Grande Ribosomal (LSU, proveniente por sus siglas en inglés) (White et al., 1990) que permite identificación de levaduras del grupo Ascomycetos y la región ITS-5.8S (ITS1-5.8S -ITS2 de rDNA), que permite identificar levaduras del grupo Ascomycetos y Basidiomycetos (Vásquez, Ramirez, & Zulma, 2016)

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Identificar las bacterias y levaduras desde el consorcio de microorganismos Kombucha con fines de bioprospección independiente.

1.7.2 Objetivos Específicos

- ✚ Aislar en medios específicos sólidos las bacterias y las levaduras presentes en la comunidad de la Kombucha.
- ✚ Caracterizar morfológica y molecularmente las bacterias y las levaduras aisladas desde la Kombucha.
- ✚ Mantenimiento de las cepas aisladas en el Cepario HUTPL (F).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material de estudio y replicación del consorcio Kombucha

El consorcio madre de MO denominado Kombucha fue obtenido desde un contacto personal quien replicó el consorcio en té negro para consumo personal.

- *Preparación del medio de cultivo (Té negro) e inoculación*

La preparación de este medio de cultivo se hizo con el fin de obtener réplicas jóvenes a partir del consorcio madre Kombucha. En un matraz Erlenmeyer estéril se colocó 1 Litro de agua destilada con azúcar (209,3 g sacarosa) y se calentó hasta su punto de ebullición dejando homogeneidad en la mezcla. Finalmente se colocó dos sobres de té negro, y posterior filtrado (papel filtro) para evitar impurezas.

- *Inoculación del consorcio (Kombucha)*

Se dispensó 25 mL de medio de cultivo (Té negro) en frascos de vidrio y a partir del cultivo madre Kombucha, se cortó fracciones (p/v) pequeñas de la bio-película microbiana y se las inoculó en cada uno de los frascos (Gramza et al., 2016). Se monitoreó durante 7 días el crecimiento y desarrollo de las características propias que posee el consorcio y la bebida Kombucha.

2.2 Incremento de concentración de microorganismos del consorcio Kombucha.

El incremento de concentración de MO del consorcio Kombucha, se lo realizó con el objetivo de aumentar la cantidad de las bacterias y levaduras del consorcio. Previamente se hizo una selección de las mejores réplicas jóvenes del consorcio Kombucha, basándonos en las características la bio-película tales como: forma de disco plano y color blanco cremoso. Se preparó medio líquido de enriquecimiento GYP (Extracto de Levadura-Peptona-Dextrosa), en la cabina de flujo laminar se hizo fragmentos pequeños de las réplicas jóvenes del consorcio y se los inoculó en el medio líquido GYP, se dejó en agitación a 25 r.p.m. a temperatura ambiente, por 48h.

2.3 Aislamiento de Microorganismos desde el medio líquido concentrado

Luego de 48h de incubación en las condiciones arriba descritas para incrementar la concentración de MO, se aislaron los componentes del consorcio por el método de siembra por estría en placa Fernández et al., 2010). Para las bacterias se sembró 20 cajas Petri con medio sólido Yeast Mold

Agar (DIFCO), se incubó a 35°C por 48 horas y para levaduras se sembró 20 cajas Petri con medio sólido Sabouraud Dextrosa (DIFCO) y se incubó a 27°C por 48 horas.

2.4 Caracterización morfológica y molecular de bacterias - levaduras

Para la obtención de las características macroscópicas superficiales para bacterias se observó; forma, color y textura de las colonias. Para las levaduras se evaluaron algunas características macroscópicas como, por ejemplo: color, consistencia y forma de la colonia. Luego de la Tinción diferencial Gram (Fernández et al., 2010), se analizó cada una de las cepas mediante observación al microscopio (Olympus BX51), basándonos en la coloración retenida. Para bacterias se consideró la forma de las células (cocos, bacilos, espirilos, cápsulas para bacterias) y para hongos: presencia o ausencia de hifas, conidios, pseudohifas, blastoconidias, ballistoconidias (Mendoza, 2005).

Las estructuras observadas al microscopio fueron enfocadas con los objetivos de 10 a 100x y se registró fotográficamente cada una de ellas. Una vez observadas las características de las colonias se realizaron subcultivos (Silva et al., 2013), hasta obtener cultivos completamente puros. En los medios de cultivo para levaduras se utilizó cloranfenicol al 1% (antibiótico bacteriostático), para evitar contaminaciones (Tripathi, 2008).

Adicional a la diferenciación morfológica, se realizaron pruebas bioquímicas a partir de los aislamientos puros: para bacterias se hizo la prueba de oxidasa y catalasa; con el fin de diferenciar a las bacterias del ácido acético de bacilos Gram negativos de la Familia Enterobacteriaceae y entre cocos Gram positivos (Brooks et al., 2013). Para levaduras, se realizó la prueba de ureasa que pone en evidencia la actividad de la enzima ureasa presente en algunas bacterias (Fernández et al., 2010) con el fin de verificar si la cepa pura y aislada corresponde a una levadura como tal. Finalmente la prueba de tubo germinal; Duarte, Marquez, Araujo, & Pérez, 2002) para descartar *Candida albicans*, observándose al microscopio con objetivo 40x.

Para la caracterización molecular, la preincubación se realizó desde los aislamientos puros, donde se inoculó overnight nuevamente las cepas de bacterias y levaduras en medio líquido GYP, en tubos de 1.5 ml, por 72 h, con el fin de incrementar la concentración de cada una de las cepas. Las temperaturas óptimas de overnight fueron 35°C y 27°C para bacterias y para levaduras, respectivamente.

Se realizó la extracción de DNA (Anexo 1) de las cepas puras de bacterias obtenidas, el proceso se siguió de acuerdo a las normas de manufactura para PureLink® Genomic DNA Mini Kit

(Invitrogen), obteniendo un producto final de 100 μL de DNA por muestra. El DNA total obtenido se amplificó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), usando los primers universales: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', Hogg & Lehane, 1999) y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', Turner, Pryer, Miao, & Palmer, 1999), a una concentración de 25 pmol, y así obtener la regiones del gen 16S rRNA. Las condiciones de la PCR fueron como se describe: 35 ciclos, empezando con una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, cada ciclo contiene un paso de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, las temperaturas de anillamiento según combinación de primers es a 50°C, por 30 segundos, una extensión a 72°C por 2 min y una extensión final a 72°C por 10 min, se lo realizó en un termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler. El volumen de reacción de la PCR fue de 25 μL : 2.5 μL de 10x Pfx amplification buffer, 17.4 μL ddH₂O (agua desionizada, destilada), 0.8 μL de dNTPs (10nM), 0.5 μL de mM MgSO₄, de cada primer 0.8 μL , 0.8 μL de DMSO, 0.2 μL de Platinum Pfx® de Invitrogen y 2 μL de DNA.

Posteriormente, se realizó la extracción de DNA (Anexo 2) de las cepas puras de levaduras obtenidas, el procedimiento realizó siguiendo las condiciones descritas por el fabricante para PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen). Se obtuvo un producto final de 50 μL de DNA por muestra. Se continuó con la amplificación del DNA total, por PCR, empleando los primers universales: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990) y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3', White et al., 1990), a una concentración de 25 pmol. De tal manera que se obtuvo la región en estudio ITS1-5.8S-LSU parcial (D1/D2) (White et al., 1990). Las condiciones de PCR se realizaron como se detalla: 35 ciclos, empezando con una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos, cada ciclo contiene un paso desnaturalización a 95°C por 30 segundos, las temperaturas de anillamiento según la combinación de primers es a 55°C por 45 segundos, una extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 5 min, en un termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler. El volumen de reacción de la PCR con el que se trabajó fue 25 μL : 11 μL ddH₂O, 5 μL Buffer Green, 1.5 μL MgCL₂, 0.5 μL dNTPs, 0.5 μL de cada primer, 0.8 μL BSA (albúmina de suero bovino) al 10% y 0.125 μL GoTaq® DNA Polymerase y 2 μL de DNA.

Además, en cada amplificación se realizó el uso de controles positivos y negativos. Los productos de la PCR se comprobaron por electroforesis con geles de agarosa al 1% más 1x GelRed® Safe Nuclied Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, USA), las condiciones de corrida fueron; 128V, 3000mA por 20min. Se utilizó 2 μL de marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen), en el gel se cargó 2 μL del producto de PCR más 3 μL de azul bromo fenol para bacterias y para levaduras directamente 3 μL del producto de PCR. El buffer de corrida fue SB 1X.

Los productos de PCR tanto de bacterias y levaduras fueron purificados con el protocolo (Anexo 3) para PureLink™ PCR Purification Kit, obteniendo un volumen final de 60 µL. Se comprobó nuevamente la calidad de DNA por electroforesis (ver arriba).

Los productos positivos fueron enviados a secuenciar en Macrogen (Seoul-Korea). Una vez obtenida las secuencias, se procedió a realizar una comparación con las secuencias de nuestro estudio y las que se encuentran en la base de datos GenBank, NCBI usando la herramienta BLAST-SEARCH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y buscando las similitudes a nuestras secuencias con sus porcentajes más elevados.

2.5 Criopreservación de los aislamientos puros de bacterias y levaduras

Para preservación de los MO, se preparó tubos con medio de cultivo sólido para bacterias Yeast Mold Agar (DIFCO) y para levaduras Sabouraud Dextrosa Agar (DIFCO), en pico de flauta (Cano, 2006). A partir de los cultivos puros en placa Preti, con asa se tomó una considerable cantidad de población tanto de bacterias como levaduras y se inoculó en forma de estría en la superficie del agar inclinado, se incubó hasta lograr crecimiento, posteriormente se cubrió los tubos con glicerol estéril (Jang et al., 2017) en condiciones de completa asepsia, dejándolos verticalmente a una temperatura de almacenamiento de 4°C. A continuación se preparó medio líquido GYP más glicerol (30% v/v; Ávila et al., 2006), en crioviales se suspendió 1500 µL del medio y desde los aislamientos puros se tomó inóculos de bacterias y levaduras, suspendiéndolos en el medio: Se almacenó a una temperatura de -78.1°C

CAPÍTULO III
RESULTADOS

3.1 Obtención de réplicas jóvenes e incremento de microorganismos desde el consorcio madre Kombucha.

En la Figura 2A se observa la formación característica de la bio-película del consorcio Kombucha, esta réplica obtenida se seleccionó para inocular en medio líquido enriquecido GYP, como se observa en la Figura 2B existe incremento de bacterias y levaduras.

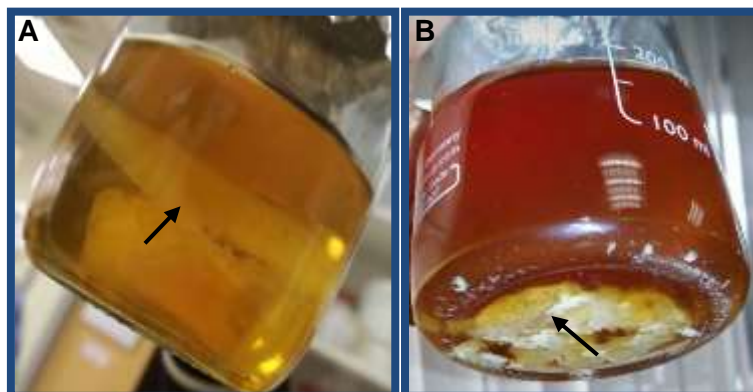


Figura 2: **A)** Observación macroscópica de un ejemplar de las réplicas jóvenes de Kombucha, las flechas indican la formación del disco plano, de color cremoso (bio-película de celulosa) y **B)** la flecha indica la fermentación precipitada de microorganismos al fondo del Erlenmeyer

Fuente y elaboración: Autora

3.2 Aislamientos obtenidos de bacterias y levaduras del consorcio denominado Kombucha

A partir del incremento de MO en medio líquido (GYP), se obtuvo 10 cultivos puros de bacterias (Tabla 1, Figura 3A) y 18 cultivos puros de levaduras (Tabla 2, Figura 3B), los 12 cultivos restantes fueron eliminados por contaminación con hongos y bacterias.

Tabla 1. Aislamientos de bacterias y códigos asignados por el HUTPL (F).

| N° | MEDIO DE CULTIVO YM (Yeast Mold Agar) | AISLAMIENTOS CÓDIGO CEPARIO UTPL |
|----|--|-------------------------------------|
| 1 | YM | KB001 |
| 2 | YM | KB002 |
| 3 | YM | KB003 |
| 4 | YM | KB004 |
| 5 | YM | KB005 |
| 6 | YM | KB006 |
| 7 | YM | KB007 |
| 8 | YM | KB008 |
| 9 | YM | KB010 |
| 10 | YM | KB011 |

KB= Kombucha-bacteria

Fuente y elaboración: Autora

Tabla 2. Aislamientos de levaduras y códigos asignados por el HUTPL (F).

| N° | MEDIO DE CULTIVO SDA (Agar Sabouraud Dextrosa) | AISLAMIENTOS CÓDIGO CEPARIO UTPL |
|----|--|-------------------------------------|
| 1 | SDA | KL001 |
| 2 | SDA | KL002 |
| 3 | SDA | KL003 |
| 4 | SDA | KL004 |
| 5 | SDA | KL005 |
| 6 | SDA | KL006 |
| 7 | SDA | KL008 |
| 8 | SDA | KL009 |
| 9 | SDA | KL010 |
| 10 | SDA | KL011 |
| 11 | SDA | KL012 |
| 12 | SDA | KL013 |
| 13 | SDA | KL014 |
| 14 | SDA | KL015 |
| 15 | SDA | KL016 |
| 16 | SDA | KL017 |
| 17 | SDA | KL018 |
| 18 | SDA | KL019 |

KL= Kombucha-levadura

Fuente y elaboración: Autora

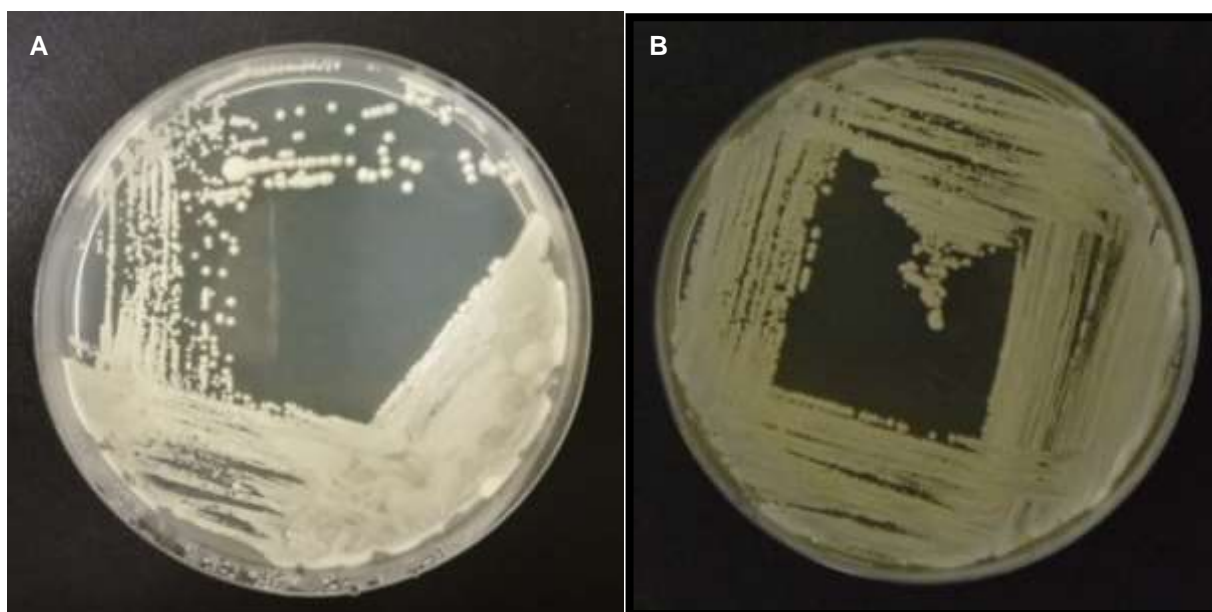


Figura 3: Observación macroscópica; A) Ejemplar aislamiento de bacterias según morfología colonial se observa colonias de superficie lisa, con bordes irregulares corresponde al código KB006 y **B)** Ejemplar de aislamiento de levaduras corresponde al código KL014, se observa colonias blanquesinas, pastosas, ovoideas
Fuente y elaboración: Autora

3.3 Caracterización morfológica e identificación bioquímica.

Acorde a las características microscópicas se determinó bacterias Gram + y – (Figura 4), además de visualización de levaduras y ausencia de tubo germinal descartando *Candida albicans* (Figura

4). Los datos muestran bacterias catalasas + y oxidasas -, así como levaduras negativas para ambas pruebas (Tabla 3 y 4).

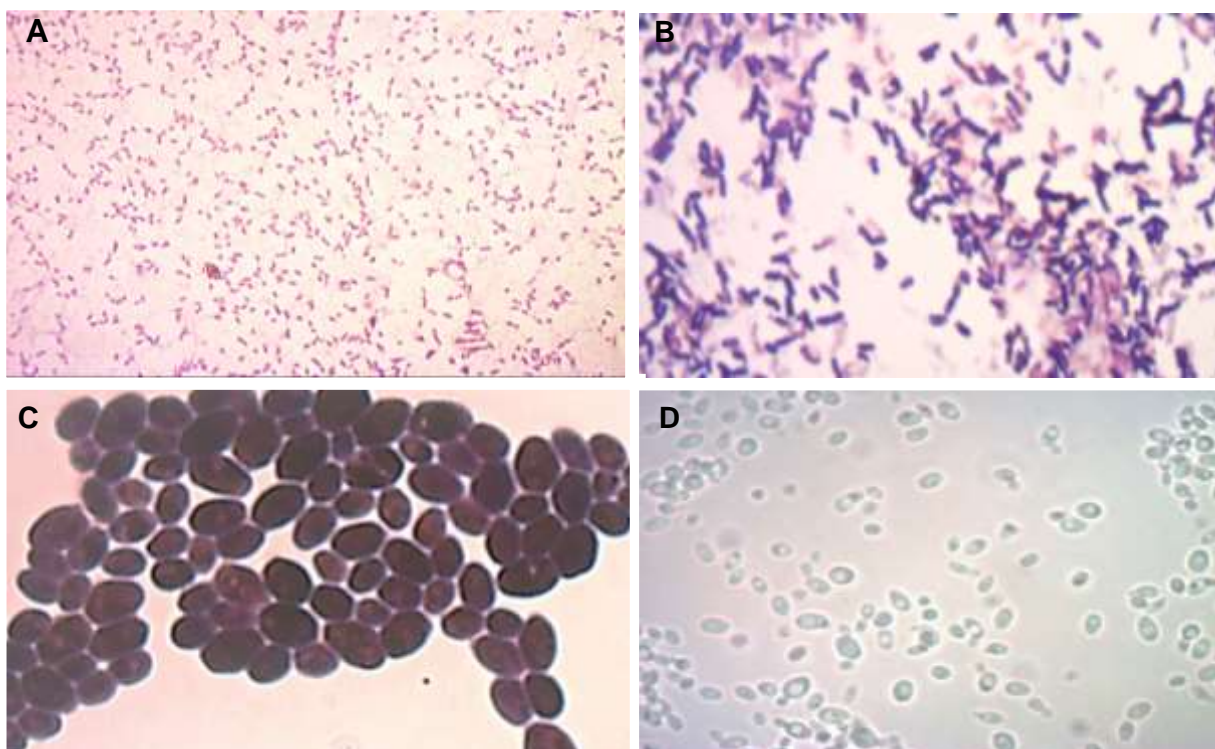


Figura 2: Observación microscópica: **A)** (100x) de bacilos Gram negativos correspondientes a la cepa KB006, **B)** (100x) bacilos Gram positivos correspondientes a la cepa KB003, **C)** (100x) de estructuras ovoideas Gram positivas, correspondiente la cepa KL003 y **D)** Microscopía (40x) tubo germinal donde no se observó ninguna extensión filamentososa de la levadura descartando *Candida albicans*.

Fuente y elaboración: Autora

Tabla 3. Resultados frente a tinción diferencial Gram e identificación bioquímica

| CÓDIGO CEPARIO UTPL | RESULTADOS | | | |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------|---|
| | Naturaleza Gram | CATALASA | OXIDASA | |
| KB001 | Bacilos cortos Gram - aerobios | + | - | |
| KB002 | | + | - | |
| KB004 | | + | - | |
| KB005 | | + | - | |
| KB006 | | + | - | |
| KB007 | | + | - | |
| KB008 | | + | - | |
| KB011 | | + | - | |
| KB003 | | Bacilos cortos Gram + aerobios | + | - |
| KB010 | | | + | - |

Fuente y elaboración: Autora

Tabla 4. Resultados frente a tinción diferencial Gram e identificación bioquímica

| CÓDIGO CEPARIO UTPL | RESULTADOS | | |
|---------------------|---|--------|---------------|
| | Tinción Gram (Fijación del colorante cristal violeta) | Ureasa | Tubo germinal |
| KL001 | Estructuras ovoideas | - | - |
| KL002 | | - | - |
| KL003 | | - | - |
| KL004 | | - | - |
| KL005 | | - | - |
| KL006 | | - | - |

| | | | |
|-------|------------------------------|---|---|
| KL008 | En algunas cepas gemación | - | - |
| KL009 | | - | - |
| KL010 | | - | - |
| KL011 | | - | - |
| KL012 | | - | - |
| KL013 | | - | - |
| KL014 | | - | - |
| KL015 | | - | - |
| KL016 | | - | - |
| KL017 | | - | - |
| KL018 | | - | - |
| KL019 | | - | - |

Fuente y elaboración: Autora

3.4 Caracterización molecular

Mediante los análisis moleculares se obtuvieron 25 secuencias, divididas en 8 secuencias para bacterias y 17 para levaduras, comparadas con la base de datos GenBank, NCBI usando la herramienta BLAST-SEARCH. El género más frecuente para bacterias fue *Gluconobacter* (Tabla 5) y para levaduras el género *Zygosaccharomyces* (Tabla 6).

Tabla 5. Identificación de las diferentes cepas de bacterias estudiadas obtenida por BLAST.

| CÓDIGO FUNGARIO (Cepas) | Organismo relacionado (BLAST) | Código de acceso (GenBank) | Porcentaje de similitud BLAST | Orden |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------|
| KB001* | - | - | - | - |
| KB002 | <i>Gluconobacter</i> spp. | EU131163.1 | 96% | RHODOSPIRILLALES |
| KB003 | <i>Bacillus</i> spp. | JF772472.1 | 84% | BACILLALES |
| KB004 | <i>Gluconobacter</i> spp. | EU131163.1 | 96% | RHODOSPIRILLALES |
| KB005 | <i>Gluconobacter oxydans</i> | JQ064563.1 | 76% | RHODOSPIRILLALES |
| KB006 | <i>Gluconobacter</i> spp. | EU131163.1 | 94% | RHODOSPIRILLALES |
| KB007* | - | - | - | - |
| KB008 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | HQ647255.1 | 95% | XANTHOMONADALES |
| KB010 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | KY785373.1 | 96% | BACILLALES |
| KB011 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | EU430096.1 | 94% | XANTHOMONADALE |

Fuente y elaboración: Autora

*=muestra no amplificadas

Tabla 6. Identificación de las diferentes cepas de levaduras estudiadas obtenida por BLAST.

| CÓDIGO FUNGARIO (Cepas) | Organismo relacionado (BLAST) | Código de acceso (GenBank) | Porcentaje de similitud BLAST | Orden |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| KL001 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | KC119207.1 | 99% | |
| KL002 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | KC119207.1 | 97% | |
| KL003 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | KC119207.2 | 98% | |
| KL004 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | KC119207.3 | 98% | |
| KL005 | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | KJ433981.1 | 91% | |
| KL006 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 92% | |
| KL008 | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | KC119207.1 | 93% | |
| KL009 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 92% | |
| KL010 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 92% | SACCHAROMYCETALES |
| KL011 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 91% | |
| KL012 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 88% | |
| KL013 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 90% | |
| KL014 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 92% | |
| KL015 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 90% | |
| KL016 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 85% | |
| KL017 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 91% | |
| KL018* | - | - | - | |
| KL019 | <i>Zygosaccharomyces parabailii</i> | CP019500.1 | 91% | |

Fuente y elaboración: Autora

*=muestra no amplificada

CAPÍTULO IV
DISCUSIÓN

La comunidad o consorcio microbiano presente en el Té de Kombucha puede ser variable acorde a los distintos lugares que se encuentra distribuida, sin embargo pocas veces se hace estudios moleculares para verificación de nuevas adaptaciones microbianas (Jayabalan et al., 2014). Las réplicas de Kombucha en té negro, parece mantener las mismas características de formación de bio-película según se describe en bibliografía (Dutta & Gachhui 2006). No obstante cuando el medio de cultivo cambia por ejemplo al de enriquecimiento (GYP), se puede observar fermentación precipitada y generación de gas (CO₂) de MO, debido probablemente al incremento de bacterias y levaduras del consorcio como ya se indica en el estudio hecho por Mukadam et al., 2016.

Los estudios han reportado que todo el espectro microbiano de esta bebida está dominado por bacterias de ácido acético (AAB) y levaduras (Jarrell et al., 2000; Jayabalan et al., 2014; Marsh et al., 2014). La identificación basada en criterio molecular (genotípico), se considera más preciso en comparación con los ensayos fenotípicos. El NCBI, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), posee un gran número de secuencias con nombres ya dados. Molecularmente se obtuvo 8 secuencias de 10 cepas de bacterias en estudio, no fue posible obtener productos de PCR para dos cepas (HUTPL (F) KB001 y KB007)). De acuerdo a la comparación de similitud entre las secuencias obtenidas para el estudio de las AAB, se identificó como género predominante a *Gluconobacter* spp. para tres cepas y una especie de *Gluconobacter oxydans*. Según la literatura las bacterias predominantes del ácido acético encontradas en Kombucha son: *A. xylium*, *A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Gluconobacter oxydans* (Liu, Hsu, Lee, & Liao, 1996) y *Gluconacetobacter* spp, que tiene una gran capacidad para producir ácido D-sacárico-1,4-lactona (DSL), como ya se reporta en el estudio hecho por Yang et al., 2010.

También hemos identificado especies que se encuentran en menor proporción en el consorcio Kombucha como: una cepa del género *Bacillus* spp., y una cepa de la especie *Bacillus amyloliquefaciens*. Según bibliografía, los *bacilos* están presentes en alimentos fermentados (Kubo et al., 2011). En el estudio hecho por Santos et al., 2012 sobre el Caxiri una bebida alcohólica fermentada tradicional, el análisis morfológico, bioquímico y molecular de los aislados, demostró que las bacterias predominantes formadoras de esporas pertenecientes al género *Bacillus* fueron: *Bacillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex* y *Bacillus megaterium*. Estas especies de bacterias identificadas en los diferentes estudios mencionados han sido encontradas en otras fermentaciones, como en diversas aplicaciones en la producción de alimentos y la biotecnología. Comparando con el estudio de nuestro consorcio Kombucha podemos apreciar que los resultados de la diversidad microbiana obtenida son similares.

En Kombucha existen diversos tipos de levaduras pertenecientes al género *Candida* y / o *Saccharomyces* (Jayabalan et al., 2014). Acorde a la comparación de similitud entre las secuencias obtenidas para el estudio de levaduras, se obtuvo 17 secuencias de 18 cepas de levaduras en estudio, el género dominante fue *Zygosaccharomyces*, dividido en dos especies *Zygosaccharomyces parabailii* para 11 cepas y *Zygosaccharomyces bailii* para una cepa, no fue posible obtener productos de PCR para una cepa (HUTPL (F) KL018). *Zygosaccharomyces bailii* predomina y se adapta fácilmente al ambiente del Kombucha debido a su habilidad para tolerar elevadas cantidades de sacarosa y ácido acético, como ya se indica en el estudio hecho por Mukadam et al., 2016.

En la mayor parte de industrias de alimentos y bebidas, *Z. bailii* es considerada como una levadura de deterioro problemática debido a su alta resistencia a los conservantes y alta tolerancia a diversos estreses (Stratford et al., 2013). Independientemente de estar asociada al deterioro, los posibles efectos beneficiosos de *Z. bailii* también se han propuesto en las industrias alimentarias, asociado a la fermentación alcohólica para la producción de vino y champagne (Domizio et al., 2011). En el estudio por Xu et al., 2017 sobre licor de sabor chino *Maotai*, que se produce a partir de granos mediante una fermentación espontánea, donde las levaduras desempeñan un papel esencial en la fermentación, en sus resultados reportan que *S. cerevisiae* contribuye significativamente a la calidad del licor y *Z. bailii* es la especie dominante en la fermentación del licor.

En nuestro estudio, se identificó con éxito *Zygosaccharomyces bailii*, que es una especie de levadura conocida dentro del consorcio Kombucha y otros alimentos fermentados (Mukadam et al., 2016), mientras que *Zygosaccharomyces parabailii* fue la especie más frecuente en 11 cultivos de los 17 identificados. De acuerdo al estudio de Suh et al., (2013) reporta que por filogenia molecular, se demostró que las levaduras del género *Zygosaccharomyces* están divididas en tres grupos principales, y dos de los grupos se distinguen de la cepa de *Z. bailii* a nivel de especie; proponiendo *Zygosaccharomyces parabailii* y *Zygosaccharomyces pseudobailii*, cambiando así la taxonomía para estos géneros, lo que quiere decir que en nuestro estudio *Zygosaccharomyces parabailii* es una especie que se ha adaptado al consorcio microbiano Kombucha, probablemente debido al clima, área geográfica, y podría ser estudiada para ser aplicada en diferentes estudios de fermentación de alimentos y bebidas.

Otras especies identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* en tres cepas y *Meyerozyma guilliermondii* para cinco cepas, son generalmente reportadas como patógenos peligrosos para los cultivos en estudio y el ser humano, debido a que desarrollan mecanismos de resistencia frente a

distintos antibióticos (An & Berg, 2018). Se ha identificado *Stenotrophomonas maltophilia* en diversas fermentaciones, estas son consideradas contaminantes o indeseadas, debido a posible contaminación por manipulación durante la aplicación de métodos microbiológicos, tal y como lo reporta en su estudio Thanh et al., 2016.

Meyerozyma guilliermondii es considerada como una levadura infecciosa emergente del grupo de especies de *Candida* no albicans (NAC), aparte de la importancia clínica, esta levadura está relacionada con alimentos fermentados (Daniel et al., 2009), es conocida por la producción de compuestos de sabor en alimentos fermentados y producción eficiente de isoflavona aglicona, que es un compuesto bioactivo, conocido por la sobreproducción de vitamina B2 (riboflavina), como se reporta en el estudio hecho por Kim et al., 2009.

No se pudo obtener productos de PCR de tres cepas (HUTPL (F) KB001, KB007 y KL018), es de nuestro conocimiento que son varios los factores que pueden afectar de forma negativa los productos de PCR como por ejemplo; contaminación con ADN extraños, errores de manipulación durante los procedimientos y degradación de ADN, sin embargo se pueden aplicar otros métodos de PCR, como por ejemplo; PCR anidada conocida como Nested PCR, es una variante de la PCR convencional, comprende dos rondas de amplificación con diferentes pares de cebadores en cada una, lo que permite incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección (Castillo et al., 2016, Galvis et al., 2015).

De acuerdo a las características microscópicas nuestro estudio deja 10 cepas de bacterias y 18 cepas de levaduras morfológicamente identificadas. Las colonias aisladas desde GYP e inoculadas en medio Yeast Mold Agar se identificaron inicialmente por criterio morfológico, a través de tinción diferencial Gram, dando resultado bacilos cortos Gram – y +. Según la literatura las bacterias del ácido acético (AAB) son Gram-negativas o Gram-variables, que no forman esporas elipsoidales, se observan en forma de bastón o varilla, pueden aparecer en cadenas simples pares o cortas (Mamlouk & Gullo, 2013), siendo similar a los resultados realizados por Mukadam et al., 2016.

En el análisis de las cepas aisladas en agar Sabouraud Dextrosa, según criterio morfológico por Tinción diferencial Gram se obtuvo estructuras características de las levaduras como: forma ovoidea y algunas cepas en gemación, como se indica en los estudios hechos por Turner et al., 1999 y Suárez et al., 2016.

Por otra parte en cuanto a criterio bioquímico nuestros datos muestran bacterias catalasas (+) y oxidasas (-), los géneros de la familia *Acetobacteraceae*, exhiben catalasa positiva y oxidasa

negativa, oxidan lactato y acetato a CO₂ y H₂O, como se indica en el estudio de aislados por Kadere et al., 2008.

Nuestros aislados de levadura se sometieron a la prueba de tubo germinal que resultó ser negativa. La bibliografía indica que la prueba del tubo germinal es de gran utilidad para identificación de *Cándida albicans*, esta levadura causa más del 75% de infecciones provocadas por hongos, cultivada en suero produce aproximadamente a las de 3 h una extensión filamentosa denominada tubo germinativo (Duarte et al., 2002; Romi et al., 2014; Hernández & Pérez, 2015), adicional a ello se hizo prueba de ureasa, que fue negativa lo que significa la posibilidad de presencia de otro género de levadura en el cultivo (Deorukhkar & Saini, 2014), comparando estos resultados con los hechos por Mukadam et al., 2016 son similares a los obtenidos en nuestro estudio. Estos resultados obtenidos y fundamentados según literatura, fueron los de identificación primaria para los MO de nuestro consorcio Kombucha, mediante el análisis fenotípico considerando características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas.

Finalmente, la composición microbiana de Kombucha varía, así como del uso de diferentes materiales de partida como son el azúcar, Té y un cultivo de iniciación diferente dará lugar a una variación en el proceso de fermentación. Por lo tanto, la formación de productos finales variables o metabolitos podrían mostrar una diferencia en la actividad. Haciendo necesario identificar a los MO presentes en Kombucha. Con una visión hacia el futuro la caracterización química y la evaluación de la actividad biológica de este Té fermentado se pueden ejecutar para comprender el ciclo de fermentación y sus efectos beneficiosos sobre la salud humana.

CONCLUSIONES

- ✓ Los microorganismos aislados desde el consorcio Kombucha fueron las bacterias y levaduras comunes *Acetobacteriaceae* y *Zygosaccharomyces* respectivamente.
- ✓ *Zygosaccharomyces parabailii* se muestra como una levadura nueva probablemente adaptada en nuestro medio al consorcio microbiano Kombucha.
- ✓ Además, en el consorcio estudiado se identificó otros microorganismos presentes en menor porcentaje: *Bacillus* spp., *Bacillus amyloliquefaciens*, *Meyerozyma guilliermondii*, y *Stenotrophomonas maltophilia*.
- ✓ El método de aislamiento fue adecuado para captar una elevada diversidad de bacterias y levaduras desde el consorcio.

RECOMENDACIONES

Es importante explorar otros métodos microbiológicos para obtener una diversidad más amplia de bacterias y levaduras; como son el uso de otros medios de cultivo que favorezcan el crecimiento de varios microorganismos presentes en fermentaciones.

Se podría inocular el consorcio Kombucha en otras bebidas que brinden una mejor fermentación, y por ende más diversidad microbiana.

Se recomienda la aplicación de métodos moleculares más actuales; como por ejemplo *metabarcoding* que es un método rápido de evaluación de la biodiversidad que combina dos tecnologías: identificación basada en ADN y secuenciación de ADN de alto rendimiento, utiliza cebadores de PCR universales para amplificar en masa los códigos de barras de ADN a partir de colecciones masivas de organismos o de ADN ambiental, haciendo un análisis de comunidades microbiológicas probióticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., ... Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399–451.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6(3), 191–199. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0133-0>
- Aguirre, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 76–81.
<https://doi.org/10.7550/rmb.33649>
- An, S. qi, & Berg, G. (2018). *Stenotrophomonas maltophilia*. *Trends in Microbiology*, xx, 10–11.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.006>
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., ... Reguero, M. (2006). Basic points in cryopreservation. *Cell*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000869>
- Bial, A. (2002). El reino de los hongos. *Iberoam Micol*, 1–4. <https://doi.org/10.2307/3759948>
- Bodger, B. (2012). La Biotecnología de Hongos una Buena Oportunidad para la Colaboración. *BioTecnología*, 16(4).
- Brooks, G., Carroll, K. C., Butel, J., Morse, S. A., & Mietzner, T. (2013). *Medical Microbiology* (26th ed.). Toronto: The McGraw-Hill Companies.
- Cano, S. (2006). Métodos de análisis microbiológico. Normas Iso. *Analiza Calidad*, 35.
- Castillo, A., Sánchez, A., Cueva, A., & Orellana, M. (2016). Puesta a punto de una técnica molecular para el estudio de hongos y bacterias totales del suelo en ecosistemas tropicales del sur del Ecuador. *Scielo*, 34(1), 145–154. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v34n1/v34n1a14.pdf>
- Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3), 502–507.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.080>
- Da Silva, N., Hirotsu, M., Junqueira, C., Silveira, N., & Romeiro, R. (2013). *Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual*. London: Taylor & Francis Group.
- Daniel, H. M., Vrancken, G., Takrama, J. F., Camu, N., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2009). Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Research*, 9(5), 774–783.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00520.x>
- Deorukhkar, S. C., & Saini, S. (2014). Laboratory approach for diagnosis of candidiasis through ages. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(1), 206–218.
- Domizio, P., Romani, C., Comitini, F., Gobbi, M., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2011).

Potential spoilage non-Saccharomyces yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 61(1), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0125-1>

- Duarte, A., Marquez, A., Araujo, C., & Pérez, C. (2002). Modalidades de la Prueba del Tubo Germinal. *Rev. Soc. Venez. Microbiol*, 22(2), 164–168. Retrieved from http://www.redalyc.org/html/1994/199416353014/%0Ahttp://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562002000200014&lng=es&nrm=iso
- Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*, 33(6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)
- Fernández, A., García de la Fuente, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica* (Vol. 37). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Flores, T. vargas, & Condori, L. G. V. (2014). Clasificacion De Los Microorganismos. *Revista de Actualizacion Clinica*, 44, 2309–2313. Retrieved from http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000500002&lng=es&nrm=iso%3E. ISSN 2304-3768.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A., & Trevino, E. (2009). *Diagnóstico Microbiológico* (12th ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Galvis, F., Carrillo, M., & Quintero, F. (2015). PCR anidada y PCR convencional en el diagnóstico de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum*. *Revista de La Facultad de Ciencias Básicas*, 1(September), 21–28.
- Geme, J., & Rempe, K. (2012). *Classification of Bacteria. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases: Fourth Edition* (Fifth Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2702-9.00116-1>
- Gramza, A., Kulczynski, B., Xindi, Y., & Gumienna, M. (2016). Research on the effect of culture time on the kombucha tea beverage's antiradical capacity and sensory value. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 15(4), 447–457. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.4.43>
- Guerrero, R. (2001). La simbiosis como mecanismo de evolución. *Temas de Actualidad. Sociedad Española de ...*, 33, 10–14. Retrieved from http://vanguardia.udea.edu.co/cursos/microorganismos1/Lecturas recomendadas/Simbiosis_10.pdf
- Hartmann, A. M., Burlison, L. E., Holmes, A. K., & Geist, C. R. (2000). Effects of chronic kombucha ingestion on open-field behaviors, longevity, appetitive behaviors, and organs in C57-BL/6 mice: A pilot study. *Nutrition*, 16(9), 755–761. [https://doi.org/10.1016/S0899-9007\(00\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0899-9007(00)00380-4)
- Hernández, J. S., & Pérez, J. E. (2015). género *Candida* mediante el uso secuencial del medio de

- cultivo cromógeno y la prueba del tubo germinal. *Iatreia*, 28(4), 355–367.
<https://doi.org/10.17533/udea.iatreia.v28n4a01.355>
- Hernández, M., Colín, A., Ortega, S., Cerón, G., Franco, R., & Lopez, H. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidades*, 3(1), 10–18.
 Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- Hibbett, D. S., Ohman, A., Glotzer, D., Nuhn, M., Kirk, P., & Nilsson, R. H. (2011). Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, 25(1), 38–47.
<https://doi.org/10.1016/J.FBR.2011.01.001>
- Hogg, J. C., & Lehane, M. J. (1999). Identification of bacterial species associated with the sheep scab mite (*Psoroptes ovis*) by using amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 4227–4229.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)
- Illana, C. (2007). El hongo kombucha. *Bol. Soc. Micol. Madrid*, 31, 269–272.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., ... Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12–18.
<https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- Jarrell, J., Cal, T., & Bennett, J. W. (2000). The Kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14(4), 166–170. [https://doi.org/10.1016/S0269-915X\(00\)80034-8](https://doi.org/10.1016/S0269-915X(00)80034-8)
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts-the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7563–7577. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5046-z>
- Kadere, T. T., Miyamoto, T., Oniano, R. K., Kutima, P. M., & Njoroge, S. M. (2008). Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2963–2971. <https://doi.org/10.5897/AJB08.390>
- Kerstens, K., Lisdiyanty, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). *The Family Acetobacteraceae: The Genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter, and Kozakia*. <https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5>
- Kim, W. C., So, J. H., Kim, S. I., Shin, J. H., Song, K. S., Yu, C. B., ... Rhee, I. K. (2009). Isolation, identification, and characterization of *pichia guilliermondii* k123-1 and *candida fermentati* si, producing isoflavone β -glycosidase to hydrolyze isoflavone glycoside efficiently, from the korean traditional soybean paste. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 52(4), 163–169.

<https://doi.org/10.3839/jabc.2009.028>

- Komagata, K., Lino, T., & Yamada, Y. (2014). *The Family Acetobacteraceae. The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_396
- Kubo, Y., Rooney, A. P., Tsukakoshi, Y., Nakagawa, R., Hasegawa, H., & Kimura, K. (2011). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18), 6463–6469. <https://doi.org/10.1128/AEM.00448-11>
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungi : morfologías y estructuras de los hongos. *Revista Boletín Biológica*, 28(January), 11–18.
- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout. (2011). *The Yeasts a Taxonomic Study* (5 th). New York: Elsevier Science.
- Liu, C. H., Hsu, W. H., Lee, F. L., & Liao, C. C. (1996). The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, 13(6), 407–415. <https://doi.org/10.1006/fmic.1996.0047>
- López, T., Domínguez, L., & García, J. (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción de vinagre. *Trabajo Presentado En El Octavo Con-Greso Nacional de Microscopía*.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2016). *Microbiología de Brock* (14 ed.). Brazil: Pearson Education.
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0414-z>
- Marsh, A. J., Sullivan, O. O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Mateos, P. (2014). *ASLAMIENTO Y SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS INDUSTRIALES*. Retrieved from file:///C:/Users/Dell/Downloads/03SelecciondeMI.pdf
- Mauriz, J., Ordoñez, R., Prieto, N., & González, J. (2000). Biotecnología y salud humana. La biotecnología en la salud humana: el hito de los anticuerpos monoclonales. *Ambiociencias: Revista de Divulgación Científica.*, 3021, 16–32. Retrieved from [http://buleria.unileon.es/xmlui/bitstream/handle/10612/4242/12.ACC.Biotecnología y salud humana.pdf?sequence=1](http://buleria.unileon.es/xmlui/bitstream/handle/10612/4242/12.ACC.Biotecnología%20y%20salud%20humana.pdf?sequence=1)
- Mejía, J. A., Montoya, R., Cortés, C., & Saavedra, A. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Informacion Tecnologica*, 27(4), 3–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000400002>
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Scielo*, 25. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100004
- Montaño, N., Sandoval, A., Ricalde, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos : pequeños

- gigantes. *Revista Ciencia y Cultura Elementos*, 77, 15–23.
- Morata de Ambrosini, V. I., Martín, M. C., & Merín, M. G. (2014). BACTERIA | Classification of the Bacteria. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 169–173. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00027-6>
- Mueller, G., Bills, G., & Foster, M. (2004). *Biodiversity of Fungi*. London: Elsevier Ltd.
- Mukadam, T. A., Punjabi, K., Deshpande, S. D., Vaidya, S. P., & Chowdhary, A. S. (2016). Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from Kombucha Tea. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 5(6), 32–41. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.004>
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. [https://doi.org/0099-2240/93/030695-06\\$02.00/0](https://doi.org/0099-2240/93/030695-06$02.00/0)
- Ochoa, D., & Montoya, A. (2010). Consorcios Microbianos: Una Metáfora Biológica Aplicada a La Asociatividad Empresarial En Cadenas Productivas Agropecuarias*. *Rev.Fac.Cienc.Econ*, XVIII(2), 55–74.
- Olivas, E., & Alarcón, L. (2004). *Manual de prácticas de Microbiología básica y de alimentos*. México.
- Pérez, M., & Mota, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 1–9. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- Piepenbring, M. (2015). *Introduction to Mycology in the Tropics*. American Phytopathological Society.
- Pitt, J., & Hocking, A. . (2009). *Fungi and Food Spoilage* (Third). New York: SPRINGER VERLAG.
- Raven, P., Johnson, G., Singer, S., Losos, J., Ober, W. C., & Garrison, C. (2011). Bacteria. *Biology*, 679–692.
- Rendueles de la Vega, M., & Díaz, M. (2014). Industrial biotechnology. *Arbor: Ciencia, Pensamiento y Cultura*, 190(768), 9. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4009>
- Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G., & Jeyaram, K. (2014). Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-52>
- Roos, J. De, & Vuyst, L. De. (2018). ScienceDirect Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>
- Rubio, A. (2007). Té de Kombucha y su beneficios para el sistema gigestivo. *Trabajo de Investigación*.
- Ruiz, J. (2001). El asombroso reino de los hongos. Hongos y taxonomía. *Avance y Perspectiva*, 20, 275–281. <https://doi.org/10.1007/s10072-009-0024-z>

- Salomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). *Biología* (9na.). México: Cengage Learning Editores S.A.
- Santos, C. C. A. do A., Almeida, E. G. de, Melo, G. V. P. de, & Schwan, R. F. (2012). Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Juruna people of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(2), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.010>
- Segura, L., Kirchmayr, M., Flores, E., & Gschaedler, A. (2010). PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras : ventajas y desventajas. *E-Gnosis (Online)*, *8*, 1–12.
- Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., & Kendrick, B. (2011). *The Genera of Hyphomycetes* (2nd ed.). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Stratford, M., Steels, H., Nebe-von-Caron, G., Novodvorska, M., Hayer, K., & Archer, D. B. (2013). Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.025>
- Suárez, C., Garrido, N. A., & Guevara, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol . Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, *50*(1), 20–28.
- Suh, S. O., Gujjari, P., Beres, C., Beck, B., & Zhou, J. (2013). Proposal of *Zygosaccharomyces parabailii* sp. nov. and *Zygosaccharomyces pseudobailii* sp. nov., novel species closely related to *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *63*(PART 5), 1922–1929. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048058-0>
- Talaro, K., & Chess, B. (2018). *Foundations in Microbiology* (10 ed). New York: McGraw-Hill Education.
- Thanh, V. N., Thuy, N. T., Chi, N. T., Hien, D. D., Ha, B. T. V., Luong, D. T., ... Ty, P. Van. (2016). New insight into microbial diversity and functions in traditional Vietnamese alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *232*, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.024>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, *474*(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tiwari, S., Babar, S., Vinicus, P., Shas, H., Silva, A., & Azevedo, V. (2015). *Industrial Microbiology & Biotechnology*, *1*(February), 1–14.
- Tripathi, M. (2008). Tetraciclinas, cloranfenicol y antibióticos aminoglucósidos. *Farmacología En Odontología*, 419–434.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*(4), 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550->

7408.1999.tb04612.x

- Vásquez, J. A., Ramirez, M., & Zulma, I. (2016). Actualización en caracterización molecular de levaduras de interés industrial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 129. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61530>
- Watkinson, S., Boddy, L., & Money, N. (2016). *The Fungi* (Third). London: Elsevier Ltd.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wink, M. (2011). *An Introduction to Molecular Biotechnology*. Germany: WILEY-VCH.
- Wolf-Hall, C., & Ngranje, W. (2017). *Microbial Food Safety: A Food System Approach*. Boston: CABI.
- Xu, Y., Zhi, Y., Wu, Q., Du, R., & Xu, Y. (2017). *Zygosaccharomyces bailii* is a potential producer of various flavor compounds in Chinese Maotai-flavor liquor fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02609>
- Yang, Z. W., Ji, B. P., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2009). Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 150–156. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3422>
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(2), 446–455. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8361-6>
- Zimbardo, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., & Johnson, J. A. (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media*. Citeseer. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C)

ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción de DNA para bacterias: PureLink™ Genomic DNA Mini Kit

Bacterias Gram-negativas

Previo: se realizó una preincubación desde los aislamientos puros, donde se inoculó overnight con medio líquido GYP, en tubos de 1.5 mL, por 72h para incrementar la concentración de cada una de las cepas.

Es importante antes de iniciar con el protocolo mantener el bloque de calor a 37 y 55°C.

Lisado y unión

1. Añada 180 µL de Pure Link Genomic digestión buffer + 20 µl Proteinasa K (lisis).
2. Incubar a 55°C por 30 min.
3. Añada 20 µL de RNasa A, agitar (vórtex por 2 min).
4. Añada 200 µL de Pure Link Genomic Lysis/Binding buffer (mezclar de 2 a 5 seg).
5. Añada 200 µL etanol al 96% (vórtex por 5 seg).
6. Colocar el lisado en la columna (640 µL).
7. Centrifugar la columna durante 1 min a velocidad máxima.
8. Desechar el tubo de recogida y coloque la columna en un nuevo tubo limpio.

Lavado (DNA)

9. Añada 500 µL de buffer de lavado 1 (debe estar preparado con etanol).
10. Centrifugar durante 1 min a velocidad máxima.
11. Desechar el tubo de recogida y colocar la columna en un nuevo tubo limpio.
12. Añada 500 µL de tampón de lavado 2, repetir paso 10 por 3min

Elución (DNA)

13. Colocar la columna de centrifugación en un tubo limpio (1,5mL)
14. Añada 100 µL de Pure Link Genomic buffer de elución a la columna.
15. Repetir paso 10
16. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
17. Repetir paso 10 y desechar la columna.
18. Si se quiere recuperar más cantidad de DNA se recomienda repetir paso 14 y 17.
19. Almacenar del DNA total a - 20°C (Volumen final o

Nota: para las bacterias Gram positivas para el paso de lisado se debe preparar Lisozima buffer de digestión y la incubación es a 37°C durante 30 min, de ahí continuar como indica el protocolo.

ANEXO 2. Protocolo de extracción de DNA para levaduras: PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit

Previo: de igual manera, preincubación desde los aislamientos puros, donde se inoculó overnight con medio líquido GYP, en tubos de 1.5 mL, por 72h.

Antes de iniciar con el protocolo centrifugar overnight, eliminar el sobrenadante y mantener el bloque de calor a 57°C.

Lisado y unión:

1. Triturar el tejido (sedimento de levaduras).
2. Añada 250 µL de buffer R2, seguido vórtex.
3. Añada 15 µL de RNasa, seguido vórtex.
4. Incubar el lisado a 55°C durante 15 min, centrifugar el lisado a velocidad máxima durante 5 min.
5. Transfiera el sobrenadante transparente a un tubo estéril (1,5 mL) tubo, añada 100 µL de buffer N2, seguido vórtex.
6. Incubar sobre hielo durante 5 min, centrifugar a velocidad máxima en una durante 5 min a temperatura ambiente.
7. Transfiera el lisado a un nuevo tubo con columna estéril, añada 300 µL de buffer B4, seguido vórtex
8. Cambiar el lisado a un tubo estéril con columna, centrifugar la columna a velocidad máxima durante 30s, seguido incubar a temperatura ambiente durante 1 min.

Lavado (DNA):

9. Añada 500 µL de buffer de lavado (W4), centrifugar a velocidad máxima durante 30 seg a temperatura ambiente.
10. Desechar el flujo a través del tubo de lavado y colocar la columna de nuevo en el tubo.
11. Añada 500 µL de buffer de lavado (W5) con etanol, centrifugar velocidad máxima durante 30 seg a temperatura ambiente.
12. Desechar el flujo a través del tubo de lavado y colocar la columna en el tubo
13. Repetir Los pasos 9 al 11.
14. Centrifugar a velocidad máxima durante 2 min a temperatura ambiente para eliminar cualquier buffer de lavado residual (W5).
15. Desechar el tubo de lavado.

Elución (DNA)

16. Colocar la columna en un tubo estéril (1,5 mL).
17. Añada 100 µL de buffer de elución E1 o estéril, incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
18. Centrifugar a velocidad máxima durante 1 min. El tubo de elución contiene el ADN purificado.
19. Para recuperar más ADN, realizar una segunda etapa de elución utilizando 100 µL de tampón de elución (E1) o agua estéril. Es posible realizar la segunda elución utilizando el mismo tubo de elución o en un tubo diferente.
20. Almacenar el ADN purificado a -20°C

ANEXO 3. Protocolo de purificación de DNA: PureLink™ PCR Purification Kit

Los productos de PCR tanto de bacterias y levaduras fueron purificados.

Unión (DNA)

1. Unir 92 μ L de B2 (debe contener isopropanol) con 20 μ L del producto de PCR, seguido vórtex para mezclar.
2. Pipetear el volumen obtenido del paso 1 (112 μ L), a un tubo colector con columna, centrifugar durante 1 min a velocidad máxima.
3. Descartar el líquido del tubo colector.

Lavado (DNA)

4. Reinsertar la columna en el tubo colector, y añada 550 μ L de W1 (comprobar q tenga etanol).
5. Centrifugar de 2 a 3 min a velocidad máxima.

Elución

6. Colocar la columna dentro de un tubo estéril (1,5 mL)
7. Añada 30 μ L de elución buffer
8. Incubar durante 1 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar durante 2 min a velocidad máxima.
10. Repetir del paso 7 al 9).
11. Finalmente se descarta la columna, y los tubos de elución contienen los productos de PCR purificados.
12. Almacenar -20 ° C