

Caracterización parcial de microorganismos aislados del SCOBY (Symbiotic Colonie Of Bacteria and Yeast) adaptado en cultivo de suero de leche en el IDIT

Tlahuiz, Sebastian

2023

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5713>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Caracterización parcial de microorganismos aislados del SCOBY (Symbiotic Colonie Of Bacteria and Yeast) adaptado en cultivo de suero de leche en el IDIT

Merchant Schaar Ximena (octavo semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Tlahuiz Olvera Sebastian (octavo semestre en Ingeniería en Biotecnología)^{1,*}, Bernal Cuevas Ramiro Antonino (profesor responsable)¹, Mellado Pumarino Ramzi del Angel (profesora asesora)¹ y Romero de la Vega Gregorio (profesor asesor)¹.

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México

Resumen

El consorcio bacteriano presente en la kombucha de té negro ha sido estudiado ampliamente debido a sus beneficios probióticos, así mismo se ha identificado algunos microorganismos responsables de la producción de celulosa bacteriana presentes en este mismo. La caracterización de las bacterias productoras de celulosa ha sido de gran interés debido a su aplicación para obtener esta materia sin necesidad de extraerla de las plantas. Un proyecto de investigación realizado en el Instituto de Diseño e Innovación Tecnológica (IDIT) de la Ibero Puebla adaptó un cultivo de kombucha de té negro productora de celulosa bacteriana a un medio de suero de leche, para darle un segundo uso a este residuo. El objetivo actualmente es conocer la microbiota del cultivo adaptado a este medio. Se realizaron aislamientos en tres medios de cultivo distintos (HS, MRS, Láctico) y se identificaron cuatro cepas bacterianas distintas (Q, U, X y Y) para su caracterización se les realizó tinción de Gram, pruebas bioquímicas (en medio de cultivo MIO, LIA, TSI, Citrato de Simmons y XLD; y catalasa) y una amplificación del gen 16S ARNr para generar un perfil de restricción enzimático con la enzima MspI. Por medio de las pruebas bioquímicas se confirmó que las cepas en los tres medios de cultivo se repetían. Y con el perfil de restricción se identificó que las cuatro cepas son distintas entre sí.

Palabras clave: SCOBY, celulosa, ADN

***Autor Corresponsal:** sebastian.tlahuiz@iberopuebla.mx

Introducción

Symbiotic Colonie of Bacteria and Yeast (SCOBY)

El SCOBY, por sus siglas en inglés, es una biopelícula simbiótica de bacterias y levaduras, conocida así comúnmente por su utilidad para producir bebidas fermentadas, como el té kombucha. Esta simbiosis se alimenta de los azúcares del té endulzado *Camellia sinensis* a través de tres tipos de fermentaciones (láctica, alcohólica y acética) produciendo ácidos orgánicos, aminoácidos, sustancias antibióticas, vitaminas y muchos otros compuestos bioactivos no identificados beneficiosos para la salud humana [1].

Aunque la composición exacta del SCOBY de la kombucha puede variar según el origen y método de cultivo, en general, los microorganismos incluyen:

- Bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus sp.* y *Bifidobacterium sp* [2].
- Bacterias ácido-acéticas: *Acetobacter xylinum.*, *Gluconacetobacter sp.* y *Komagataeibacter sp* [2].
- Levaduras: *Saccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces sp.*, y *Brettanomyces sp* [2].

Podría suponerse que esta simbiosis es bastante compleja y que muchos microorganismos asociados no se pueden cultivar fuera de la comunidad [3].

El *Acetobacter xylinum*, mencionado anteriormente como parte de la simbiosis del SCOBY, ha sido objeto de la más intensa investigación, lo que permite una descripción bioquímica detallada de la biogénesis de la celulosa en este organismo. Este conocimiento está apreciando rápidamente su valor a medida que el interés se traslada a otros organismos, así como a nuevas aplicaciones biotecnológicas

[4]. La celulosa bacteriana (CB) tiene algunas características específicas, como una excelente capacidad de absorción de agua (hasta un 99 % de contenido de humedad) y la capacidad de formar un hidrogel muy fuerte y flexible. La CB tiene una amplia gama de aplicaciones y tiene demanda en el mercado mundial. Mediante el uso de bacterias y técnicas de cultivo específicas, y mediante el control de la formación de fibras de B BC C, es posible regular deliberadamente la red tridimensional de CB y sintetizarlo en forma de estructuras geométricas. Por el momento, los intentos de reducir los costos de la síntesis de CB se basan principalmente en el aislamiento de cepas bacterianas más productivas, la optimización y control específico de sus condiciones de cultivo y el uso de sustratos baratos [5].

Los enfoques basados en la secuenciación del ADN para el estudio de la ecología microbiana facilitan la identificación simultánea de diferentes grupos taxonómicos, incluidos aquellos que no se pueden cultivar, lo que permite comprender la función de esta simbiosis. Cada vez más aplicado para comprender mejor las comunidades microbianas de alimentos fermentados. Actualmente, hay pocos estudios aplicados a estas técnicas de la fermentación de Kombucha. Por lo que, aún no hay una visión consensuada de la ecología de Kombucha. Existe una variación más aparente en la composición de SCOBY entre estos estudios que las comparaciones dentro del estudio de SCOBY de diferentes orígenes y tratamientos experimentales, lo que sugiere que se requiere un muestreo más completo de cultivos iniciadores de SCOBY [6].

Objetivos de la adaptación del cultivo de SCOBY en suero de leche desarrollado en el IDIT

“El objetivo de cambiar el sustrato de té negro a suero de leche fue para reducir el impacto ambiental de este residuo industrial, debido a su alto contenido de azúcares presentes en este, mismos que son aprovechados para la producción de celulosa bacteriana. Un segundo objetivo es producir celulosa y que la comunidad IBERO aproveche este biopolímero para abrir líneas de investigación en aplicaciones convencionales (papel) y no convencionales (Macetas, empaques, parches, lentes de contacto, etc). Para llegar al cultivo actual en suero de leche se establecieron las condiciones de pH y azúcares en éste sustrato semejantes al sustrato anterior, té negro. Posteriormente, se inoculó periódicamente el SCOBY, del té negro, a estos medios de cultivo modificados, hasta conseguir que produjeran capas de celulosa. De estos cultivos se seleccionó el que tenía una mayor producción de celulosa. Al día de hoy las condiciones nos permiten obtener una capa de celulosa aprovechable en 2 semanas. Actualmente el objetivo es conocer los microorganismos presentes en este cultivo para compararlos con los ya registrados y sino proteger la cepa, con los fines de compartir a la comunidad IBERO para que los pueda utilizar en biorremediación; y conocer el gen que expresa la producción de celulosas para optimizar la producción de celulosa bacteriana” [7].

Metodología de formulación del cultivo de SCOBY en suero de leche desarrollado en el IDIT

Previo al cambio de sustrato de té negro a suero de leche, el suero de leche fue acondicionado retirando la mayor cantidad de grasas posibles, para poder caracterizar su pH y grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$).

De acuerdo a la formulación del té negro se plantearon tres sistemas de diferente volumen, en los cuales se vertieron cuatro sustratos con combinaciones diferentes de los siguientes parámetros: $^{\circ}\text{Bx}$, %vinagre y pH, en los cuales se inoculó el SCOBY. Se hizo un monitoreo semanal a los cambios en pH, $^{\circ}\text{Bx}$ y producción de biomasa. Cuando el volumen del medio bajaba a dos tercios del volumen total se le añadió más suero de leche, ajustado no esteril, para mantener vivo el consorcio bacteriano.

De acuerdo a las observaciones de la capa de celulosa producida se determinó que las mejores condiciones de crecimiento se dieron en el medio con 15 $^{\circ}\text{Bx}$, 2.5% de vinagre y pH de 3. Este SCOBY se tomó como fuente de inóculo para los siguientes cultivos [7].

Durante este trabajo, se examinó parte de la diversidad microbiana del SCOBY adaptado en el IDIT con un sustrato de suero de leche. Este nuevo cultivo tiene como objetivo la producción de celulosa bacteriana que esta comunidad es capaz de sintetizar como producto extracelular dándole un segundo uso al suero de leche. Mediante técnicas de Microbiología, se aislaron algunos de los microorganismos presentes en dicho cultivo y se caracterizaron mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas y determinación de sus morfologías; asimismo, mediante técnicas de Biología Molecular, se extrajo su ADN y se amplificó el gen 16S para generar sus perfiles de restricción a partir del producto de PCR del gen 16S ARNr a través de la enzima MspI.

Metodología

Toma de muestra

El cultivo de SCOBY en suero de leche, adaptado en el IDIT, presenta diversas capas correspondientes a la celulosa que los microorganismos sintetizan como producto extracelular. Para realizar el muestreo de manera que se abarcará la mayor cantidad de microorganismos posibles, se segmentó el frasco del cultivo en cuatro secciones, siendo las dos primeras a y b, y las dos últimas c y d. A continuación, se presenta en la Fig. 1 el cultivo con las secciones mencionadas:



Fig. 1 Cultivo de SCOBY en suero de leche.

De las capas antes mencionadas, se tomó 1 mL con ayuda de una pipeta en condiciones de esterilidad para su posterior uso.

Aislamiento de los microorganismos

Se prepararon placas de Petri con medio HS ([g/L] glucosa 20, peptona 5, extracto de levadura 5, fosfato de Sodio dibásico 2.7, ácido cítrico 1.15, agar 15), Láctico ([g/L] caseína 20, extracto de levadura 5, dextrosa 5, lactosa 5, sacarosa 5, cloruro de sodio 4, gretina 2.5, acetato de sodio 1.5, ácido ascórbico 0.5, agar 15), y MRS ([g/L] glucosa 20, extracto de carne 6, extracto de levadura 4, agar 15). Se guardaron en un horno de cultivo 48 horas a 35 $^{\circ}\text{C}$ para asegurar su esterilidad.

Se realizó una dilución seriada (1:10, 100, 1,000) por cada muestra correspondiente a las capas a, b, c y d, y, se sembró cada dilución por goteo con 10 μL en cada una de las placas de Petri con los diferentes medios preparados (HS, Láctico y MRS). Se incubaron 48 horas a 35 $^{\circ}\text{C}$.

Tras el periodo de incubación, se identificaron las colonias obtenidas y se aislaron por la técnica de siembra en estría por agotamiento, como se muestra en la Fig. 2.

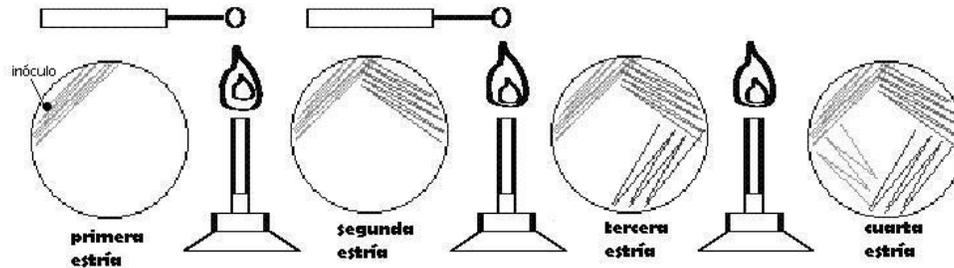


Fig. 2 Técnica de siembra en estría por agotamiento [8].

Forma	Borde	Elevación	Superficie
Puntiforme	Entero	Plana	Lisa o rugosa
Circular	Ondulado	Elevada	Mate o brillante
Rizoide	Lobulado	Convexa	Seca o cremosa
Irregular		Crateriforme	Invasiva o superficial
Filamentosa	Filamentoso	Acuminada	

Fig. 3 Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas aisladas sobre medio sólido [8].

Identificación morfológica de los microorganismos

A las colonias aisladas de bacterias se les aplicó tinción de Gram para conocer su tipo de pared bacteriano: células de color violeta (bacterias de pared Gram-Positiva) y células de color rosa (bacterias de pared Gram-Negativa). Asimismo, se observaron los cultivos en el contador de colonias para determinar los aspectos más comunes de colonias microbianas sobre medio de cultivo sólido, como los que se muestran en la Fig. 3.

Pruebas bioquímicas

Se prepararon tubos de cultivo de fondo plano con 10 mL de los siguientes medios de cultivo: medio MIO ([g/L] glucosa 10, extracto de levadura 3, peptona 10, tripteína 10, clorhidrato de L-Ornitina 5, púrpura de bromocresol 0.02, agar 2), Agar TSI ([g/L] extracto de carne 3, pluripeptona 20, cloruro de sodio 5, lactosa 10, sacarosa 10, glucosa 1, sulfato de hierro y amonio 0.2, tiosulfato de sodio 0.2, rojo de fenol 0.025, agar 13), Agar Hierro Lisina ([g/L] peptona de gelatina 5, extracto de levadura 3, glucosa 1, lisina 10, citrato de hierro y amonio 0.5, tiosulfato de sodio 0.04, púrpura de bromocresol 0.02, agar 15), agar citrato Simmons ([g/L] citrato de sodio 1, cloruro de sodio 5, sulfato de magnesio 0.2, Fosfato de Amonio dihidrogenado 1, Fosfato de Potasio dibásico 1, azul de bromotimol 0.08, agar 15). Los agaros fueron preparados y vertidos en los tubos para su posterior esterilización a 121 °C y 1 atm por 15 minutos, excepto el agar DLX que se esterilizó por choque térmico a 55 °C. Se dejaron gelificar en posición inclinada los tubos con Agar TSI, LIA y Citrato Simmons.

Con un asa bacteriológica que termina en punta en los tubos con el medio inclinado se sembraron las bacterias pinchando el fondo y haciendo un arrastre sobre el pico. En los tubos con medio asentado se picó en el centro del agar hasta una profundidad de 1 – 1.5 cm. Se hicieron las observaciones después de 20 horas de incubación.

Crecimiento en medio líquido y almacenamiento

Se prepararon los medios líquidos de HS, Láctico y MRS, se vertieron 9 mL en tubos falcon de 15 mL y se esterilizaron a 121°C y 1 atm por 15 min. En la campana de flujo laminar se inocularon los tubos con una colonia aislada de su mismo medio sólido. El sembrado se realizó por duplicado, para separarlos en distintas gradillas, una se colocó dentro de la incubadora con agitación a 130 rpm y 35°C, y la segunda en un horno de cultivo a 35°C, ambas se mantuvieron a estas condiciones por 48 horas.

Posteriormente con una micropipeta se colocaron 500 µL de los medios, que tuvieron mejor crecimiento, en tubos Eppendorf estériles. Se agregaron 700 µL de una solución estéril de Glicerol:Agua 1:1. Los tubos se agitaron en vortex y fueron almacenados a -80 °C.

Extracción de ADN

Primero se recolectaron las muestras de células. Se centrifugó 1 mL de cultivo por 2 minutos a 16,000 ×g en un tubo Eppendorf, posteriormente se descartó el sobrenadante. Al pellet obtenido se le aplicó protocolo de extracción de ADN genómico de Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit A1125 [9]. Se siguió el protocolo de extracción para bacterias Gram-Negativas. A

continuación, se mencionan los pasos realizados como se muestra en la Fig. 4:

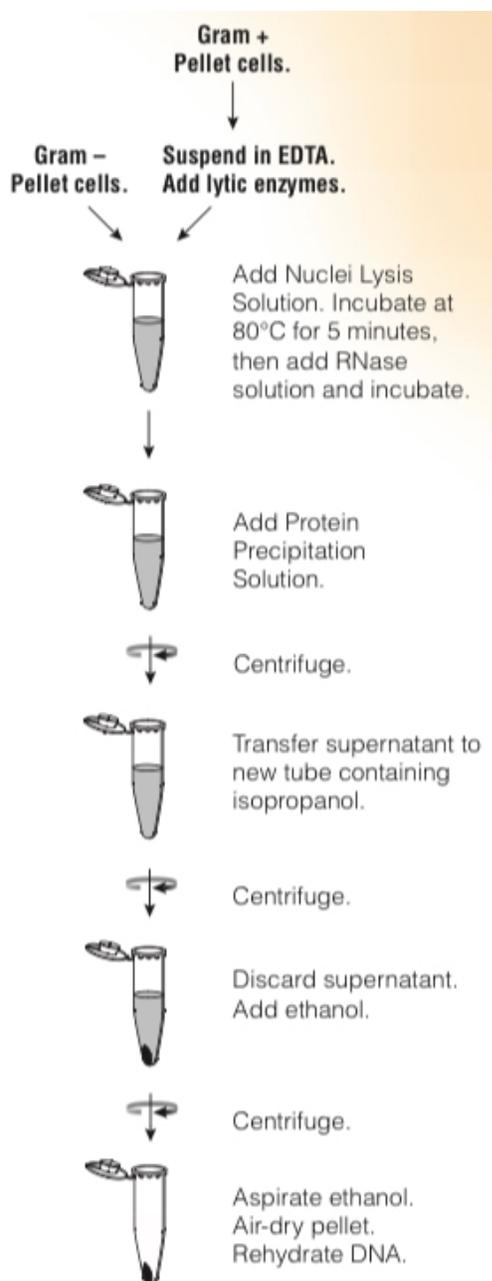


Fig. 4 Diagrama del protocolo del Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit A1125 para extracción de ADN genómico para bacterias Gram positivas [9].

Finalmente, se corroboró la extracción de ADN de cada una de las 4 cepas con una electroforesis en un gel de agarosa a 2% con un voltaje de 110 V.

Amplificación del 16S

Se amplificó el gen del 16S ARNr por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las cuatro muestras de ADN bacteriano aislados. Con el siguiente protocolo de reacción para el producto de PCR en un volumen final de 25 μ L (12.5 μ L de MasterMix (GoTaq® Green), 1 μ L del oligonucleótido sentido delantero, 1 μ L del

oligonucleótido sentido reverse, 5.5 μ L). Protocolo de PCR fue el siguiente: 95 °C x 5 min, 30x (95 °C x 40 seg, 52 °C x 40 seg, 72 °C x 1 min 30 seg), tiempo final de extensión a 72 °C x 5 min.

Perfil de restricción a partir del gen 16S ARNr

Se realizó una reacción de digestión del ADN del producto de PCR del 16S ARNr con la enzima de restricción MspI con las siguientes volúmenes de reactivos: 1 μ L buffer de reacción de la enzima MspI, 1 μ L de la enzima MspI, 2.5 μ L del producto de PCR de 16S ARNr y 10 μ L de Agua libre de nucleasas. Con un tiempo de incubación de 2 horas a 37 °C, el perfil de restricción se corroboró con una electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% con un voltaje de 100 V durante 1 hora 15 minutos, con un marcador de peso molecular (MPM) [GeneRuler 1 Kb DNA Ladder].

Resultados y Discusión

Cabe destacar que el cultivo de SCOPY en suero de leche no fue manipulado en condiciones de esterilidad durante su proceso de adaptación, lo cual se debe tomar en cuenta para los resultados obtenidos.

Aislamiento y morfología de las colonias

De los tres medios de cultivo utilizados (HS, Láctico y MRS) se observaron las morfologías de las colonias completamente aisladas. Estas colonias se catalogaron de acuerdo a su medio de cultivo como: *H* (HS), *L* (Láctico) y *M* (MRS); y por su morfología observada: *Q*, *U*, *X* y *Y*. Como se muestran en la Fig. 5.

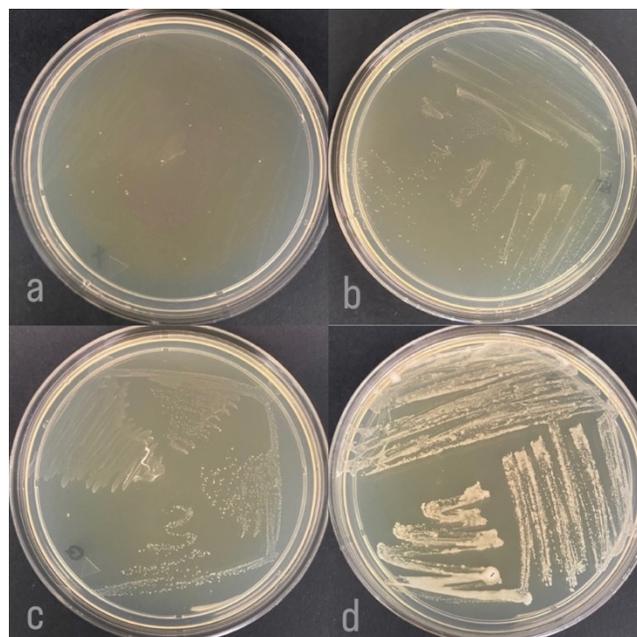


Fig. 5 a) Cepa X. Colonia puntiforme blanca con halo transparente, muy pequeña, de borde ondulado, plana, superficie lisa mate seca. b) Cepa U. Colonia circular crema transparente, pequeña, de borde entero, plana, superficie lisa brillante cremosa. c) Cepa Q. Colonia circular crema, mediana, de borde entero, convexa, superficie lisa brillante cremosa. d) Cepa Y. Colonia circular amarillo crema, mediana-grande, de borde liso, convexa, superficie lisa brillante cremosa.

Tabla 1 Resultados de las pruebas bioquímicas de acuerdo a la hoja de especificaciones de cada medio.

Código	MIO			LIA		TSI	Catalasa
	Movilidad	Ornitina descarboxil.	Indol	Descarboxilación de Lisina	Desaminación de Lisina		
HQ	-	+	-	+	-	K/K	-
HU	-	-	-	+	-	K/A	-
HX	-	+	-	-	-	K/K	-
HY	+	+	-	+	-	K/K	+
LU	-	-	-	+	-	K/A	-
LX	-	+	-	-	-	K/K	-
LY	+	+	-	+	-	K/K	+
MQ	-	+	-	+	-	K/K	-
MU	-	-	-	+	-	K/K	-
MX	-	+	-	-	-	K/K	-
MY	+	+	-	+	-	K/K	+

Morfología celular

Después de realizarle las tinciones a las colonias aisladas se observó en el microscopio lo que se muestra en la Fig. 6:

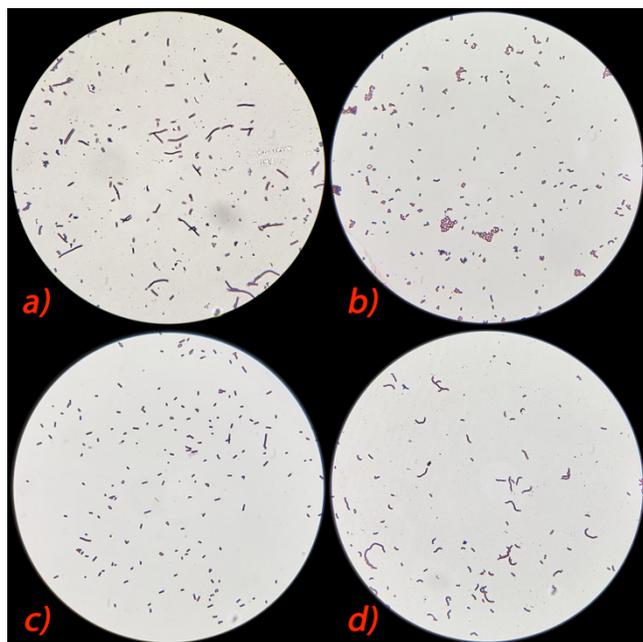


Fig. 6 a) Tinción de gram de la colonia Q. b) tinción de gram de la colonia Y. c) Tinción de gram de la colonia X. d) Tinción de gram de la colonia U.

En la Tabla 2 se presentan las morfologías observadas en las cepas Q, U, X y Y, según su medio de cultivo.

Los resultados de la tinción de Gram fueron negativos para las cuatro cepas en los tres medios. Al ser aisladas de un medio de cultivo como el suero de leche, se esperaba encontrar bacterias ácido-lácticas (BAL) y ácido-acéticas (BAA), que generalmente son Gram positivas. Por lo que se esperaba que al menos una de las cuatro cepas aisladas fuese positiva en la tinción.

Tabla 2 Morfología y resultados de la tinción de Gram de las cepas aisladas.

Código	Morfología	Tinción de Gram
HQ	Bacilos	-
HU	Bacilos	-
HX	Cocobacilos	-
HY	Cocobacilos	-
LU	Bacilos	-
LX	Cocobacilos	-
LY	Cocobacilos	-
MQ	Bacilos	-
MU	Bacilos	-
MX	Cocobacilos	-
MY	Cocobacilos	-

Pruebas bioquímicas

Después del periodo de crecimiento se consiguieron los resultados de acuerdo con el crecimiento de colonias y viraje del medio que se presentan en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Todas las cepas dieron negativo en las pruebas de XLD (Enterobacterias patógenas) y Citrato de Simmons (Citrato permeasa).

A continuación, se presenta el análisis/interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas:

La *cepa Y* tiene una mayor cantidad de diferencias con respecto a las demás. Es la única que presenta movilidad, lo que indica que puede ser un organismo flagelado; y también cuenta con la enzima catalasa, que le otorga resistencia contra los radicales libres del Peróxido de Hidrógeno.

La *cepa U* es la única presente capaz de fermentar la glucosa. La *cepa X* no tiene la capacidad de descarboxilar la lisina a diferencia de las demás.

Los resultados de la prueba de Citrato de Simmons indican que las bacterias no pueden utilizar al Citrato de Sodio como única fuente de carbono y/o al Fosfato Monoamónico como su única fuente de nitrógeno. El resultado de esta prueba indica que posiblemente no cuenten con una o ambas las enzimas especiales para llevar a cabo estos metabolismos

Al igual pasa con la desaminación de la Lisina, que aparentemente no tienen la capacidad de extraer los grupos amino de la Lisina. Y como resultado de la prueba Indol,

ninguna lleva a cabo el proceso para producir Indol. Se confirma que ninguna cepa aislada tiene estas enzimas. Para finalizar, las cepas no resultaron ser bacterias enteropatógenas, ya que ninguna realizó cambios en el medio DLX.

Con los resultados obtenidos, no se puede llevar a cabo una caracterización de las cepas para conocer su familia, género y/o especie debido a que no fueron las suficientes pruebas realizadas. Sin embargo, estos resultados ayudaron a conocer aspectos del metabolismo de las cepas aisladas.

Amplificación del gen 16S ARNr

Se realizó la amplificación del gen 16S RNAr en las cuatro cepas de estudio, se encontraron los fragmentos del tamaño esperado de 1495 pb como se muestra en la Fig. 7.

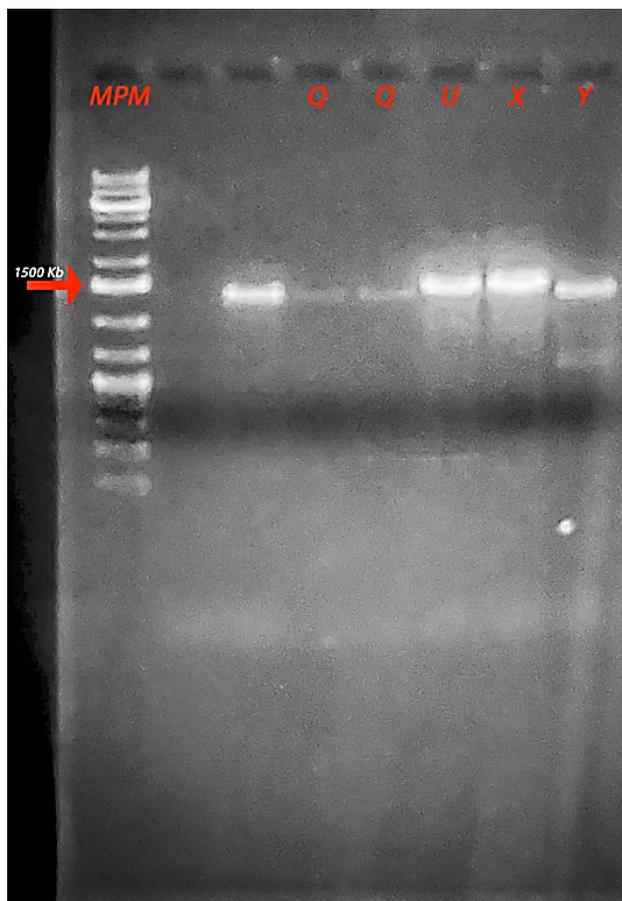


Fig. 7 Columna MPM, (MPM GeneRuler 1 Kb DNA Ladder) Referencia en el fragmento de 1,500 Kb. Columnas Q, amplificación del gen 16S cepa Q. Columna U, amplificación del gen 16S cepa U. Columna X, amplificación del gen 16S cepa X. Columna Y, amplificación del gen 16S cepa Y.

Perfil de restricción a partir del gen 16S ARNr

Se generaron perfiles de restricción a partir del producto de PCR del gen 16S ARNr para las cepas U, X y Y, como se muestra en la Fig. 8. La digestión se realizó con la enzima MspI que tiene el sitio de reconocimiento en 5' - C|CGG - 3', 3' - GGC|C - 5'. Con lo cual se generó un perfil único en las cepas U, X y Y. En la cepa Q no se logró amplificar suficiente material del gen 16S ARNr.

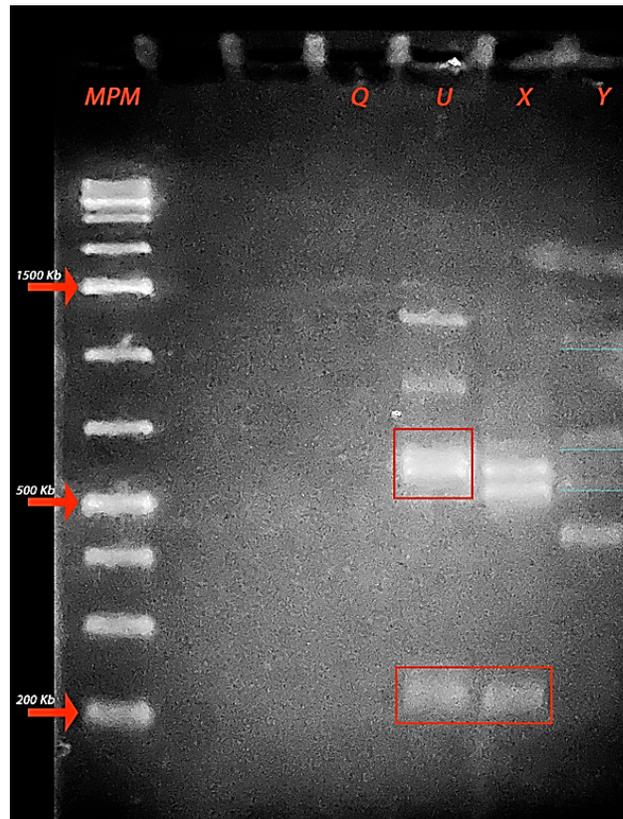


Fig. 8 Columna MPM. (MPM GeneRuler 1 Kb DNA Ladder) Marcas de referencia en los fragmentos de 1500 Kb, 500 Kb y 200 Kb. Columna Q, perfil de digestión del gen 16S de la cepa Q. Columna U, perfil de digestión del gen 16S de la cepa U. Columna X, perfil de digestión del gen 16S de la cepa X. Columna Y, perfil de digestión del gen 16S de la cepa Y.

Se puede observar que el perfil de digestión enzimática es distinto en cada columna, lo que indica que las bacterias aisladas son diferentes entre sí.

Los fragmentos de digestión de los productos de PCR del gen 16S ARNr que se encuentra por encima de las 500 Kb y 200 Kb de las cepas U y X indica que estas se encuentran en géneros parcialmente relacionados

En la cepa U se pueden observar que el fragmento superior se encuentra alrededor de las 1200 Kb y el inferior cerca de las 250 Kb. Estos resultados de la digestión son indicativos de que la sección de corte del gen 16S ARNr son posiblemente complementarios

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

El trabajo del aislamiento permitió explorar por primera vez la microbiota del consorcio bacteriano presente en los cultivos de suero de leche de estudio en el IDIT. En este intento se determinó la presencia de cuatro cepas bacterianas. Apartir de los medios de cultivo HS y MRS se observó que favorecen al crecimiento de bacterias Gram negativas de una manera menos restrictiva que el Agar Láctico, ya que a en este medio solo se obtuvo el crecimiento de tres de las cuatro cepas.

Con los resultados de la digestión enzimática del gen 16S ARNr corroboraron que las cepas aisladas son distintas. A su

vez esta digestión nos presenta una posible relación entre las cepas *U* y *X*.

La caracterización por medio de las pruebas bioquímicas tuvo complicaciones en cuanto a la lectura de los resultados. A su vez, se recomienda utilizar las pruebas API para tener una mayor cantidad de resultados a comparar y así poder entender mejor su metabolismo.

El factor de que la preparación del cultivo del SCOBY en suero de leche no fuese en un ambiente de esterilidad es el

responsable de encontrar una gama de bacterias que comúnmente no se hallarían en el SCOBY. Para llegar a conocer las bacterias a profundidad presentes en el cultivo de SCOBY en suero de leche será requerido la secuenciación del gen 16S ARNr, ya que solo con el perfil restricción producido por la enzima MspI sobre el gen 16S ARNr no es posible hacer un análisis exacto para aproximar las cepas aisladas.

Referencias

- [1] M. A. Guzmán Ortiz, «Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro,» *CIATEJ*, pp. 25-30, 2020.
- [2] E. Yuliana, A. Herawati Permana y A. Astuti, «Isolation and Characterization of Microorganisms From Scoby (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) During Kombucha Fermentation,» *WARTA AKAB*, vol. 46, n° 2, pp. 18-22, 2022.
- [3] O. V. Reva, I. E. Zaets, L. P. Ovcharenko, O. E. Kukharenko, S. P. Shpylova, O. V. Podolich, J.-P. de Vera y N. O. Kozyrovska, «Metaabording of the kombucha microbial community grown in different microenvironments,» *Springer*, n° 10.1186/s13568-015-0124-5, 2015.
- [4] P. Ross, R. Mayer y M. Benziman, «Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria,» *Microbiological Reviews*, vol. 55, n° 1, pp. 35-58, 1991.
- [5] P. Semjonovs, M. Ruklisha, L. Paegle, M. Saka, R. Treimane, M. Skute, L. Rozenberga, L. Vikele, M. Sabovics y I. Cleenwerck, «Cellulose synthesis by Komagataeibacter rhaeticus strain P 1463 isolated from Kombucha,» *Springer*, n° 10.1007/s00253-016-7761-8, 2016.
- [6] K. Harrison y C. Curtin, «Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America,» *MDPI*, vol. 9, n° <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>, 2021.
- [7] G. Romero de la Vega, Interviewee, *Objetivos de la adaptación del cultivo SCOBY en suero de leche desarrollado en el IDIT*. [Entrevista]. 21 abril 2023.
- [8] P. D. P. D. B. Y. MICOLOGÍA, «Universidad Autónoma del Estado de México,» 17 Jullio 2013. [En línea]. Available: http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/58421/56_ARCHO_PRACTICAS%20DE%20BACTERIOLOGI A.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [Último acceso: 18 abril 2023].
- [9] Promega Corporation, *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, 2020.
- [10] R. Correa dos Santos, A. A. Berretta, H. da Silva Barud, S. J. Lima Ribeiro, L. N. Gozález-García, T. Domingues Zucchi, G. H. Godlman y D. M. Riaño-Pachón, «Draft Genome Sequence of Komagataeibacter rhaeticus Strain AF1, a High Producer of Cellulose, Isolated from Kombucha Tea,» *JournalsASM.org*, vol. 2, n° 4, 2014.
- [11] C. Zhong, «Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose,» *Front. Bioeng, Biotechnol.*, n° 10.3389/fbioe.2020.605374, 2020.
- [12] M. Gullo, S. La China, G. Petroni, S. Di Gregorio y P. Giudici, «Exploring K2G30 Genome: A High Bacterial Cellulose Producing Strain in Glucose and Mannitol Based Media,» *Front. Microbiol.*, n° 10.3389/fmicb.2019.00058, 2019.
- [13] F. Gaggia, L. Baffoni, M. Galiano, D. S. Nielsen, R. R. Jakobsen, J. L. Castro-Mejía, S. Bosi, F. Truzzi, F. Musumeci, G. Dinelli y D. Di Gioia, «Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity,» vol. 11, n° 1, 2018.
- [14] S. Hestrin y M. Schramm, «Synthesis of Cellulose by Acetobacter xylinum,» *Laboratory of Microbiological Chemistry, Department of Biochemistry, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel*, vol. 58, 1954.
- [15] F. De Filippis, A. D. Troise, P. Vitagliones y D. Ercolini, «Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promote organic acids production during Kombuca tea fermentation,» *Food Microbiology*, 2017.
- [16] Bio-Helix, «PureDireX - PDC09-0100 Genomic DNA Isolation Kit (Blood/Cultured Cell/Fungus)(Column Based),» [En línea]. Available: https://www.bio-helix.com/uploads/product_file/file/526/PureDireX_PDC09-0100_Protocol_v.180823.pdf. [Último acceso: 25 Abril 2023].
- [17] L. Maric, I. Cleenwerck, T. Accetto, P. Vandamme y J. Treck, «Description of Komagataeibacter melaceti sp. nov. and Komagataeibacter melomenus sp. nov. Isolated from Apple Cider Vinegar,» *MDPI*, vol. 8, n° 1178, 2020.
- [18] J. Reinheimer y C. Vinderola, «Culture media for the enumeration of Bixdobacterium bixdum and Lactobacillus acidophilus in the presence of yoghurt bacteria,» *ELSEVIER*, pp. 497-505, 1999.