



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR, PREVIO A LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

“Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha en bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*”

Elaborado por

Romero Viscarra, Andrea Cristina

Director

Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo M. Sc.

Sangolquí
2022



CONTENIDO

Introducción

Justificación

Objetivos

Metodología

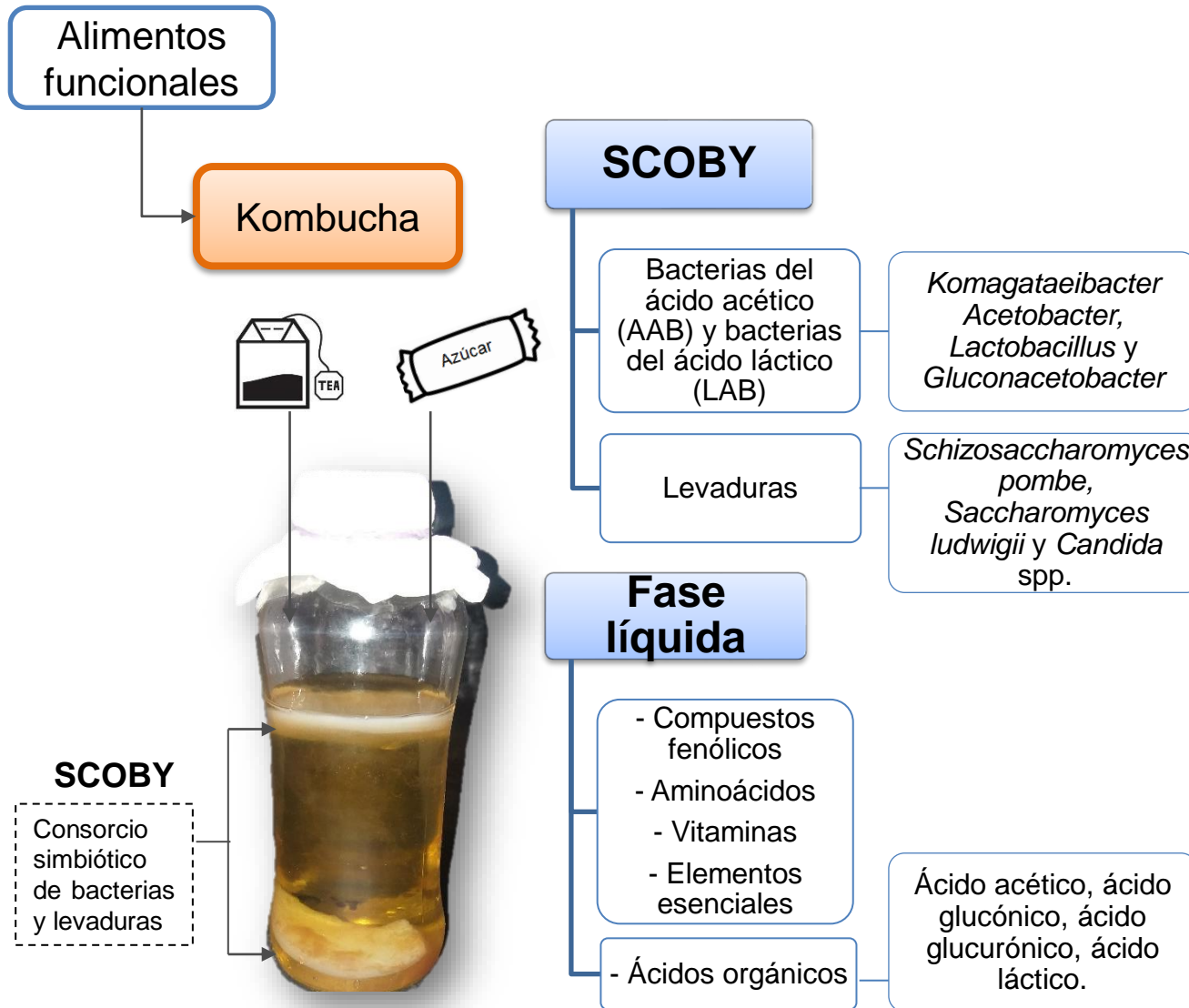
Resultados y Discusión

Conclusiones

Recomendaciones



INTRODUCCIÓN

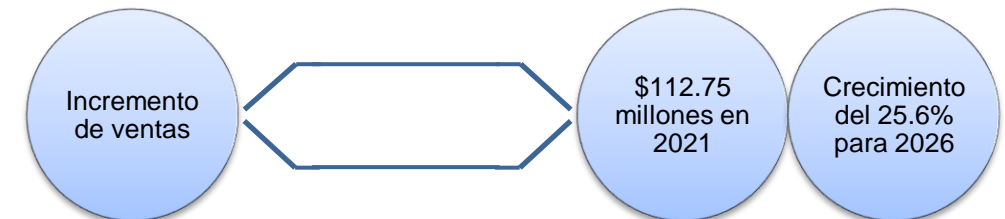


Propiedades y beneficios

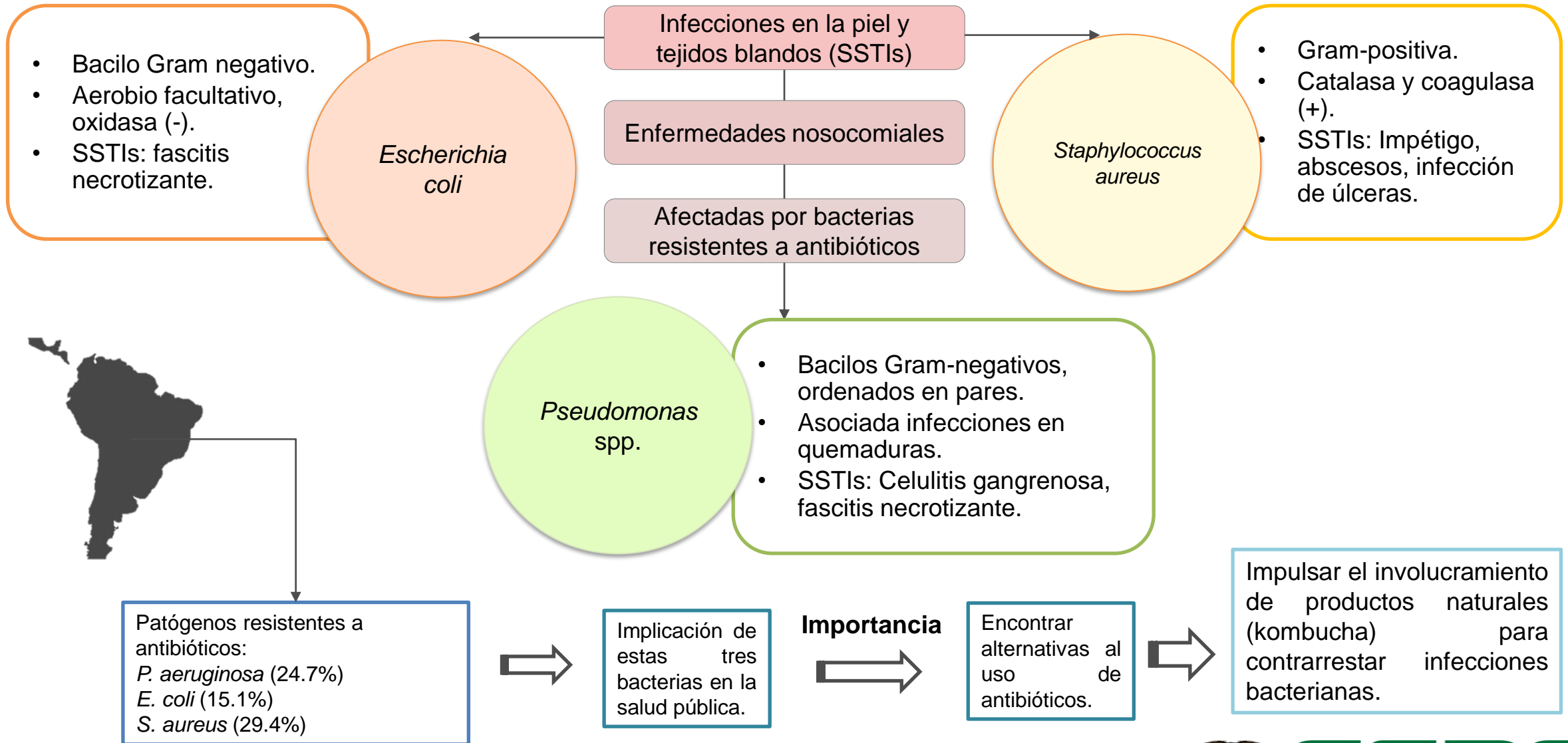
Actividad antioxidante, antiinflamatoria y hepatoprotectora
Inhibe α -amilasa (glucosa), retrasa absorción de LDL.

Efecto anticancerígeno: Alteraciones en la angiogénesis.

Actividad antimicrobiana: En bacterias Gram positivas y Gram negativas
→ *B. cereus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.



JUSTIFICACIÓN



Objetivo General

Evaluar el efecto inhibitorio de kombucha en bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* spp.

Objetivos Específicos

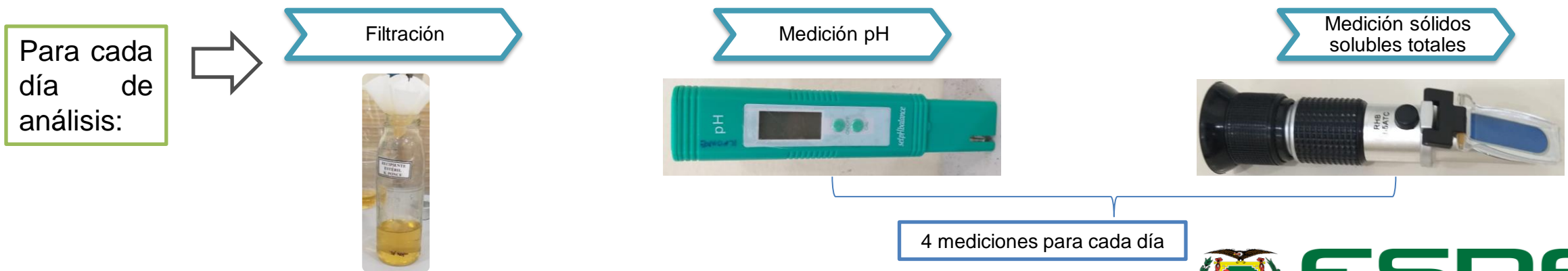
- Elaborar kombucha a partir de té por medio de un método de fermentación basado en bibliografía.
- Caracterizar pH y azúcares totales del producto de fermentación durante 0, 7, 14, 21 y 28 días.
- Analizar la actividad antimicrobiana de la kombucha en bacterias por medio del método de macrodilución en caldo y difusión en disco.



El efecto inhibitorio de la kombucha de té verde sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* spp. es mayor en comparación con la kombucha de té negro.

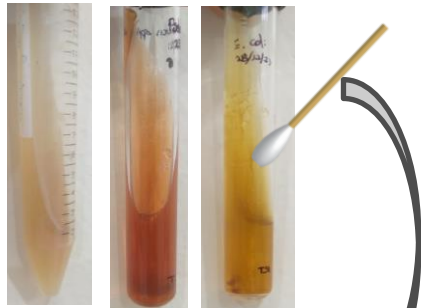
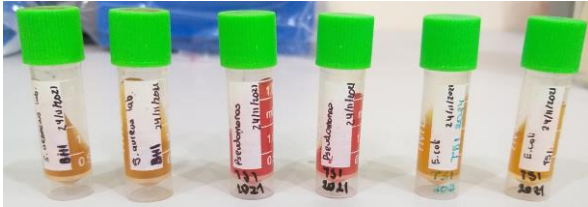


METODOLOGÍA



Evaluación de la actividad antimicrobiana

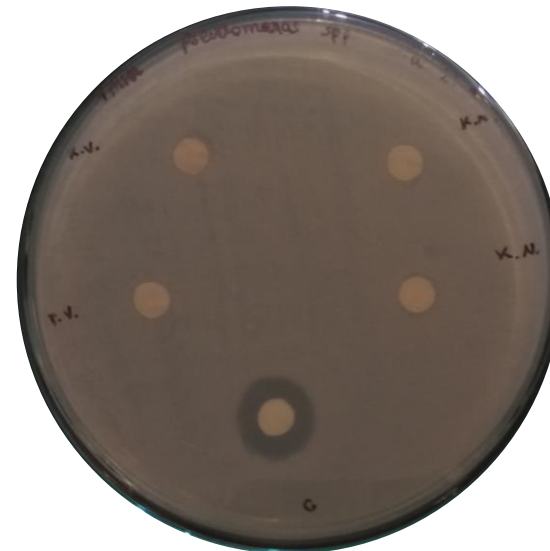
Preparación de inóculos bacterianos:



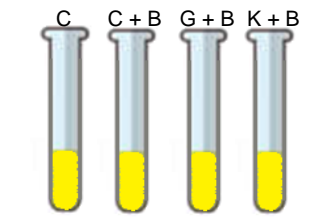
McFarland 0.5 (1×10^8 UFC/mL)



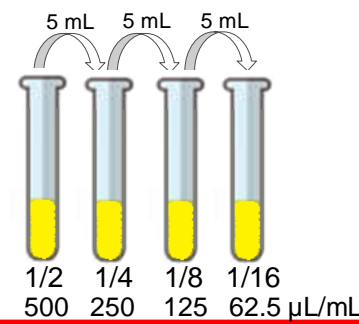
- Difusión en disco**
- Bacteria sembrada en agar Mueller-Hinton (MHA).
 - 5 Discos de papel filtro (con 10 μ L de muestra, gentamicina 1 μ g/mL).
 - Observación a las 18h.



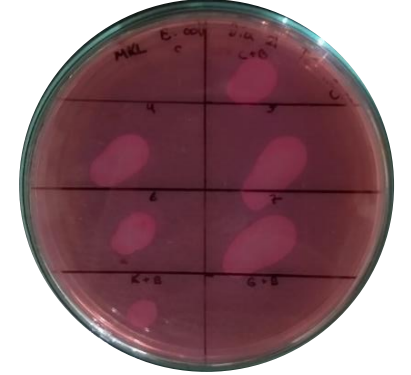
- Macrodilución en caldo**
- 2.5 mL caldo nutriente, 5 mL kombucha, 2.5 mL inóculo bacteriano, 2.5 mL gentamicina.
 - Observación a las 18h.



Caldo nutriente (C). Bacteria (B). Gentamicina (G). Kombucha (K).



- Drop plate**
- *E. coli* y *Pseudomonas* spp. en MacConkey Lactosa (MKL) y *S. aureus* en Agar Manitol Salado (MSA).
 - Caja Petri dividida en ocho cuadrantes.
 - 10 μ L de los tubos de macrodilución.



$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\# \text{ colonias} \times \frac{1}{\text{Factor de dilución}} \times 1000 \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}}}{\text{Volumen puesto } (\mu\text{L})}$$

Diseño experimental
comparativo simple
en el tiempo

Unidades
experimentales:
Kombucha de té verde
y kombucha de té
negro.

Variables de respuesta:
Análisis químico: pH y
sólidos solubles totales.

Evaluación
antimicrobiana:
Diámetros zona de
inhibición (mm),
Concentración mínima
inhibitoria (CMI) y
Concentración
bactericida mínima
(CBM) en $\mu\text{L}/\text{mL}$.

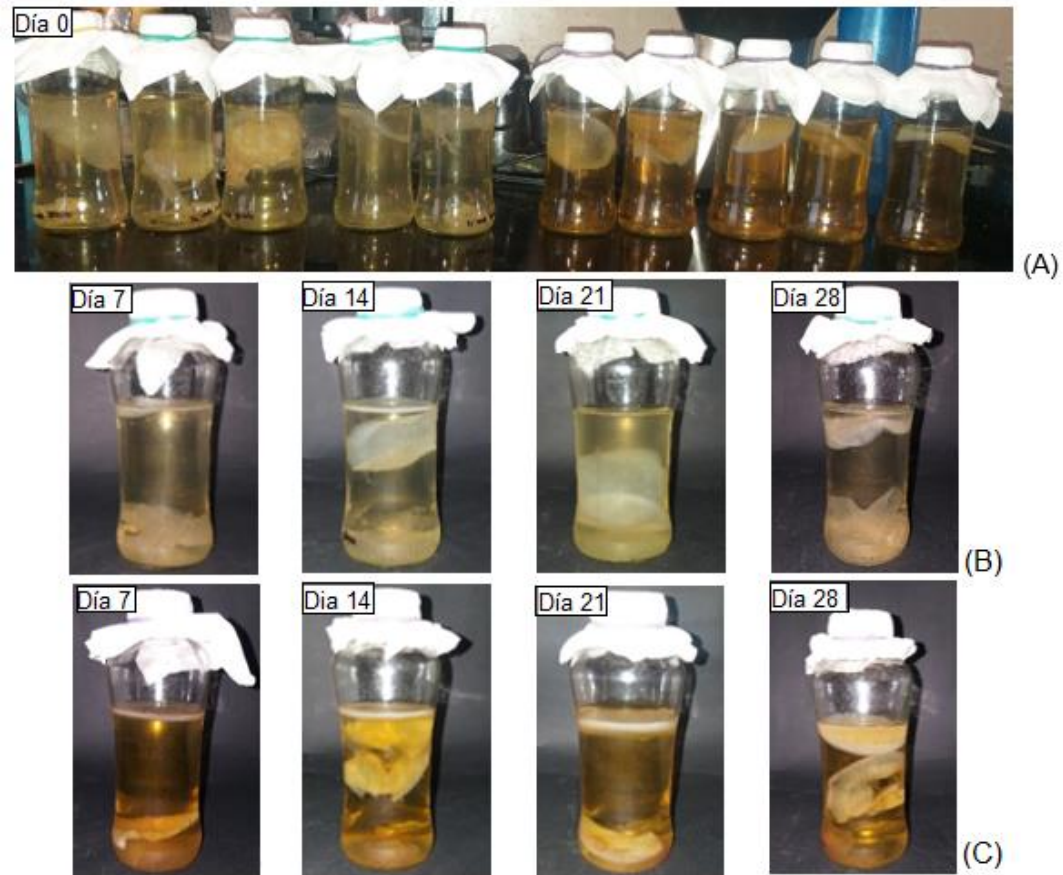
Análisis de varianza
(ANOVA)
Nivel de significancia
(α) igual a 0.05 y test
de Duncan.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación de la kombucha

Figura 1. Aspecto de la kombucha de té verde y té negro en los días de fermentación (A) De izquierda a derecha, kombucha de té verde (5 botellas) y kombucha de té negro (5 botellas) al día 0. (B) Kombucha de té verde (C) Kombucha de té negro.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico

Medición de pH

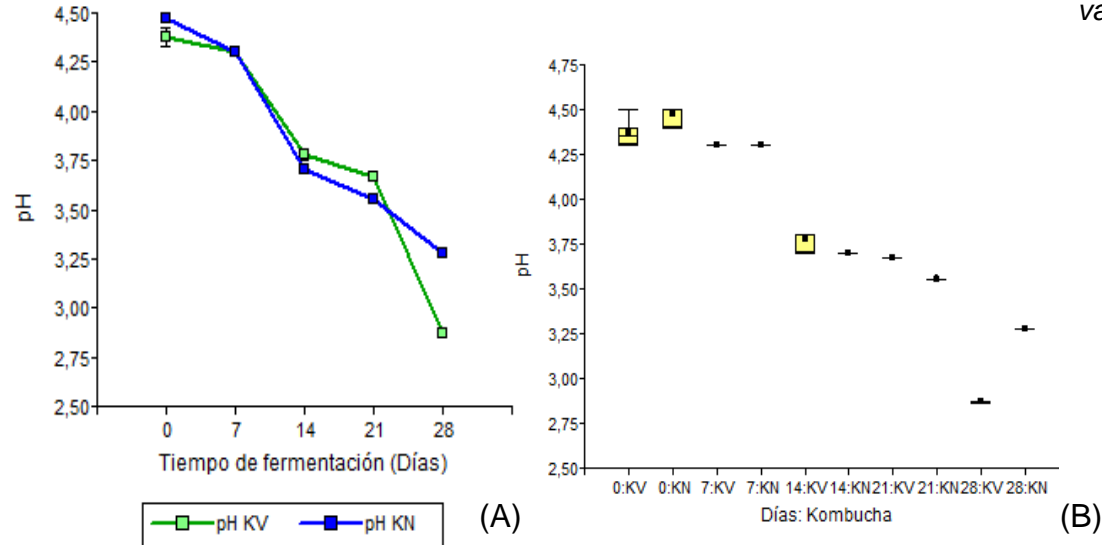


Figura 2. Variación de pH con respecto a los días de fermentación (A) Gráfico de puntos. (B) Box-Plot.

Tabla 1. pH inicial y final.

Kombucha	Tiempo de fermentación (Días)	pH
Té verde	0	4.38
Té verde	28	2.87
Té negro	0	4.48
Té negro	28	3.28

Tabla 2. ANOVA indicando la interacción entre las kombuchas y tiempo de fermentación en los valores de pH.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH	40	1,00	0,99	0,98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10,03	9	1,11	783,52	<0,0001
Kombucha	0,04	1	0,04	28,81	<0,0001
Tiempo de fermentación	9,63	4	2,41	1692,73	<0,0001
Kombucha*Tiempo de ferment..	0,36	4	0,09	62,99	<0,0001
Error	0,04	30	1,4E-03		
Total	10,07	39			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0014 gl: 30

Kombucha	Tiempo de fermentación	Medias	n	E.E.	
Té negro	0	4,48	4	0,02	A
Té verde	0	4,38	4	0,02	B
Té verde	7	4,30	4	0,02	C
Té negro	7	4,30	4	0,02	C
Té verde	14	3,78	4	0,02	D
Té negro	14	3,70	4	0,02	E
Té verde	21	3,67	4	0,02	E
Té negro	21	3,55	4	0,02	F
Té negro	28	3,28	4	0,02	G
Té verde	28	2,87	4	0,02	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medición de sólidos solubles totales

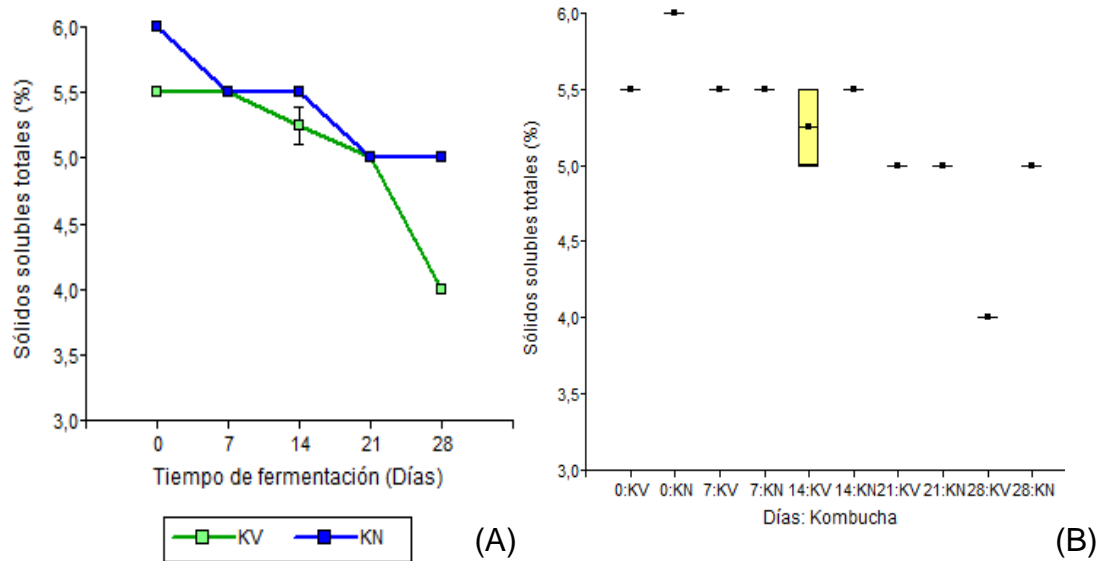


Figura 3. Variación de los sólidos solubles totales medidos en función de los grados Brix (%) con respecto a los días de fermentación (A) Gráfico de puntos. (B) Box-Plot.

Tabla 3. Sólidos solubles iniciales y finales.

Kombucha	Tiempo de fermentación (Días)	Sólidos solubles totales (%)
Té verde	0	5.5
Té verde	28	4
Té negro	0	6
Té negro	28	5

Tabla 4. ANOVA indicando la interacción entre la kombucha y tiempo de fermentación en los valores de sólidos solubles totales.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Brix	40	0,98	0,97	1,75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10,23	9	1,14	136,33	<0,0001
Kombucha	1,23	1	1,23	147,00	<0,0001
Tiempo de fermentación	7,60	4	1,90	228,00	<0,0001
Kombucha*Tiempo de ferment..	1,40	4	0,35	42,00	<0,0001
Error	0,25	30	0,01		
Total	10,48	39			

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0083 gl: 30

Kombucha	Tiempo de fermentación	Medias	n	E.E.
Té negro	0	6,00	4	0,05 A
Té verde	7	5,50	4	0,05 B
Té verde	0	5,50	4	0,05 B
Té negro	14	5,50	4	0,05 B
Té negro	7	5,50	4	0,05 B
Té verde	14	5,25	4	0,05 C
Té verde	21	5,00	4	0,05 D
Té negro	21	5,00	4	0,05 D
Té negro	28	5,00	4	0,05 D
Té verde	28	4,00	4	0,05 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A causa de ácidos orgánicos (conversión de la sacarosa a glucosa).

Ácido acético, glucónico, glucurónico, láctico.

pH de la kombucha varía desde 5 a 3 en primeros días de fermentación.

pH en cada día de fermentación con intervalos de confianza.

pH de este estudio difiere a otros de referencia en cada día.

Al final de la fermentación se mantiene dentro de los valores comunes.

Tabla 5. Intervalos de confianza para los valores de pH en cada uno de los días de fermentación para la kombucha de té verde (KV) y la kombucha de té negro (KN).

Días	Variable	Parámetro	Estimación	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
0	pH KV	Media	4,38	0,05	4	4,22	4,53
0	pH KN	Media	4,48	0,02	4	4,40	4,55
7	pH KV	Media	4,30	0,00	4	4,30	4,30
7	pH KN	Media	4,30	0,00	4	4,30	4,30
14	pH KV	Media	3,78	0,02	4	3,70	3,85
14	pH KN	Media	3,70	0,00	4	3,70	3,70
21	pH KV	Media	3,67	0,00	4	3,67	3,67
21	pH KN	Media	3,55	2,5E-03	4	3,54	3,56
28	pH KV	Media	2,87	2,5E-03	4	2,86	2,88
28	pH KN	Media	3,28	0,00	4	3,28	3,28

Día 14

Kombucha
té verde

pH = 3.39

Día 21

Kombucha
té negro

pH = 3.04

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Difusión en disco

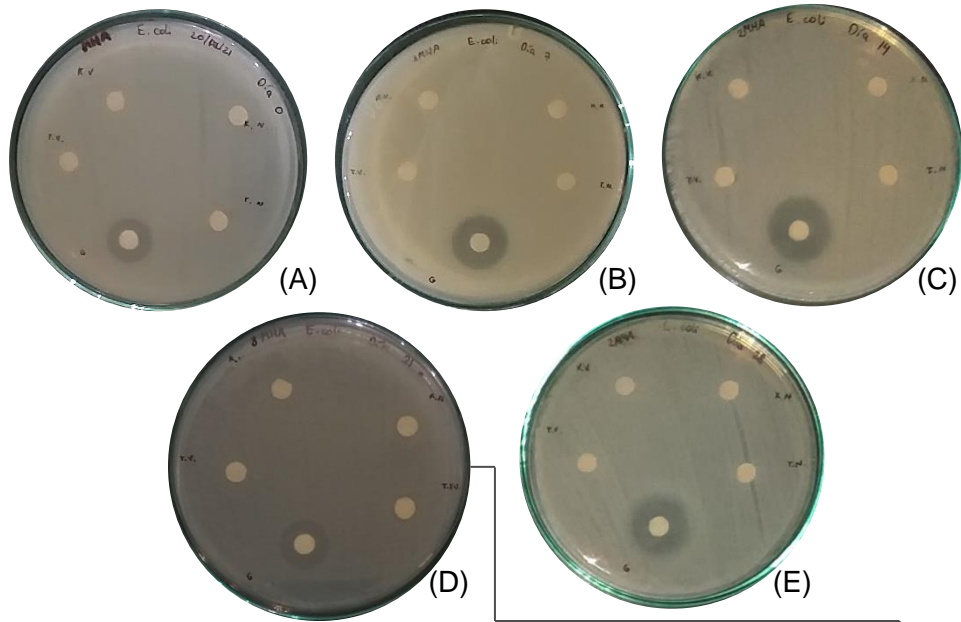


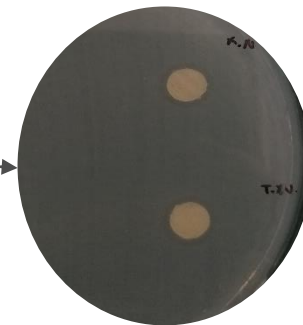
Figura 4. Difusión en disco, resultados en *E. coli* (A) Día 0, (B) Día 7, (C) Día 14, (D) Día 21, (E) Día 28.

No formación de halos de inhibición

Excepto

Kombucha de té negro y el té negro en un halo de 7 mm en *E. coli*

Gentamicina: *E. coli*, (15.95 mm), *S. aureus* (15.3 mm) y *Pseudomonas* spp. (14.4 mm).



Sin resultados significativos

Baja capacidad de difusión de los componentes antimicrobianos de la kombucha.

- Ácido acético: pH 4.5 forma no disociada (pasa membrana celular al citosol).
- Medio MHA pH = 7,3

No se puede determinar la cantidad antimicrobiano difundido.

- Insuficiente difusión.

Interacción desfavorable entre el medio y la kombucha.

- Alta cantidad de cationes divalentes (Mg y Ca): reducción de zonas de inhibición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Macrodilución en caldo

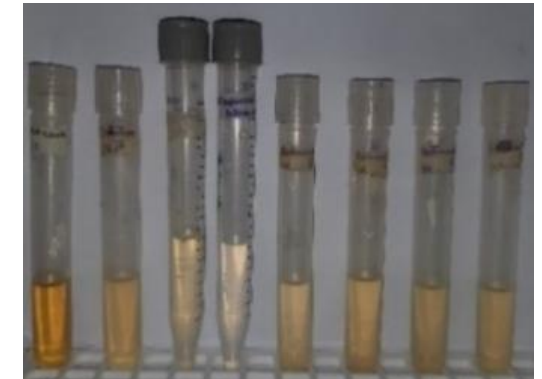
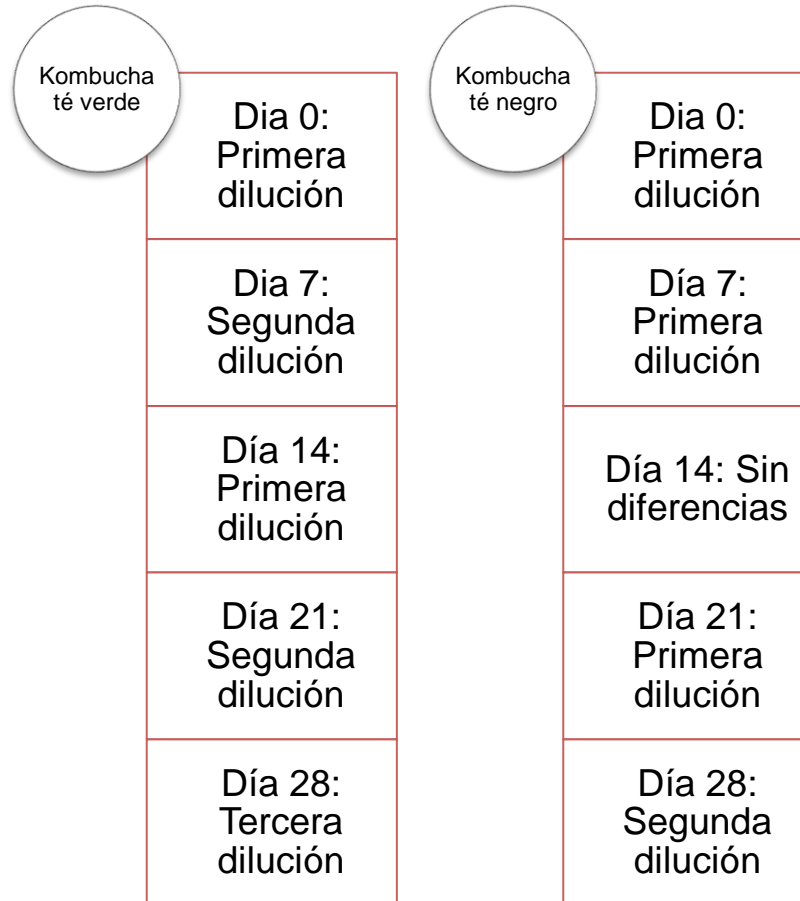


Figura 5. Macrodilución en caldo para *Pseudomonas* spp. (A) Kombucha de té verde día 7. (B) Kombucha de té negro día 7.

Nota. De izquierda a derecha en cada imagen, Tubo 1 - Caldo nutriente; Tubo 2 – Caldo nutriente y bacteria; Tubo 3 – Kombucha y bacteria; Tubo 4 – Gentamicina y bacteria; Tubo 5 – Primera dilución; Tubo 6 – Segunda dilución; Tubo 7 – Tercera dilución; Tubo 8 – Cuarta dilución.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Drop plate

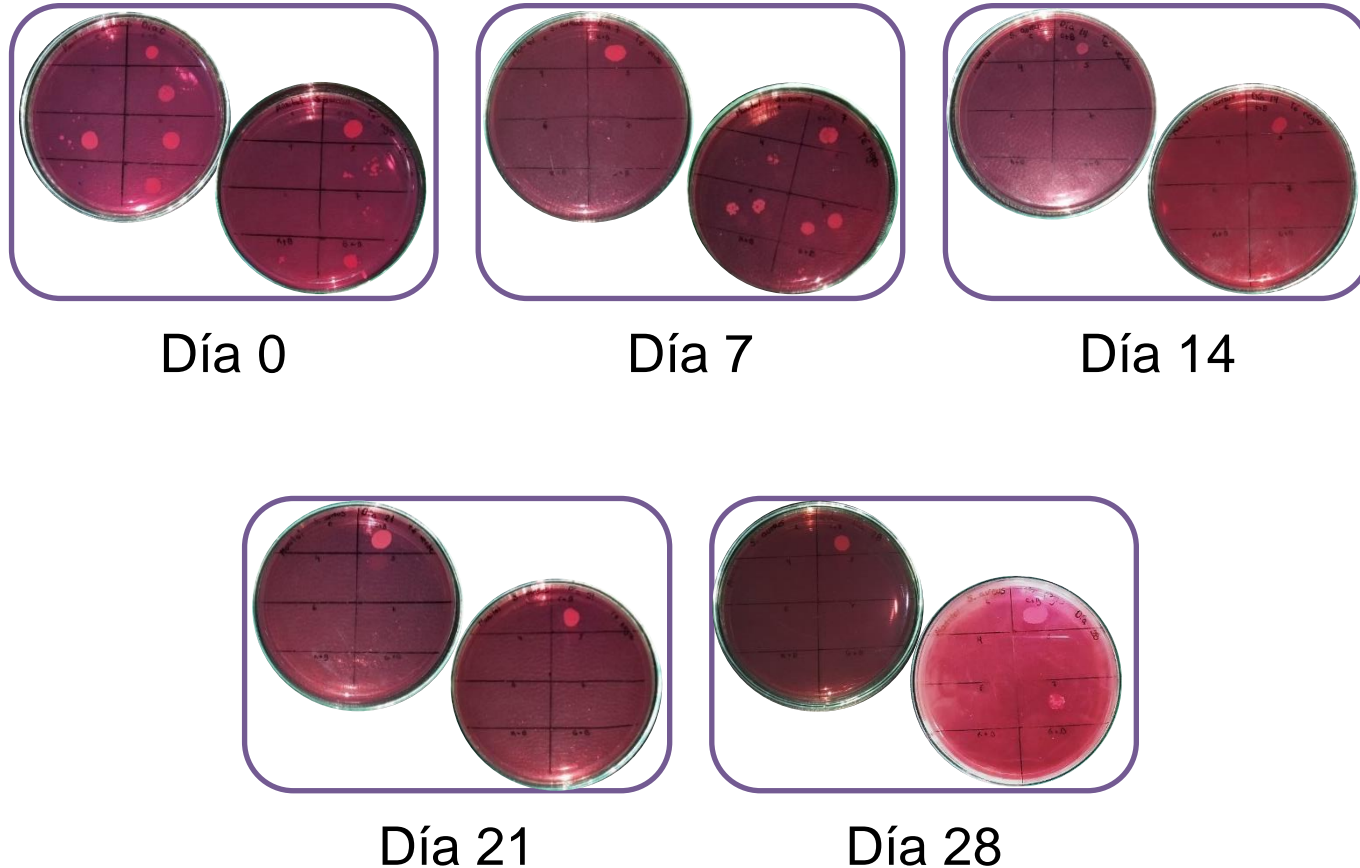


Figura 6. Técnica Drop plate en *S. aureus*.

S. aureus en MSA: Colonias y medio amarillo.



Diferenciación de otros estafilococos (Colonias color rojo).



La bacteria con la que se trabajó no correspondía a *S. aureus*.

Características fenotípicas no corresponden a las esperadas.

Se descartaron estos resultados

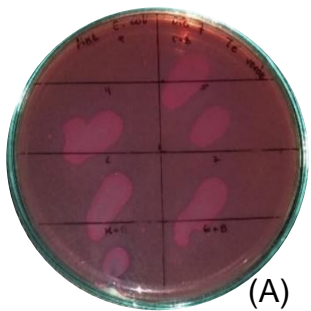
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

E. coli

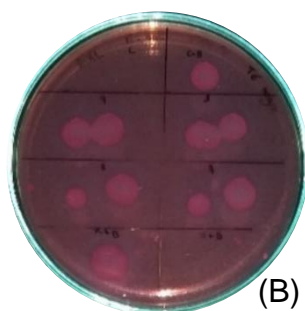
Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Kombucha de té verde (KTV): Sin inhibición	KTV: Sin inhibición	KTV: Sin inhibición	KTV: Sin inhibición	KTV: Sin diluir: 2600 UFC/mL.
Kombucha de té negro (KTN): Sin inhibición	KTN: Sin inhibición	KTN: Sin inhibición	KTN: Sin inhibición	KTN: Sin diluir: Sin inhibición

Pseudomonas spp.

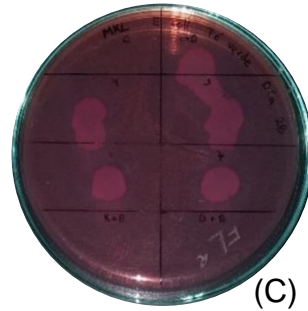
Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
KTV: 1ra dilución: 11500 UFC/mL. Sigüientes diluciones: Colonias incontables.	KTV: Sin diluir: Inhibió la bacteria. 1ra dilución: 100 UFC/mL., 2da dilución: 725 UFC/mL	KTV: Sin diluir: Inhibió la bacteria.	KTV: Sin diluir: Inhibió la bacteria.	KTV: 4ta dilución 100 UFC/mL.
KTN: Sin diluir: 12200 UFC/mL. Sigüientes diluciones: Colonias incontables.	KTN: Sin diluir: Inhibió la bacteria. 1ra dilución: 7100 UFC/mL.	KTN: Sin diluir: 400 UFC/mL. 2da dilución: 9350 UFC/mL, 3ra: 1388 UFC/mL, 4ta: 2375 UFC/mL	KTN: Sin diluir: 100 UFC/mL.	KTN: 3ra dilución: 175 UFC/mL.



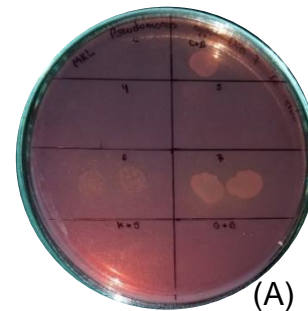
(A)



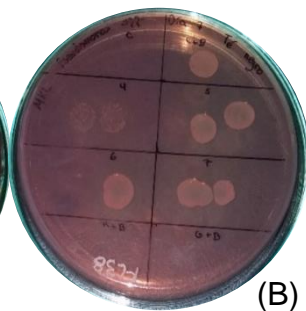
(B)



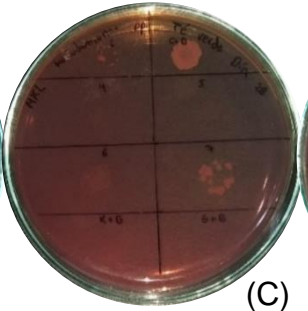
(C)



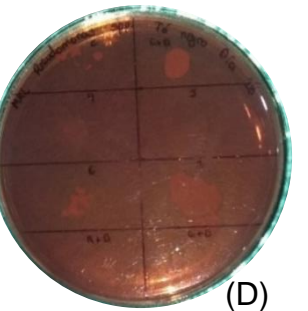
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 7. Técnica Drop Plate en *E. coli*. (A) Día 7 KTV. (B) Día 7 KTN. (C) Día 28 KTV

Figura 8. Técnica Drop Plate en *Pseudomonas spp.* (A) Día 7 KTV (B) Día 7 KTN. (C) Día 28 KTV. (D) Día 28 KTN.

Nota. En cada placa, de izquierda a derecha, C – Caldo nutriente. C + B – Caldo nutriente y bacteria. 4 – Primera dilución. 5 – Segunda dilución. 6 – Tercera dilución. 7 – Cuarta dilución. K + B – Kombucha y bacteria. G + B – Gentamicina y bacteria.



Limitada actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas* spp. y *E. coli*

Kombucha de té verde con una ligera actividad antimicrobiana mayor a kombucha de té negro

Derivada de los componentes formados durante el tiempo de fermentación, ácido acético y flavonoides como epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG), epicatequina (EC) y galato de epigallocatequina (EGCG).

EGCG: Carga negativa se une al lipopolisacárido (carga positiva), genera peróxido de hidrógeno (daño en toda la membrana celular)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración bactericida mínima (CBM) en $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la kombucha de té verde y kombucha de té negro frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp.

Bacteria	Kombucha té verde									
	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	500	1000	250	1000	250	1000	-	-	62.5

Bacteria	Kombucha té negro									
	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	1000	500	1000	500	-	62.5	-	1000	-	125

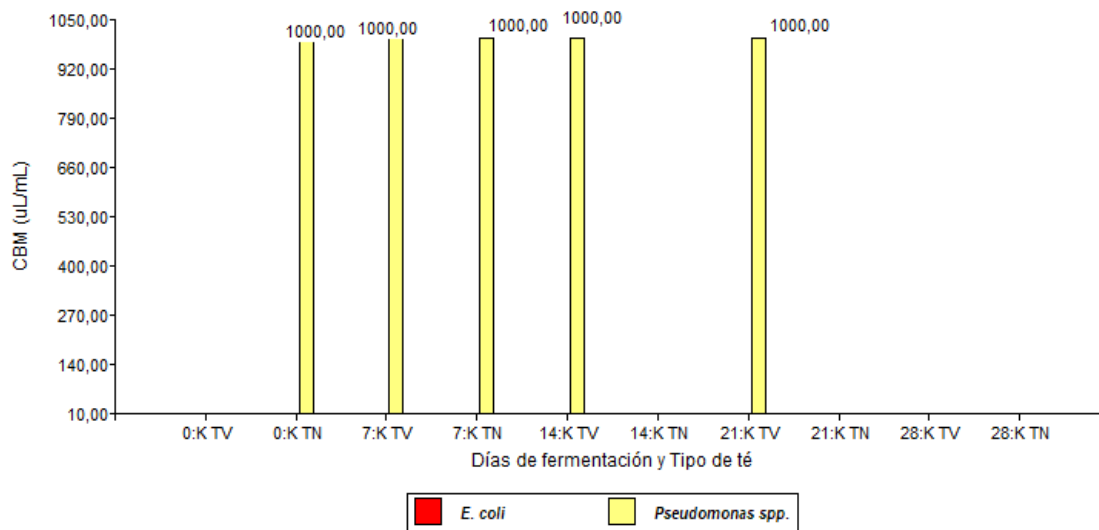


Figura 12. Concentración bactericida mínima en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada tipo de kombucha.

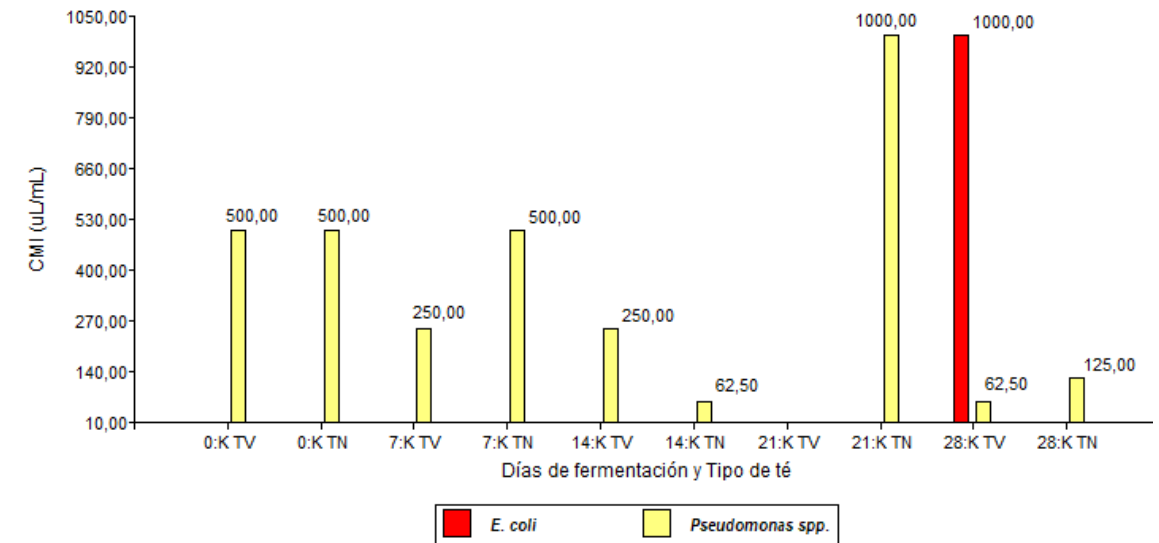


Figura 13. Concentración mínima inhibitoria en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada tipo de kombucha.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

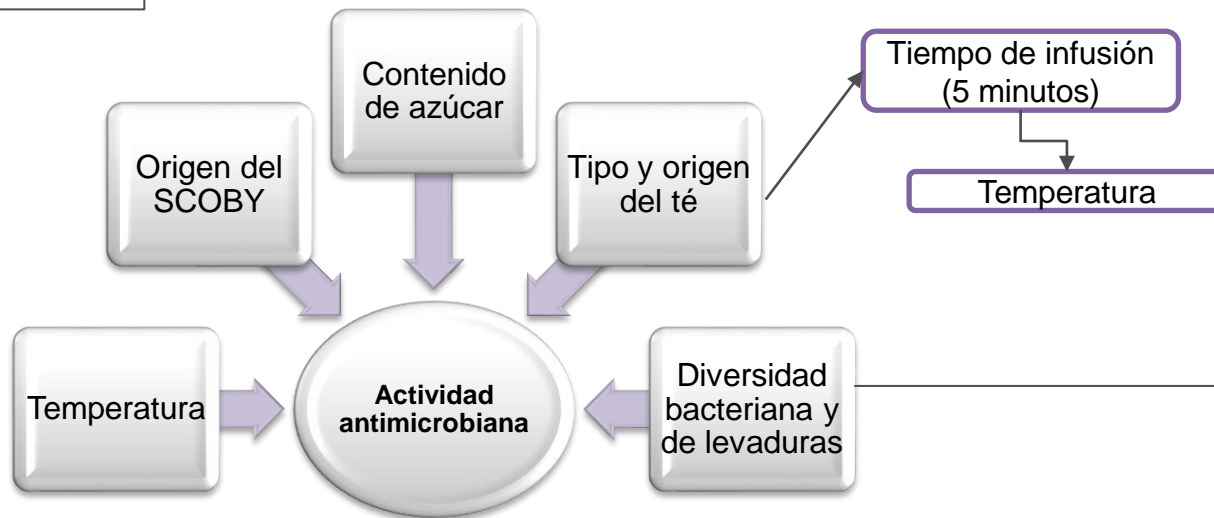
ANOVA para CMI:

- Interacción Kombucha*Bacteria → valor-p = 0.1422
- Interacción Tiempo de fermentación*Bacteria → valor-p = 0.3108

ANOVA para CBM:

- Interacción Kombucha*Bacteria → valor-p = 0.5717
- Interacción Tiempo de fermentación*Bacteria → valor-p = 0.5339

Afectada por:



Alta diversidad bacteriana

Acetobacter, Bacillus, Komagataeibacter, Starmella, Candida sp.

Predominancia de *Candida sp.*

Gluconacetobacter, Gluconobacter, Oenococcus oeni, Zygosaccharomyces.

Origen del SCOBY y té iniciador

CONCLUSIONES

- La elaboración de la kombucha de té verde y de té negro se realizó acorde a métodos bibliográficos, consiguiendo la formación de SCOBYs densos a más días de fermentación y la acidificación del té.
- El pH y sólidos solubles totales fueron medidos en los tiempos de fermentación respectivos, determinando que conforme el paso de los días de fermentación los valores de estos dos parámetros descendían.
- La evaluación del efecto inhibitorio de la kombucha de té verde y de té negro en *E. coli* y *Pseudomonas* spp. determinó que las dos kombuchas tienen un limitado efecto antimicrobiano siendo más notable desde el día 14 de fermentación.
- Al día 14 y 21 la kombucha de té verde alcanzó una CBM igual a 1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$, mientras que el té negro en estos mismos tiempos no presentó ninguna CBM. Al día 28 solo la kombucha de té verde logró una ligera inhibición en *E. coli*, con esto demostrando que la kombucha de té verde tuvo una actividad antimicrobiana ligeramente mayor desde el día 14 comparada con la kombucha de té negro, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.



RECOMENDACIONES

- Mantener un control y seguimiento adecuado de viabilidad y pureza del cepario para evitar contaminación y sea seguro trabajar con los microorganismos conservados.
- Repetir las pruebas de evaluación de la actividad antimicrobiana con una cepa de *S. aureus* correctamente identificada para poder comprobar o descartar la hipótesis presentada.
- Investigar otros métodos que complementen los resultados de la actividad antimicrobiana con las tres bacterias estudiadas, como el método de difusión en pozos de agar.



AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Rafael Vargas M.Sc.

Director del Trabajo de Integración Curricular
Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

Karina Ponce M. Sc.

Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE

Pedro Romero Saker PhD.

Biometrista

Fernanda Loayza Villa PhD.

Universidad San Francisco de Quito

Familia

Amigos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA