

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2024 Volumen 28, Número 1
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx.



MESA DIRECTIVA

2022 – 2024

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Presidenta

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
Vicepresidente

Dra. Beatriz Ruiz Villafán
Secretaria

Dra. María Dolores Reyes Duarte
Tesorero

Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Subsecretario

M. en C. Karina Adames Beas
Vocal Profesional

Biol. Teresa Elizabeth Mtz Oropeza
Vocal Estudiante

EDITORA

Dra. María Soledad Córdova Aguilar
UNAM

Co-editor

Dr. Jorge Gracida
UAQ

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Aurora Antonio Pérez

Dra. Silvia Armenta Jaime

Dr. Pablo Gortáres Moyoroqui

Dr. Daniel Guillén Santos

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona

Dra. Itzel López Rosas

Dra. Isadora Martínez Arellano

Dra. Silvia Andrea Moreno Mendieta

Dr. Jaime Ortega López

Dra. Andrea Sabido Ramos

Dra. Georgina Sandoval

Dra. Elda Patricia Segura Cenicerros

Dra. María Eugenia de la Torre

Dra. Virginia Villacruz

Dra. Beatriz Ruiz Villafán

Dra. Claudia Rodríguez-Almazán

Formación y edición

Pas. QA Mariana Espinoza Tapia

Índice

Instrucciones para los autores	4
Editorial	8
Artículos	
Riboswitches antisentido o de cómo la evolución adapta mecanismos de regulación para obtener respuestas antagónicas	
Mariela Serrano-Gutiérrez y Enrique Merino	9
Organogénesis de <i>Argyranthemum frutescens</i> (L.) a partir de plantas cultivadas <i>in vitro</i> y <i>ex vitro</i> bajo diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento	
Leticia Tombion, María Andrea Coviella, Miguel Ángel Sangiacomo y María Silvina Soto	19
Análisis cinético de biosensores acuáticos para un monitoreo ecotoxicológico temprano	
Pamela Olivares-Ferretti, Viviana Chávez, Matías Peredo-Parada, Jorge Parodi	30
Kéfir de agua: Características, producción y fabricación de biopelículas como una alternativa de uso de excedentes.	
Revisión	
Sara Abigail Vargas Castro y Héctor Ruiz Espinosa	36
Comprendiendo el efecto del tiempo de fermentación sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del “Popo”, una bebida tradicional mexicana	
Zuemy Hernández-Nolasco, Mariana Inés Acateca-Hernández, Enrique Flores-Andrade, Rafael Uzárraga-Salazar, Marisol Castillo-Morales	49

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.

Instrucciones para los autores

2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...”

Instrucciones para los autores

Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solís S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Instrucciones para los autores

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor correspondiente. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y marisol.cordova@icat.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Riboswitches antisentido o de cómo la evolución adapta mecanismos de regulación para obtener respuestas antagónicas

Mariela Serrano-Gutiérrez¹ y Enrique Merino^{1*}

¹ *Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México.*

**enrique.merino@ibt.unam.mx*

Resumen

Los riboswitches son elementos de RNA que regulan genes que participan en la biosíntesis o transporte de metabolitos y componentes esenciales, como vitaminas, cofactores, nucleótidos y aminoácidos. Se caracterizan por su alta afinidad y especificidad hacia las moléculas con las que interactúan. Por lo general, estas moléculas señal son productos finales de vías biosintéticas o de transporte controladas por sus genes regulados. Los riboswitches suelen encontrarse en la región intergénica 5' y regulan negativamente la expresión génica al inhibir la transcripción o traducción de sus genes blanco en presencia de estas moléculas. Desde su descubrimiento hace más de dos décadas, solo se habían reportado dos casos excepcionales de riboswitches ubicados en el extremo 3', cuya transcripción era opuesta a la de sus genes regulados. Esto desafió el paradigma de la mayoría de los riboswitches, que se cotranscriben en la misma unidad transcripcional regulada. Estos riboswitches, conocidos ahora como riboswitches antisentido, son un claro ejemplo de la plasticidad de los organismos que deben generar nuevas respuestas a partir de unidades funcionales reguladoras. Debido a esto, su conservación en secuencias primarias, secundarias y terciarias, así como su amplia distribución en organismos de los tres dominios de la vida, ha llevado a la propuesta de que podrían haber sido los primeros elementos de regulación en un posible mundo primigenio basado en moléculas de RNA. Con este trabajo se propone visibilizar la importancia de los riboswitches antisentido como algo más que un evento fortuito, además de abrir la discusión acerca de la temporalidad de la aparición de estos elementos regulatorios.

Palabras claves: *Riboswitches antisentido, regulación, RNAs antisentido, mundo de RNA, origen de la vida.*

Abstract

Riboswitches are RNA elements which regulate genes involved in biosynthesis or transport of metabolites and essential compounds such as vitamins, cofactors, nucleotides and amino acids. They are characterized by its great affinity and specificity to their sensed molecules. Typically, these signal molecules are end products of biosynthetic or transport pathways controlled by their regulated genes. Riboswitches tend to be located at the 5' intergenic region and negatively regulate the gene expression by inhibiting the transcription or translation of their target genes in the presence of these molecules. Ever since their discovery over two decades ago, only two exceptional cases of riboswitches located at the 3' end, whose transcription was opposite to that of the regulated genes, had been reported. This challenged the paradigm of most riboswitches cotranscribed in the same regulated transcriptional unit. These riboswitches, now known as antisense riboswitches, are a clear example of the plasticity of organisms that must generate new responses from regulatory functional units. Due to this, their conservation in primary, secondary and tertiary sequences, as well as their wide distribution in organisms from the three domains of life, has led to the proposal that they could have been the first regulatory elements in a possible primordial world based on RNA molecules. The aim of this work is bringing to light the importance of antisense-acting riboswitches as something greater than a stochastic event, besides to open up the discussion about the emergence temporality of these regulatory elements.

Key Words: *Antisense-acting riboswitches, gene regulation, antisense RNAs, RNA world, origin of life*

Introducción

Una de las características esenciales de cualquier ser vivo es su capacidad para regular la expresión de sus componentes genéticos de tal forma que puedan expresarse en la cantidad y el tiempo que son requeridos para optimizar los recursos que obtienen del medio ambiente. En organismos procariontes, en donde se describieron los primeros modelos de regulación a un nivel molecular, la idea de que las proteínas reguladoras eran los únicos elementos responsables de orquestar dicha expresión molecular constituyó un dogma, que inició en 1961 con la descripción de la regulación del operón de lactosa en la bacteria *Escherichia coli* por la proteína reguladora LacI (Jacob & Monod, 1961). En dicho modelo fue posible explicar que la expresión del operón que codificaba para enzimas encargadas de la degradación de la lactosa era expresada exclusivamente en presencia de este azúcar en el medio de cultivo gracias a la participación de una proteína reguladora llamada LacI. Este modelo de regulación sentó las bases para explicar la regulación de otros miles de sistemas de regulación bacteriana, todos ellos basados en proteínas reguladoras. A principios del siglo XX, ya se contaba con la secuencia de un centenar de genomas bacterianos de diferentes especies, lo que dio origen a una nueva área de la Biología Molecular llamada Genómica Comparativa. Fue entonces cuando el grupo de la Dra. Tina Henkin, estudiando la regulación del gen que codifica para la aminoacil tRNA-sintetasa, *tyrS*, en *Bacillus subtilis* (Grundy et al., 1997); y el grupo del Dr. Mario Soberón, caracterizando la regulación de los genes de biosíntesis de tiamina en *Rhizobium etli* (Miranda-Ríos et al., 1997); pudieron identificar motivos de secuencias nucleotídicas inusualmente largas y altamente conservadas en las regiones intergénicas de los genes ortólogos de diferentes especies bacterianas, lo que los llevó a proponer su potencial papel en la regulación, como parte de unidades transcripcionales. Pocos años después, la hipótesis sobre la capacidad regulatoria de estos elementos conservados de RNA fue verificada experimentalmente por el grupo del Dr. Ronald Breaker (Winkler et al., 2002). A este novedoso elemento de regulación se le llamó "riboswitch", por su naturaleza de tipo RNA y su capacidad de

alternar ("switch") entre los estados de regulación activo e inactivo.

Características de los riboswitches como elementos de regulación de la expresión

Como se mencionó anteriormente, a principios de este siglo, se describió un nuevo tipo de elementos de regulación, denominado riboswitch, gracias a su participación como interruptor o switch genético en respuesta a la presencia de su correspondiente molécula blanco y estar compuesto por RNA (Knappenberger & Hiller, 2022; Salvail & Breaker, 2023; Serganov & Patel, 2007; Vitreschak et al., 2004). Los riboswitches se caracterizan por reconocer una gran variedad de moléculas que por su naturaleza pueden ser agrupadas principalmente en coenzimas (Cbl, FMN, THF, TPP, SAM, Moco), nucleótidos (Purinas, 2-deoxiguanosina, PreQ1), iones (F^- , Mg^{2+} , NiCo, Mn^{2+}) y aminoácidos (Glicina, Lisina, Glutamina). Actualmente, el número de clases de riboswitches conocidos es aproximadamente 50 y, a pesar de su diversidad, presentan tres características en común: suelen tener tamaños pequeños, son elementos centrales en el metabolismo de los organismos y comúnmente corresponden a algunos de los productos finales de las vías biosintéticas o de transporte a las que regulan (Kavita & Breaker, 2023; Mukherjee et al., 2023; Salvail & Breaker, 2023; Serrano-Gutiérrez & Merino, 2023). Gracias a la presión selectiva para reconocer a su ligando, los riboswitches han evolucionado para contar con conformaciones tridimensionales que le permiten identificarlos con gran afinidad y alta especificidad.

Los riboswitches suelen encontrarse en la región intergénica 5' y regulan negativamente la expresión génica al inhibir la transcripción o traducción de sus genes objetivo en presencia de estas moléculas. Suelen estar compuestos de dos dominios funcionales. El primer dominio es llamado plataforma de reconocimiento, que es una secuencia de ribonucleótidos que adopta una estructura tridimensional específica capaz de reconocer selectivamente a su ligando. El segundo dominio es llamado de plataforma de expresión y contiene el elemento a partir del cual se modulará la expresión del gen regulado (Breaker, 2011; Garst et al., 2011). Figura 1.

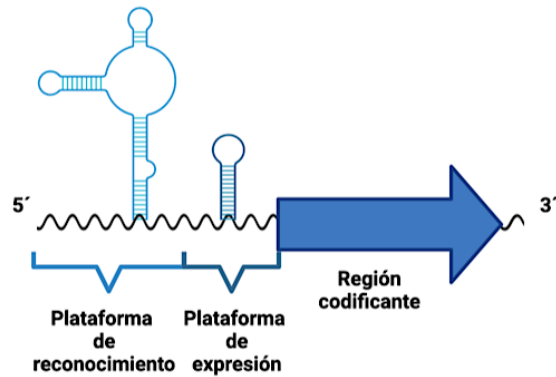


Figura 1. Dominios funcionales de riboswitches. Los riboswitches se integran por dos dominios distintos: la plataforma de reconocimiento y la plataforma de expresión. Como su nombre lo indica, la primera se encarga de identificar los cambios en la concentración de un metabolito dado con alta afinidad y especificidad gracias a su secuencia y estructura tridimensional; y la segunda se encarga de generar un cambio que como consecuencia controlará la expresión del gen regulado.

Comúnmente, la unión de la molécula señal a la plataforma de reconocimiento le induce un cambio conformacional que es transmitido a la plataforma de expresión favoreciendo alguna de las siguientes estructuras secundarias de regulación: a) un terminador transcripcional del tipo Rho independiente que al plegarse favorece el término prematuro de la transcripción; b) una estructura secundaria que secuestra al sitio de unión al ribosoma con

lo que se inhibe el inicio de la traducción del gen colocado inmediatamente río abajo, c) un plegamiento compatible con la formación de un sitio de unión de ribozima, misma con la que la región líder del mensajero policistrónico es escindido; y d) en el caso de organismos eucariontes, plegamientos que modulan la formación de sitios de splicing alternativos en el mRNA (Garst et al., 2011; Mccown et al., 2017; Sherwood & Henkin, 2016). Figura 2.

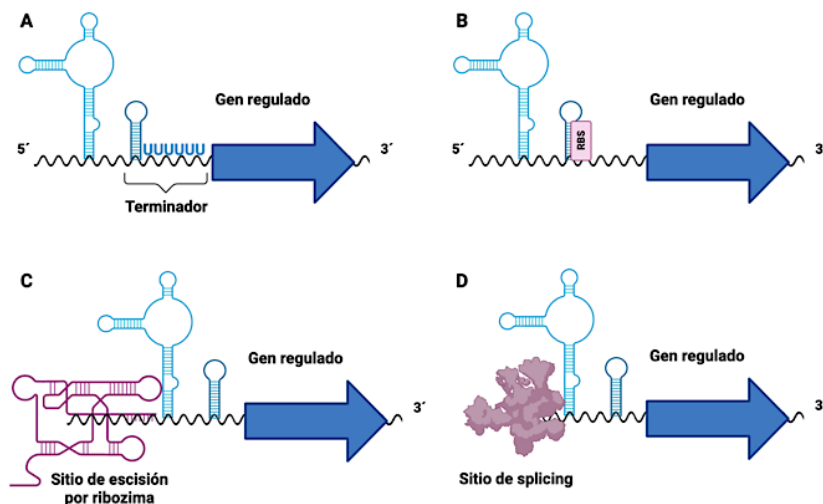


Figura 2. Plataformas de expresión más comunes de los riboswitches. La modulación de la expresión del gen regulado por un riboswitch puede darse mediante diversos mecanismos, de acuerdo a su plataforma de expresión. Las estructuras secundarias más usuales son: A. Formación de una estructura tipo terminador Rho independiente; B. Secuestro del sitio de unión a ribosoma (RBS); C. Estructuración de un sitio de reconocido por una ribozima; D. Configuración de un sitio reconocido por un spliceosoma.

Riboswitches como primeros elementos de regulación de la expresión genética en un mundo primigenio

Gracias a estimaciones basadas en registros fósiles antiguos y datación radiométrica de rocas y minerales, se considera que la vida en la Tierra comenzó hace aproximadamente 3,500 millones de años. Durante ese tiempo, las condiciones en este mundo primigenio eran drásticamente diferentes de las actuales y claramente inhóspitas a la vida como la conocemos hoy en día. La Tierra estaba mayormente cubierta por océanos primitivos y su atmósfera estaba compuesta por gases como metano, amoníaco, vapor de agua y dióxido de carbono. Estos compuestos inorgánicos, expuestos a fuentes de energía intensas, como la actividad volcánica y las tormentas eléctricas, crearon un entorno favorable para la síntesis abiótica de diversos compuestos orgánicos simples, tales como aminoácidos, ácidos grasos y ciertos tipos de azúcares (Baum, 2018; Müller et al., 2022; Paleos, 2015).

Una de las principales características de los seres vivos es que su información genética se transmite de generación en generación y es el DNA, o ácido desoxirribonucleico, la molécula biológica que alberga la información genética hereditaria en la mayoría de los organismos vivos que conocemos hoy en día. No obstante, se piensa que esto no fue así cuando la vida inició en la Tierra (Sankaran, 2016).

En las etapas tempranas de la evolución molecular, el RNA, o ácido ribonucleico, pudo haber sido la molécula en el que residiera la información genética de los primeros organismos vivos. A esta hipótesis se le

conoce como “La hipótesis del mundo del RNA” que sugiere que la vida en la Tierra comenzó con moléculas de RNA que pudieron haber tenido la capacidad de copiarse a sí mismas gracias a la presencia de ciertas arcillas que actuaron como catalizadores para la formación de enlaces químicos y la polimerización de ribonucleótidos. La evidencia con la que contamos actualmente y que soporta dicha teoría, es la presencia de organismos, como ciertos virus, cuyo material genético es el RNA y tienen la propiedad de autoreplicarse, así como la capacidad catalítica de algunas moléculas de RNA, llamadas ribozimas, como es el caso de la Ribozima del grupo I, presente en algunos intrones y algunos virus, misma que es capaz de cortar y unir hebras de RNA mediante una reacción de autosplicing, o la RNasa P, involucrada en el procesamiento de los precursores de RNAs de transferencia (tRNAs). Adicionalmente, las moléculas de RNA pueden ser partes esenciales de complejos riboproteicos como los ribosomas, esenciales en el proceso de la traducción de proteínas, el complejo del spliceosoma, involucrado en procesamiento del mRNA de organismos eucariontes, o los complejos de las ribonucleoproteínas RNPs, en donde los microRNAs forman un complejo con proteínas que regulan la expresión de sus genes blanco a través de su degradación o la inhibición de su traducción (Bonfio, 2022; Haig, 2021; Mayer, 2023; Saito, 2022).

Las diversas capacidades que tiene el RNA, por las que se piensa que esta molécula pudo haber jugado un papel preponderante en el mundo primigenio se representan en la Fig. 3.

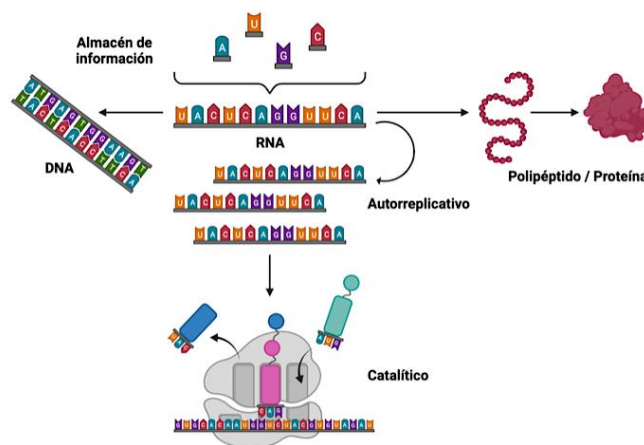


Figura 3. Propiedades del RNA. La molécula de RNA posee propiedades de almacenamiento de información, autoreplicación y catálisis.

Artículos

Considerando los atributos de regulación de los riboswitches, su capacidad de reconocer a sus moléculas señal con gran afinidad y alta especificidad sin requerir la participación de ningún componente proteico y la extensa distribución de algunas familias de riboswitches en los tres dominios de la vida Figura 4 se ha propuesto, en términos de la

parsimonia de su origen, que debieron de haber estado presentes en el último ancestro común previo a la división de los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, por lo que pueden ser considerados como los primeros elementos de regulación de los organismos vivos (Garst et al., 2011; Serganov & Patel, 2007; Vitreschak et al., 2004).

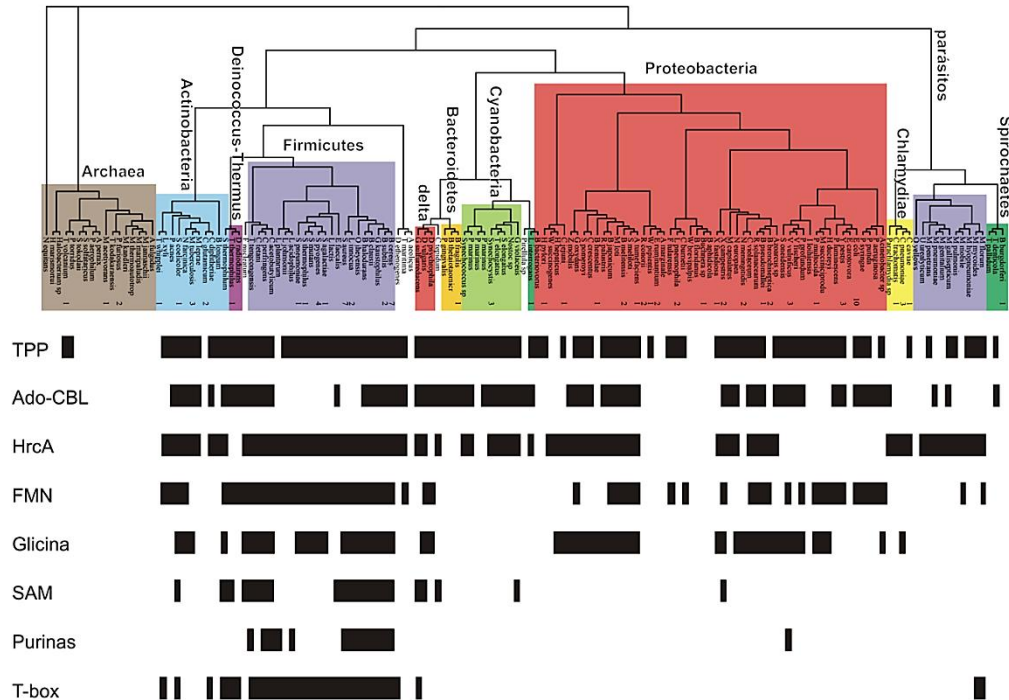


Figura 4. Distribución filogenética de riboswitches. En la figura se muestra una muestra representativa de diferentes clases de riboswitches (indicadas en el extremo inferior izquierdo), mismos que es posible apreciar se distribuyen ampliamente en los phylum de bacterias y arqueas representados (indicados en la parte superior de la imagen), además se muestra que su distribución es uniforme sin importar el phylum al cual pertenezcan (Tomado de Abreu-Goodger, 2005).

Regulación de la expresión génica basada en RNAs antisentido

El término de RNA antisentido es usado para describir cierto tipo de moléculas reguladoras de RNA que poseen una secuencia reversa complementaria a la de su secuencia blanco y que, por lo tanto, son comúnmente transcritas en sentido opuesto al locus al que reconocen mediante interacciones por puentes de hidrógeno entre bases complementarias. Los mecanismos moleculares empleados por los RNAs antisentido son muy amplios y pueden incluir diferentes niveles de regulación como la transcripción, la traducción, la estabilidad del mRNA, y la replicación y segregación de plásmidos (Brantl, 2007; Georg & Hess, 2011; Saberli et al., 2016). Los elementos reguladores de RNA, comparados con los elementos reguladores proteicos, presentan diversas ventajas: son menos costosos energéticamente para la célula, su producción

es más rápida debido a que son más pequeños que la mayoría de las proteínas y no requieren del proceso de traducción. Asimismo, sus efectos suelen manifestarse con mayor velocidad y especificidad gracias a la conservación de su secuencia y estructura (Waters & Storz, 2009).

Gracias al desarrollo de las nuevas técnicas de secuenciación, en diversos análisis sobre la transcripción de diferentes organismos, ha sido posible identificar nuevos sistemas de regulación basados en RNAs antisentido y que son mucho más abundantes de lo originalmente pensado. Un novedoso ejemplo de este tipo de regulación es el llamado "excludon", mediante el cual es posible inhibir la expresión de un operón, a la vez que aumenta la expresión de otro. Lo anterior puede ocurrir mediante tres diferentes tipos de mecanismos regulatorios: a) colisión de RNA polimerasas, en la cual las RNA polimerasas

Artículos

de las hebras complementarias de DNA chocan entre sí durante la transcripción convergente; b) formación de un dúplex de RNA, mismo que está sujeto a degradación por la actividad de la RNasa III; y c) acumulación de superenrollamiento del DNA,

que se origina a partir de los enrollamientos positivos en la doble hebra de DNA que ocurren cuando las RNAs polimerasas que transcriben en direcciones opuestas avanzan a través del mismo locus de DNA (Lejars et al., 2019; Sesto, 2013). Figura 5.

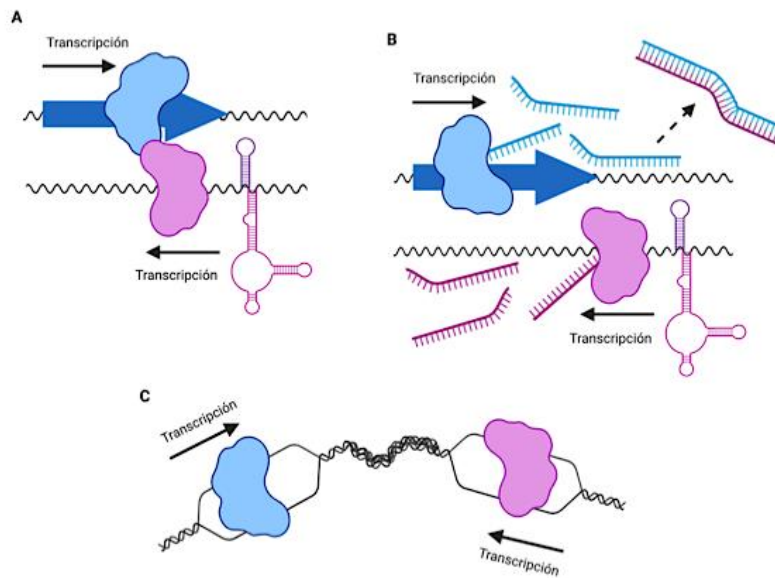


Figura 5. Mecanismos moleculares de regulación de RNA polimerasas que transcriben en dirección opuesta. A. Colisión de RNA polimerasas; B. Formación de un dúplex mRNA/asRNA; C. Acumulación de superenrollamiento del DNA (Modificado de Serrano-Gutiérrez & Merino, 2023).

Riboswitches antisentido: Plasticidad evolutiva para generar variantes regulatorias.

En términos generales, se considera que los riboswitches regulan en *cis* y se encuentran ubicados en el extremo 5' de sus genes blanco, regulando, en la mayoría de los casos, negativamente la expresión genética en respuesta a la presencia de sus correspondientes moléculas señal. Sin embargo, hace aproximadamente una década, fueron reportados dos casos excepcionales en los que los riboswitches estaban localizados en el extremo 3' y cuya transcripción era opuesta a la de sus genes regulados. Estos riboswitches, ahora conocidos como riboswitches antisentido, representan un claro ejemplo de la plasticidad que tienen los organismos para generar nuevas respuestas regulatorias a partir de elementos funcionales ya existentes (André et al., 2008; Mellin et al., 2013; Serrano-Gutiérrez & Merino, 2023).

El primer ejemplo de un riboswitch antisentido fue descrito en el año 2008 en el genoma de

Clostridium acetobutylicum, durante la caracterización de la regulación del operón *ubiG/mccBA*, encargado de la interconversión de los aminoácidos metionina a cisteína. En este caso, un riboswitch cuya molécula señal es la S-adenosilmetionina (SAM) se localiza en extremo 3' y su transcripción es en sentido opuesto al del operón. Cuando la concentración intracelular de SAM es baja, se favorece la formación de un antiterminador transcripcional en la plataforma de expresión, y en consecuencia, la transcripción a partir del promotor del riboswitch avanza en sentido contrario hacia el interior del operón *ubiG/mccBA*, inhibiendo su expresión por los mismos mecanismos moleculares descritos para los elementos llamados "excludones", es decir, ya sea mediante la colisión de RNA polimerasas transcribiendo convergentemente, la formación de un dúplex de RNA, o la acumulación de superenrollamiento del DNA. De manera contraria, cuando la concentración de SAM es baja, la plataforma de expresión del riboswitch se pliega para formar un terminador

Artículos

transcripcional Rho-independiente, terminando prematuramente la transcripción proveniente del riboswitch antisentido, y, en consecuencia, no se afecta la transcripción proveniente del promotor del operón localizado en el extremo 5' del mismo. Este proceso de regulación conducido por el riboswitch antisentido garantiza que la síntesis del operón *ubiG/mccBA* ocurra de manera exclusiva cuando existe una concentración intracelular de SAM adecuada (André et al., 2008).

La segunda descripción de este elemento regulatorio de RNA no canónico se llevó a cabo en el año 2013. En este caso se reportó la existencia de un riboswitch antisentido que reconoce a cobalamina (vitamina B₁₂), en el extremo 3' del gen que codifica para el factor transcripcional *PocR* en *Listeria monocytogenes*, el cual regula un grupo de genes denominado *pdu*, involucrados en la utilización de propanediol en el proceso infeccioso de esta bacteria. Es importante mencionar que dichos genes utilizan a la cobalamina como cofactor para ser activos. Debido a lo anterior, cuando la concentración de cobalamina es baja, la síntesis de los genes *pdu* será innecesaria porque no podrán ser activos en ausencia de la misma y, por lo tanto, el riboswitch antisentido de cobalamina inhibirá su síntesis por medio de alguno de los mecanismos moleculares antes mencionados. En caso contrario, cuando la célula crece en niveles elevados de cobalamina, la síntesis de los genes involucrados en el metabolismo del propanediol son transcritos por el regulador *PocR* (Mellin et al., 2013).

Considerando los ejemplos de riboswitches antisentido antes mencionados, recientemente, Serrano-Gutiérrez y Merino realizaron un estudio bioinformático con el propósito de identificar nuevos casos de esta disposición no-canónica de riboswitches en el genoma de bacterias y arqueas, encontrando un número muy significativo de ellos. El análisis de la regulación esperada para dichos riboswitches antisentido, en términos de las funciones y las vías metabólicas de los genes regulados, permitió establecer tendencias de los principales grupos de genes que pueden estar regulados por este novedoso sistema de regulación, encontrando que pertenecen fundamentalmente a las siguientes clases: a) genes codificantes para enzimas involucradas en la interconversión de compuestos relacionados con el metabolito detectado por el riboswitch; b) genes que codifican enzimas que requieren un cofactor para volverse activas o participar en una vía metabólica en la cual otra enzima requiere el cofactor detectado por el riboswitch; c) genes que codifican proteínas transportadoras para compuestos relacionados con el metabolito detectado por el riboswitch; y d) genes que codifican proteínas de señalización celular (Serrano-Gutiérrez & Merino, 2023).

En todos los casos anteriormente mencionados, el cambio de posición del riboswitch a la región intergénica 3', así como la transcripción en antisentido, originaron una respuesta contraria a la observada cuando se cuenta con este elemento en la posición canónica en el extremo 5'. Figura 6.

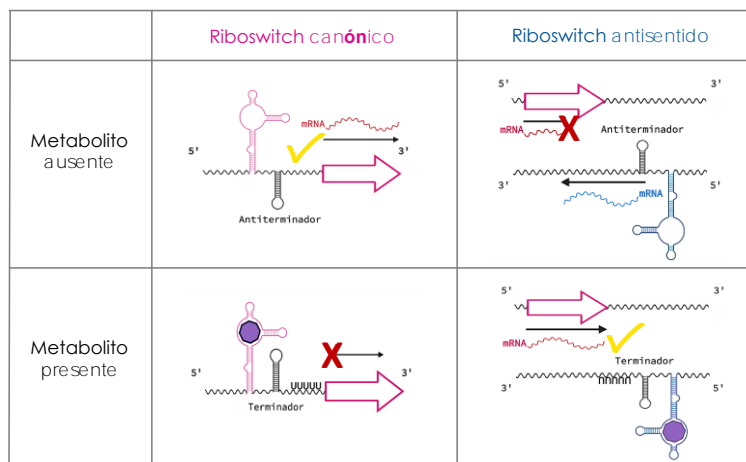


Figura 6. Mecanismo de regulación de riboswitches canónicos vs riboswitches antisentido. La regulación de los riboswitches antisentido sobre su gen blanco ocurre a nivel de interferencia transcripcional. Se propone que se desencadena de manera opuesta a los riboswitches canónicos, localizados en el extremo 5' de su gen blanco de regulación.

Artículos

Finalmente, el análisis bioinformático efectuado en el último estudio mostró que los riboswitches antisentido se encuentran más ampliamente distribuidos de lo originalmente pensado y hace patente la gran plasticidad

con la que han contado los riboswitches como elementos de regulación de la expresión génica, desde un estado primigenio en el que surgió la vida, hasta nuestros días. Figura 7.

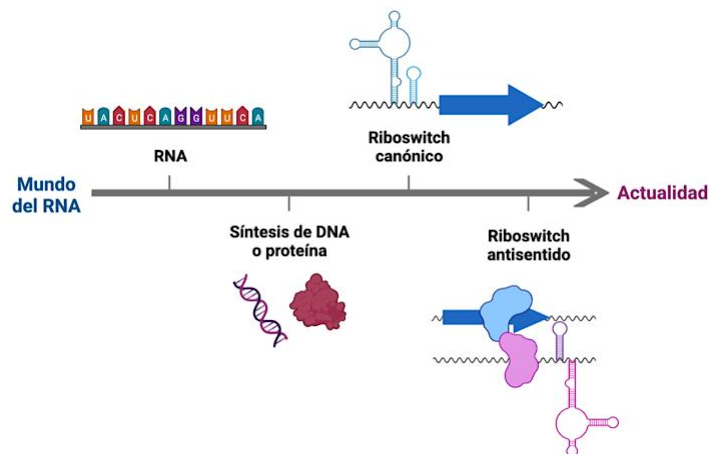


Figura 7. Línea de tiempo del sobre la posible evolución de los riboswitches como elementos de regulación de la expresión génica. Se propone la temporalidad de aparición de los elementos genéticos, desde la propuesta del mundo del RNA hasta la descripción de los riboswitches antisentido.

Perspectivas

Como se ha mencionado hasta ahora, el estudio y conocimiento de los riboswitches antisentido es un campo prometedor que aún tiene mucho por descubrir y, gracias a los análisis *in silico*, es posible abrir un amplio panorama acerca de la importancia de este tipo de elemento regulatorio.

El descubrimiento de elementos regulatorios no canónicos nos permite conocer a profundidad nuevos mecanismos, tanto de metabolismo celular, como de evasión de mecanismos de control de su propio desarrollo, lo cual resulta benéfico tanto para la célula como para nosotros como científicos.

De manera específica, resulta de interés el estudio del origen evolutivo de los

riboswitches antisentido, con especial importancia en algunas familias de riboswitches tales como aquellas relacionadas a moléculas señalizadoras (di-GMP-cíclico) y compuestos antimicrobianos (aminoglicósidos) (Serrano-Gutiérrez & Merino, 2023), ya que el estudio de éstos permitiría conocer aspectos relacionados con los procesos vitales en el metabolismo celular y la crisis de antimicrobianos que se vive en la actualidad, respectivamente. La verificación experimental de los resultados obtenidos en estudios *in silico* será de gran relevancia para tener una visión más integral sobre el proceso de evolución de nuevos mecanismos de regulación en organismos bacterianos (André et al., 2008; Mellin et al., 2013).

Referencias

Abreu-Goodger, C. (2005). *Tesis de Doctorado. Señales conservadas en regiones intergénicas en bacterias: Riboswitches y más allá.* UNAM.

André, G., Even, S., Putzer, H., Burguière, P., Croux, C., Danchin, A., Martin-Verstraete, I., & Soutourina, O. (2008). S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium*

acetobutylicum. *Nucleic Acids Research*, 36(18), 5955–5969. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn601>

Baum, D. A. (2018). The origin and early evolution of life in chemical composition space. *Journal of Theoretical Biology*, 456, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.08.016>

Artículos

- Bonfio, C. (2022). A possible path towards encoded protein synthesis on ancient Earth. *Nature*, *605*(7909), 231–232. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-01256-3>
- Brantl, S. (2007). Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Current Opinion in Microbiology*, *10*(2), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.012>
- Breaker, R. R. (2011). Prospects for Riboswitch Discovery and Analysis. In *Molecular Cell* (Vol. 43, Issue 6, pp. 867–879). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.024>
- Garst, A. D., Edwards, A. L., & Batey, R. T. (2011). Riboswitches: Structures and mechanisms. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 3, Issue 6, pp. 1–13). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003533>
- Georg, J., & Hess, W. R. (2011). cis - Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *75*(2), 286–300. <https://doi.org/10.1128/mubr.00032-10>
- Grundy, F. J., Hodil, S. E., Rollins, S. M., & Henkin, T. M. (1997). Specificity of tRNA-mRNA interactions in *Bacillus subtilis* tyrS antitermination. *Journal of Bacteriology*, *179*(8), 2587–2594. <https://doi.org/10.1128/jb.179.8.2587-2594.1997>
- Haig, D. (2021). A Textual Deconstruction of the RNA World. *Biosemiotics*, *14*(3), 651–656. <https://doi.org/10.1007/s12304-021-09444-w>
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, *3*(3), 318–356. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7)
- Kavita, K., & Breaker, R. R. (2023). Discovering riboswitches: the past and the future. *Trends in Biochemical Sciences*, *48*(2), 119–141. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.08.009>
- Knappenberger, A. J., & Hiller, D. A. (2022). How Do Bacteria “See” Molecules Inside Themselves? *Frontiers for Young Minds*, *10*. <https://doi.org/10.3389/frym.2022.686804>
- Lejars, M., Kobayashi, A., & Hajnsdorf, E. (2019). Physiological roles of antisense RNAs in prokaryotes. *Biochimie*, *164*, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.015>
- Mayer, C. (2023). Order and Complexity in the RNA World. *Life*, *13*(3), 603. <https://doi.org/10.3390/life13030603>
- Mccown, P. J., Corbino, K. A., Stav, S., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017). Riboswitch diversity and distribution. *RNA*, *23*(7), 995–1011. <https://doi.org/10.1261/rna.061234>
- Mellin, J. R., Tiensuu, T., Bécavin, C., Guoin, E., Johansson, J., & Cossart, P. (2013). A riboswitch-regulated antisense RNA in *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(32), 13132–13137. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304795110>
- Miranda-Ríos, J., Morera, C., Taboada, H., Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J., & Soberón, M. (1997). Expression of thiamin biosynthetic genes (thiCOGE) and production of symbiotic terminal oxidase cbb3 in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*, *179*(22), 6887–6893. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.6887-6893.1997>
- Mukherjee, S., Retwitzer, M. D., Hubbell, S. M., Meyer, M. M., & Barash, D. (2023). A computational approach for the identification of distant homologs of bacterial riboswitches based on inverse RNA folding. *Briefings in Bioinformatics*, 1–12.
- Müller, F., Escobar, L., Xu, F., Węgrzyn, E., Nainytė, M., Amatov, T., Chan, C. Y., Pichler, A., & Carell, T. (2022). A prebiotically plausible scenario of an RNA-peptide world. *Nature*, *605*(7909), 279–284. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04676-3>
- Paleos, C. M. (2015). A decisive step toward the origin of life. *Trends in Biochemical Sciences*, *40*(9), 487–488. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.06.001>
- Saberi, F., Kamali, M., Najafi, A., Yazdanparast, A., & Moghaddam, M. M. (2016). Natural antisense RNAs as mRNA regulatory elements in bacteria: A review on

Artículos

function and applications. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 21(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0007-z>

Saito, H. (2022). The RNA world 'hypothesis.' *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(9), 582. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00514-6>

Salvail, H., & Breaker, R. R. (2023). Riboswitches. *Current Biology*, 33(9), R343–R348. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.03.069>

Sankaran, N. (2016). The RNA World at Thirty: A Look Back with its Author. *Journal of Molecular Evolution*, 83(5–6), 169–175. <https://doi.org/10.1007/s00239-016-9767-3>

Serganov, A., & Patel, D. J. (2007). Ribozymes, riboswitches and beyond: Regulation of gene expression without proteins. *Nature Reviews Genetics*, 8(10), 776–790. <https://doi.org/10.1038/nrg2172>

Serrano-Gutiérrez, M., & Merino, E. (2023). Antisense-acting riboswitches: A poorly characterized yet important model of transcriptional regulation in prokaryotic organisms. *Plos One*, 18(2), e0281744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281744>

Sesto, N. et al. (2013). The excludon: a new concept in bacterial antisense RNA-mediated gene regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 11(2), 75–82.

Sherwood, A. V., & Henkin, T. M. (2016). Riboswitch-Mediated Gene Regulation: Novel RNA Architectures Dictate Gene Expression Responses. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 361–374. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104306>

Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A., & Gelfand, M. S. (2004). Riboswitches: The oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends in Genetics*, 20(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.11.008>

Waters, L., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4), 615–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>

Winkler, W., Nahvi, A., & Breaker, R. R. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910), 952–956. <https://doi.org/10.1038/nature01145>

Organogénesis de *Argyranthemum frutescens* (L.) a partir de plantas cultivadas *in vitro* y *ex vitro* bajo diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento

Leticia Tombion^{1,2} *; María Andrea Coviella¹; Miguel Ángel Sangiacomo² y María Silvina Soto¹

¹ Instituto de Floricultura, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). N Repetto y De Los Reseros, Hurlingham (CP 1686), Bs. As., Argentina

² Universidad Nacional de Luján, Dpto. de Tecnología. Ruta 5 y Ruta 7 (CP 6700), Luján, Bs. As., Argentina.

*Autor por correspondencia: tombion.leticia@inta.gob.ar

Resumen

Argyranthemum frutescens (L.) Sch.Bip. (Asteraceae) es una especie ornamental de importancia comercial a nivel mundial. La micropropagación y la organogénesis han sido llevadas a cabo en muchas especies ornamentales de la familia Asteraceae. Estas técnicas de propagación *in vitro* ofrecen un alto potencial en las estrategias de mejoramiento genético de especies y variedades de alto valor comercial. Sin embargo, el resultado del cultivo de tejidos vegetales se encuentra influenciado por el ambiente físico, químico y gaseoso en el que se encuentren las plantas madre, y por las características del medio de cultivo a utilizar. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la micropropagación de *A. frutescens* mediante organogénesis directa e indirecta a partir de meristemas apicales de acuerdo con el ambiente en el que se encontraba la planta madre dadora de explantes y según diferentes dosis de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo base. Los explantes provenientes de plantas cultivadas *in vitro* presentan mayor capacidad de respuesta morfogénica que los provenientes de plantas cultivadas *ex vitro*, por lo que se resalta el cultivo de meristemas en el medio Murashige y Skoog (MS) + 0,5 mg l⁻¹ kinetina + 0,03 mg l⁻¹ ácido naftalenacético como la combinación de mayor respuesta a la regeneración de plantas mediante organogénesis directa y en MS + 0,5 mg l⁻¹ 6-bencilaminopurina + 0,03 mg l⁻¹ ácido indolbutírico para alcanzar la organogénesis indirecta.

Palabras claves: *Argyranthemum frutescens*, organogénesis, ambiente, cultivo de meristemas, regulador de crecimiento.

Abstract

Argyranthemum frutescens (L.) Sch.Bip. (Asteraceae) is an ornamental species of worldwide commercial importance. Micropropagation and organogenesis have been carried out on many ornamental species of the Asteraceae family. These propagation techniques offer a high potential in breeding strategies for species and varieties of high commercial value. However, the results of tissues culture are influenced by the physical, chemical, and gaseous environment in which the explant-giving plants are located, and by the medium culture characteristics. Therefore, the aim of this job was to study the micropropagation of *A. frutescens* by direct and indirect organogenesis from apical meristems according to the environment in which the mother plant was located and according to different doses of growth regulators in the base culture medium. Explants from *in vitro*-grown plants show greater morphogenic response capacity than those from *ex vitro*-grown plants, thus highlighting meristem culture in Murashige and Skoog (MS) medium + 0.5 mg l⁻¹ kinetin + 0, 03 mg l⁻¹ naphthaleneacetic acid as the combination with the highest response to plant regeneration by direct organogenesis and in MS + 0.5 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine + 0.03 mg l⁻¹ indolbutyric acid to achieve indirect organogenesis.

Key Words: *Argyranthemum frutescens*, organogenesis, environment, growth regulator, meristem culture.

Introducción

El género *Argyranthemum* Webb ex Schütz-Bip pertenece a la familia Asteraceae, tribu Anthemidae. Es originario de las Islas Canarias e incluye 25 especies con numerosas subespecies (Kjos et al., 2010). Su cultivo como planta ornamental se ha vuelto popular en los últimos años (Schroeter y Kleiber, 2012), ya que se utiliza a nivel mundial como planta en maceta, como cubierta vegetal o para decorar jardines debido a su follaje, al color de sus flores y a su largo período de floración (Hu et al., 2020). *Argyranthemum frutescens* es una especie ornamental de importancia comercial con amplios programas de reproducción y multiplicación. Su propagación es vegetativa, por lo que precisa ser sometida a procesos de limpieza de enfermedades sistémicas, tales como las virosis (Kjos et al., 2010).

Las técnicas de propagación *in vitro* como la organogénesis o la embriogénesis somática ofrecen un gran potencial en las estrategias de mejoramiento genético de especies y variedades de alto valor comercial. Estas metodologías pretenden alcanzar la obtención de plantas con características genéticas y morfológicas deseadas (Pérez et al., 2008; Bustamante et al., 2022) y permiten la obtención de un alto número de plantas en corto tiempo (Salazar et al., 2005). En particular, la micropropagación y la organogénesis han sido llevadas a cabo en muchas especies ornamentales de la familia Asteraceae (Salazar et al., 2005). La organogénesis representa una de las posibles vías morfogénicas que permite la diferenciación de plantas (Pérez et al., 2008). Cuando la formación de brotes ocurre a partir del explante utilizado, sin la intervención de la fase de callo, se habla de organogénesis directa, mientras que cuando se observa la formación de callos en el explante (desdiferenciación del tejido) y la posterior generación de brotes a partir de su diferenciación, se trata de organogénesis indirecta (George & Debergh, 2008). La primera es una herramienta eficiente para propagar genotipos élite (Hernández et al., 2013) que, además, posibilita la producción de plantas con cualidades fitosanitarias que aseguran la calidad comercial (Castañeda-Castro et al., 2009), mientras que la segunda puede utilizarse en el mejoramiento genético de plantas, ya que posibilita la obtención de variantes genéticas

con resistencia o tolerancia a las adversidades del medio. Un callo es una masa amorfa de células indiferenciadas que puede tener potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que posteriormente formarán plantas. Su característica general de crecimiento abarca una compleja relación entre el explante, la composición del medio y las condiciones experimentales durante el período de incubación (Lallana y Lallana, 2003).

A diferencia del medio exterior, el ambiente *in vitro* se caracteriza por tener alta humedad relativa, humedad constante, bajos niveles de densidad de flujo de fotones, fluctuación en la concentración de CO₂, alta concentración de azúcar y ausencia de microorganismos. Generalmente, estas circunstancias causan bajos niveles de transpiración, de absorción de agua y nutrientes, y de CO₂, pero un alto nivel de respiración en la oscuridad, lo que desencadena un crecimiento celular escaso (Barbón Rodríguez, 2003). Por ello, las características fisiológicas y morfológicas de las plantas *in vitro* están influenciadas por el ambiente físico, químico y gaseoso, el cual incidirá en la optimización de los procedimientos de micropropagación (Cañal et al., 2001). Además de ello, las características del medio de cultivo son determinantes para lograr un cultivo de tejidos exitoso. El agregado de reguladores de crecimiento al medio, tales como auxinas y citoquininas, posibilita el rápido desarrollo de las plantas *in vitro* (Aros et al., 2017), ya que interfieren en la diferenciación de tejidos, y en la inducción y formación de yemas y raíces (Duan et al., 2016).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la micropropagación de *A. frutescens* mediante organogénesis directa e indirecta a partir de meristemas apicales de acuerdo con el ambiente en el que se encontraba la planta madre dadora de explantes y según diferentes dosis de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo base, además de proporcionar un fundamento teórico para el cultivo de tejidos vegetales.

Materiales y métodos

Material vegetal

Esquejes de *A. frutescens* fueron colectados de plantas cultivadas en un invernáculo sin control de temperatura del Instituto de Floricultura del INTA, en Hurlingham (34°36'0" S; 58°37'60" O), Argentina, durante el otoño.

Artículos

Las temperaturas promedio registradas fueron de 20° C, bajo un fotoperíodo de 12 h. Por otro lado, se utilizaron plantas de *A. frutescens* de entre 8 y 13 cm de altura conservadas en condiciones *in vitro* en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) a 25°C de temperatura y bajo un fotoperíodo de 16 h.

Desinfección de los esquejes provenientes de plantas ex vitro

En primer lugar, los esquejes fueron llevados al laboratorio donde fueron cortados en fragmentos de 2 a 3 cm y lavados con agua. Posteriormente, las fracciones fueron sometidas a alcohol 70 % durante 10 s y transferidas a una solución 30 % (v/v) de hipoclorito de sodio por 10 min. Seguidamente, fueron desinfectadas con una solución de kasugamicina 0,27 % (v/v) durante 10 min y, finalmente, enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril bajo campana de flujo laminar.

Preparación de explantes

Los meristemas (0,5-0,8 mm) provenientes de las plantas cultivadas *in vitro* y de los esquejes desinfectados previamente fueron extraídos mediante bisturíes a partir de la ayuda de una lupa binocular (Nikon ® modelo SMZ-10, Tokio, Japón) en una cámara de flujo laminar. Se emplearon tubos de ensayo de 24 x 115 mm que fueron completados con 10 ml de medio de cultivo y se introdujo un meristema por cada tubo.

Tratamientos

Se utilizaron 8 tratamientos, los cuales fueron conformados según el ambiente en el cual se encontraba cultivada la planta madre (*in vitro* o *ex vitro*-en invernáculo-) en combinación con un medio de cultivo (compuesto por un medio base más un regulador de crecimiento) (Tabla 1). Cada medio fue ajustado a pH 5,6 y pasado en autoclave a 121 °C durante 17 min.

Tabla 1. Conformación de los diferentes tratamientos analizados

Tratamiento	Cultivo de la planta madre	Medio de cultivo
1	<i>In vitro</i>	MS (Murashige y Skoog, 1962)
2	<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ kinetina (KIN) + 0,03 mg l ⁻¹ ácido naftalenacético (ANA)
3	<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP) + 0,03 mg l ⁻¹ ácido indolbutírico (AIB)
4	<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA
5	<i>Ex vitro</i>	MS
6	<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA
7	<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB
8	<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA

Mantenimiento de explantes

Los tubos de ensayo que contenían los meristemas fueron llevados a una cámara de cultivo durante 60 días bajo un fotoperíodo de 16 h a una intensidad de 1000 lux y una temperatura constante de 25 °C para promover la diferenciación de tejidos.

Variables evaluadas

Sesenta días después de la extracción de los meristemas se registraron las siguientes variables:

- Organogénesis directa:
 - Regeneración de plantas (%): N° de explantes que lograron dar origen a una planta con más de una hoja verdadera, raíces y ausencia de callo/total de explantes;

- N° hojas/explante: cantidad de hojas obtenidas por cada explante (sin callo);
- Longitud radical: largo de la mayor raíz del explante (sin callo), medido en cm.
 - Organogénesis indirecta:
 - Formación de callo (%): N° de callos producidos/total de explantes;
 - Formación de brotes a partir de callo (%): N° de callos que lograron dar origen a brotes y raíces/total de explantes;
 - N° hojas: cantidad de hojas obtenidas a partir de callo
 - Longitud radical: largo de la mayor raíz originada a partir de callo, medido en cm.
 - Mortandad (%): cantidad de explantes muertos (de aspecto necrótico)/total de explantes.

Análisis estadístico

Se utilizaron 32 meristemas por cada tratamiento. Se realizó un diseño en bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial 4x2. Las variables N° de hojas y longitud radical fueron transformadas a raíz cuadrada por no cumplirse los supuestos de normalidad y, a su vez, en el caso de n° de hojas, por ser un valor entero. Se realizó un análisis de la varianza con un nivel de confianza del 95 %. Al observar diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba de diferencia de medias de Duncan ($p \leq 0,05$) mediante el software estadístico Infostat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

Resultados y discusión

Efecto del ambiente del material vegetal y de los medios de cultivo sobre la organogénesis directa

De acuerdo con el análisis estadístico, no hubo evidencia estadística de interacción en la regeneración de plantas. Esta variable estuvo influenciada por el ambiente del cual provenían los explantes, ya que aquellos que

procedían de plantas cultivadas *in vitro* lograron superar en un 8 % a los provenientes de plantas cultivadas en invernáculo (Tabla 2.a). Si en investigaciones futuras se tuviera como objetivo la regeneración de plantas, debería considerarse tomar el material meristemático de una fuente *in vitro*. Uribe et al. (2008) determinaron que las condiciones fisiológicas de la planta donante de explantes tiene una marcada influencia sobre la respuesta *in vitro*. Un entorno donde la temperatura es constante, la humedad elevada, la concentración de azúcares alta, la densidad del flujo de fotones baja y donde existe fluctuación de los niveles de CO₂, como lo es el cultivo *in vitro* (Barbón Rodríguez, 2003), posiblemente causó un balance de hormonas endógenas en las plantas dadoras de explantes que tuvo efectos benéficos para la regeneración de plantas, a diferencia de las plantas cultivadas *ex vitro*, cuya proporción de nutrimentos, de niveles hormonales y de aminoácidos libres varía de acuerdo con las distintas épocas del año (Jiménez-Martínez et al., 2013).

Tabla 2.a. Efecto del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes sobre la regeneración de plantas de *A. frutescens* mediante organogénesis directa a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Ambiente de la planta madre	Regeneración de plantas (%)
<i>In vitro</i>	14 a
<i>Ex vitro</i>	6 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Por otro lado, la composición de los medios también repercutió sobre la regeneración de plantas, ya que de acuerdo con los valores expresados en el Tabla 2.b, se puede notar que el medio MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA fue significativamente superior por lograr regenerar un 26 % de plantas (Figura 1 B, arriba), a diferencia del resto que no logró superar el 10 %. La kinetina es una citoquinina que posee un rol importante en varias fases del desarrollo de las plantas. Ello involucra la desinhibición y diferenciación de yemas, el

alargamiento celular y el flujo de asimilados y nutrientes (Lagoutte et al., 2009). Por tanto, si se considerara a la regeneración de plantas como un objetivo de importancia en próximas investigaciones, la combinación MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA debería ser tenida en cuenta. Similares resultados fueron encontrados por Zhang et al. (2015), quienes vieron que la presencia de una citoquinina combinada con ANA es indispensable para la regeneración y el desarrollo de los explantes.

Tabla 2.b. Efecto de los medios de cultivo sobre la regeneración de plantas de *A. frutescens* mediante organogénesis directa a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Medio de cultivo	Regeneración de plantas (%)
MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a
MS	5 a
MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	10 a
MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	26 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Artículos

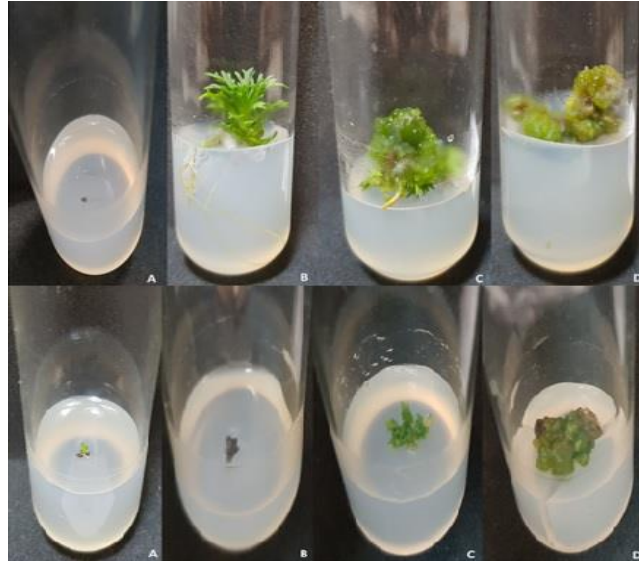


Figura 1. Diferencias de comportamiento de los explantes de *A. frutescens* en los medios MS (A), MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA (B), MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB (C) y MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA (D). Arriba: explantes provenientes de plantas cultivadas *in vitro*. Abajo: explantes provenientes de plantas cultivadas *ex vitro*

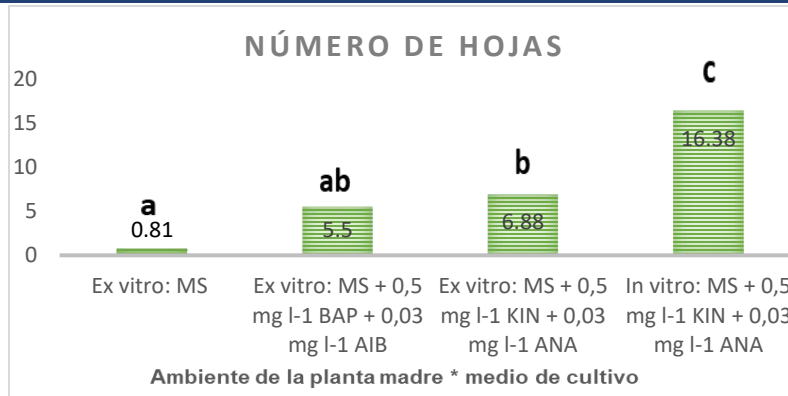
Con respecto a las variables morfométricas, según los resultados observados en el Tabla 3, se produjo una interacción significativa entre los medios de cultivo y el ambiente del cual provenían los explantes para el número de hojas y la longitud radical de las plantas regeneradas vía organogénesis directa. Los explantes del tratamiento *ex vitro*:MS y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB lograron la menor cantidad de hojas, mientras que los tratamientos que contenían kinetina (*ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA) fueron estadísticamente superiores (Figura 2). Por su parte, la longitud radical de

estas plantas fue menor en los tratamientos *ex vitro*:MS, *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA, y significativamente superior en *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA (Figura 3). La kinetina es una citoquinina que estimula la generación de brotes axilares, así como también puede inducir la iniciación y la elongación de las raíces (Alcántara Cortéz et al., 2019), lo cual explicaría estos valores. Resultados similares obtuvieron Leiva Mora & Aleaga (2023), quienes mediante el agregado de KIN al medio de cultivo incrementaron el número de brotes de plantas de papa.

Tabla 3. Efecto de la interacción entre del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y el medio de cultivo para número de hojas y longitud radical de plantas de *A. frutescens* obtenidas mediante las dos vías de organogénesis

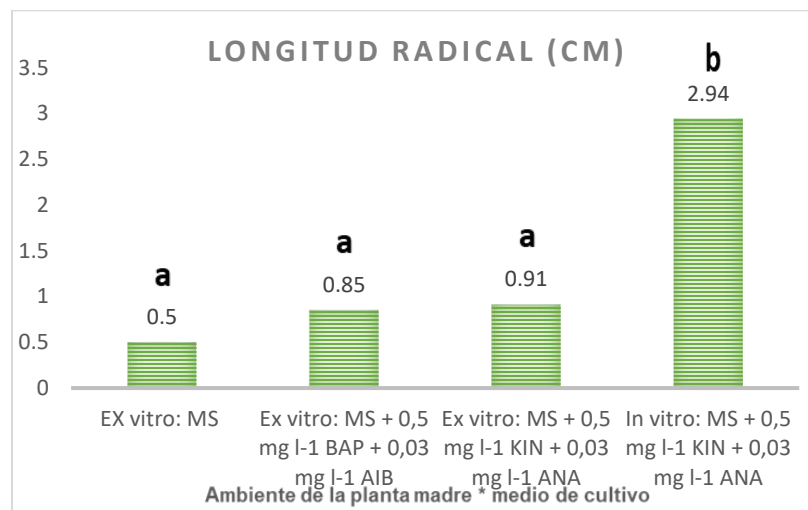
Interacción	Tipo de organogénesis	Nº hojas	Longitud radical
Ambiente de la planta madre x medio de cultivo	Directa	6,40*	5,21*
	Indirecta	5,33*	4,86*

*valor significativo nivel del 5% ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 2. Número de hojas de las plantas regeneradas mediante organogénesis directa según el ambiente de la planta madre y el medio de cultivo



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 3. Longitud radical de las plantas regeneradas mediante organogénesis directa según el ambiente de la planta madre y el medio de cultivo

Efecto del ambiente del material vegetal y de los medios de cultivo sobre la organogénesis indirecta

A partir de los resultados observados en el Tabla 4, se puede decir que existió interacción

significativa entre los medios de cultivo y el ambiente en el que se encontraban las plantas madre dadoras de explantes para la formación de callo y la formación de brotes a partir de callo.

Tabla 4. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y los medios de cultivo para la formación de brotes a partir de callo y la formación de *A. frutescens*

Interacción	Formación de brotes a partir de callo	Formación de callo
Ambiente de la planta madre x medio de cultivo	4,26 *	3,82 *

*valor significativo nivel del 5% ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

De acuerdo con la Tabla 5, la formación de brotes a partir de callo no ocurrió en los meristemas cultivados en los tratamientos ex

vitro:MS, in vitro:MS, ex vitro:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA, in vitro:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA y ex vitro:MS + 0,5 mg

Artículos

l-1 BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA. Los tratamientos *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA produjeron brotes, pero no fueron estadísticamente superiores al medio *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB, que alcanzó la mayor producción de brotes a partir de callo (41 %).

Por otro lado, *in vitro*:MS y *ex vitro*:MS no formaron callo. El tratamiento *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA fue significativamente similar, pero también fue semejante estadísticamente *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA. Los tratamientos *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB consiguieron generar callo en un 30 y un 59 %, respectivamente. Por su parte, los tratamientos *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA alcanzaron los mayores valores de producción de callo (Tabla 5). En el cultivo de tejidos vegetales, las auxinas y las citoquininas, especialmente, interactúan en varios procesos del desarrollo de las plantas y juntas pueden alterar la morfogénesis del vegetal (Nordström et al., 2004). Si se

considerara a la formación de callo como un objetivo de futuras investigaciones, las combinaciones de MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB y de MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA brindan adecuados resultados con el material proveniente de *in vitro*, al igual que la combinación MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA *ex vitro*. Las auxinas como el ANA y el AIB tienen un rol importante en la formación de estos tejidos no organizados, de los cuales también es posible inducir la formación de hojas, además de participar activamente en la formación de raíces (Jordán y Casaretto, 2006). Similares respuestas se encontraron en otros estudios, donde vieron que ANA y BAP en el medio de cultivo también inducían la formación de callo y la producción de brotes a partir de callo (Duan et al., 2016). Por su parte, Fajinmi et al. (2014) encontraron la mayor producción de callo en los medios de cultivos conformados por auxinas, principalmente en los que contenían ANA, mientras que Córdova et al. (2014) encontraron que la combinación de una auxina fuerte (2,4-D) con BAP es suficiente para inducir la formación de callo *in vitro*.

Tabla 5. Efecto del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y del medio de cultivo sobre la formación de brotes a partir de callo y la formación de callo a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Ambiente de la planta madre	Medio de cultivo	Formación de brotes a partir de callo (%)	Formación de callo (%)
<i>In vitro</i>	MS	0 a	0 a
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a	6 ab
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	41 c	59 d
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	25 b	72 d
<i>Ex vitro</i>	MS	0 a	0 a
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a	21 bc
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	17 b	30 c
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	0 a	78 d

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0,05) de acuerdo con la prueba de Duncan

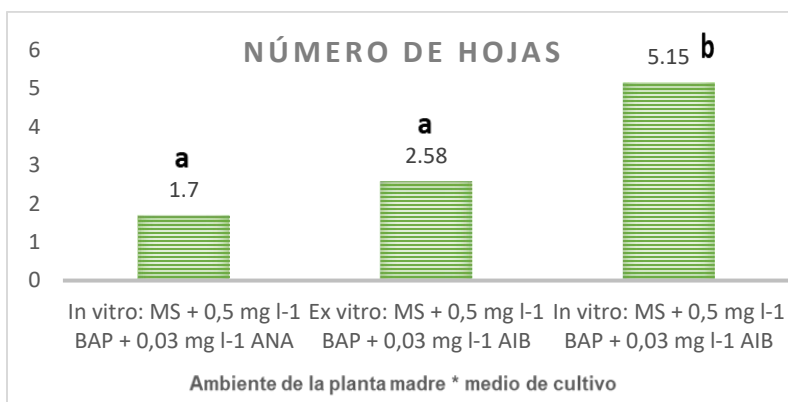
En cuanto a las variables morfométricas, según los resultados observados en el Tabla 3, se produjo una interacción significativa entre los medios de cultivo y el ambiente del cual provenían los explantes para el número de hojas y la longitud radical de las plantas regeneradas vía organogénesis indirecta. Los

explantes del tratamiento *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB lograron obtener el mayor número de hojas a partir de callo (5) en comparación con los tratamientos restantes (*in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA y *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB), los cuales no lograron superar las 2

Artículos

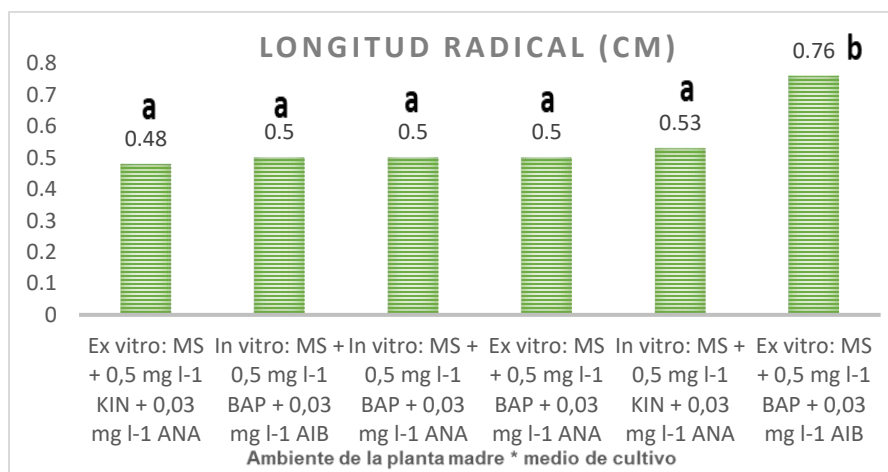
hojas (Figura 4). Con respecto a la longitud radical, el tratamiento *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB fue estadísticamente superior al resto, por haber producido una longitud media de 0,76 cm (Figura 5). Tanto BAP como AIB pudieron haber sido los responsables de la obtención de los mayores valores logrados para número de hojas y longitud radical, ya que ambas se encontraban presentes en los tratamientos superiores. Las citoquininas juegan un rol importante en diferentes fases del desarrollo de las plantas,

como la desinhibición y diferenciación de yemas, el alargamiento celular y el flujo de asimilados y nutrientes, por lo que producen mayor cantidad de ramificaciones y mayor producción aérea de las plantas (Lagoutte et al., 2009), mientras que las auxinas son promotoras de la división y la elongación celular, y de la formación de raíces si se emplea en bajas concentraciones según el requerimiento del material vegetal (Jordán y Casaretto, 2006).



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 4. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y el medio de cultivo sobre el número de hojas de plantas de *A. frutescens* obtenidas mediante organogénesis indirecta a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas



Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Figura 5. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y el medio de cultivo sobre la longitud radical de las plantas de *A. frutescens* obtenidas mediante organogénesis indirecta a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Artículos

Efecto del ambiente del material vegetal y de los medios de cultivo sobre la mortandad

Según la Tabla 6, existió interacción significativa entre los medios de cultivo y el ambiente en el que se encontraban las plantas madre dadoras de explantes para la variable mortandad. Los tratamientos *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB, *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB, *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ ANA obtuvieron los menores valores. Por su parte, los tratamientos *ex vitro*:MS e *in vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA fueron estadísticamente similares entre sí y semejantes, también, al tratamiento *ex vitro*:MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA (Tabla 7). Nas y Read (2004) indicaron que la composición del medio de cultivo puede causar desórdenes fisiológicos o la muerte de los tejidos debido a que la interacción entre los reguladores de crecimiento y las sales minerales utilizadas tiene un papel clave en el éxito de la micropropagación. El tratamiento que logró la mayor mortandad (63 %) fue *in vitro*:MS (Figura 1 A, arriba), lo cual pudo deberse a la composición del medio. Al no contar con reguladores de crecimiento, los explantes no lograron adquirir los nutrientes requeridos para alcanzar su desarrollo y, en consecuencia, se necrosaron (Surakshita et al., 2019). Por tanto, el agregado de reguladores de crecimiento al medio, como BAP combinado con ANA o AIB, podría aumentar la supervivencia de los explantes en experimentos futuros.

Tabla 6. Efecto de la interacción entre el ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y los medios de cultivo para la mortandad de *A. frutescens*

Interacción	Mortandad
Ambiente de la planta madre x medio de cultivo	6,24*

*valor significativo nivel del 5% ($p \leq 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Tabla 7. Efecto del ambiente en el que fue cultivada la planta madre dadora de explantes y del medio de cultivo sobre la mortandad a los 60 días de la introducción *in vitro* de los meristemas

Ambiente de la planta madre	Medio de cultivo	Mortandad (%)
<i>In vitro</i>	MS	63 c
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	25 ab
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	6 a
<i>In vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	16 a
<i>Ex vitro</i>	MS	22 ab
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ KIN + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	41 b
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ AIB	10 a
<i>Ex vitro</i>	MS + 0,5 mg l ⁻¹ BAP + 0,03 mg l ⁻¹ ANA	6 a

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) de acuerdo con la prueba de Duncan

Conclusión

Los explantes de *A. frutescens* provenientes de plantas cultivadas *in vitro* presentan mayor respuesta morfogénica que los provenientes de plantas cultivadas *ex vitro*. El cultivo de meristemas en el medio MS + 0,5 mg l⁻¹ KIN + 0,03 mg l⁻¹ ANA es una combinación adecuada para la regeneración de plantas mediante organogénesis directa, mientras que

el medio MS + 0,5 mg l⁻¹ BAP + 0,03 mg l⁻¹ AIB es apropiado para alcanzar la organogénesis indirecta. Estos avances quedan disponibles para futuras investigaciones en las que se desee implementar el cultivo de tejidos como técnica de saneamiento, de micropropagación o para el mejoramiento vegetal de *A. frutescens*.

Referencias

- Alcantara Cortes JS, Acero Godoy J, Alcántara Cortés JD, Sánchez Mora RM (2019) Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova* 17 (32):109-129.
- Aros D, Vasquez M, Rivas C & Prat ML (2017) An efficient method for *in vitro* propagation of *Astroemeria pallida* Graham rhizomes. *Chilean Journal Agricultural & Animal Sciences* 77(1):95-99. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392017000100012>.
- Barbón Rodríguez, R (2003) Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Biología Vegetal* 3(4):211-221.
- Bustamante K, Rocha SP, Sharry SE, Guerra MP & Niella FO (2022) Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista De La Facultad De Agronomía* 121 (Especial 2): 102. <https://doi.org/10.24215/16699513e102>
- Cañal MJ, Rodríguez R, Fernández B, Sánchez R & Majada JP (2001) Fisiología del cultivo *in vitro*. *Biología vegetal* 1:3-9.
- Castañeda-Castro O, Gómez FC, Trejo-Téllez L, Pastelín-Solano MC, Martínez Y, González MT & Guevara-Valencia M (2009) Estado nutricional y crecimiento de vitroplantas de caña de azúcar en respuesta a reguladores de crecimiento. *Terra Latinoamericana* 27 (3):177-185.
- Córdova AM, Cobos M, Imán SA & Castro JC (2014) Un método eficiente para la inducción de callos *in vitro* en *Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh "Camu Camu". *Scientia Agropecuaria* 5: 25-34. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2014.01.03>.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L & Tablada M (2020) Grupo Infostat. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duan H, Ding W, Song J, Xu J, Wang H, Zhu Y, Liu W & Zhou Y (2016) Roles of plant growth substance in callus induction of *Achyranthes bidentate*. *Research in Plant Biology* 6:6-13. <https://doi.org/10.19071/ripb.2016.v6.3079>
- Fajinmi SO, Amoo S & Van Staden F (2014) Optimization of *in vitro* propagation of *Coleonema album*, a highly utilized medicinal and ornamental plant. *South African Journal of Botany* 94:9-13. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.05.006>
- George EF & Debergh PC (2008) Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J D. (eds). *Plant propagation by tissue culture*. pp. 29-64.
- Hernández E, López MCG & Estrada-Luna AA (2013) Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(8):1175-1186.
- Hu J, Jin Q & Ma Y (2020) *AfLFY*, a *LEAFY* homolog in *Argyranthemum frutescens*, controls flowering time and leaf development. *Science Report* 10:1616. doi: 10.1038/s41598-020-58570-x.
- Jiménez-Martínez JH, Gutiérrez MG, Franco O, González-Huerta A & Gutiérrez-Ibáñez AT (2013) Micropropagación de vides silvestres (*Vitis* spp.) del centro de México. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 82:107-112.
- Jordán M & Casaretto, J (2006) Fisiología vegetal. Capítulo XV. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kjos M, Fjellheim S, Rognli O & Hvoslef-Eide AK (2010). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for fingerprinting of *Argyranthemum frutescens* cultivars. *Scientia Horticulturae* 124 (4): 506-510. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.02>
- Lagoutte SM, Divo M & Vilella F (2009) Efecto del tamaño de celdas y citoquininas en el crecimiento de plantas de petunia. *Revista Internacional de Botánica Experimental* 78: 31-36.

Artículos

Lallana VH & Lallana MC (2003) Inducción de callos utilizando la técnica de cultivo *in vitro*. Manual de prácticas de fisiología vegetal. Ed. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Entre Ríos. Argentina. Pp. 81-82.

Leiva Mora M & Aleaga PI (2023) Influencia de fitohormonas en la regeneración *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. vía organogénesis directa. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/37455>, fecha de último acceso: 19/09/23.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Nas MN & Read PE (2004) A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Horticulturae* 101: 189-200.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.10.004>

Nordström A, Tarkowski P, Tarkowska D, Norbaek R, Astot C, Dolezal K & Sandberg G (2004) Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:8039-8044. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402504101>

Pérez M, Armas R, Delgado, M & Hernández

CA (2008) Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales caulinares de la variedad cubana de arroz Reforma. *Cultivos Tropicales*, 29 (1): 23-28.

Salazar R, Vargas, TE, De García, E & Oropeza, M (2005) Micropropagación y organogénesis de *Aster ericoides* cultivar "Monte Cassino". *Interciencia* 30 (5): 295-299.

Schroeter A & Kleiber T (2012) Application of Slow-Release Fertilizers in Growing Marguerite Daisy (*Argyranthemum frutescens*) Molimba® Group. *Ecological Chemistry and Engineering* 19(12):1471-1484.
[https://10.2428/ecea.2012.19\(12\)140](https://10.2428/ecea.2012.19(12)140)

Surakshita NC, Soorianathasundarama K, Ganga M & Ravendran M (2019) Alleviating shoot tip necrosis during *in vitro* propagation of grape cv. Red Globe. *Scientia Horticulturae* 248:118-125.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.013>

Uribe ME, Delaveau C, Garcés M & Escobar R (2008) Effect of asepsis and phytohormones on the *in vitro* establishment of *Berberidopsis corallina* from nodal segments. *Bosque* 29:58-64.

Zhang A, Wang H, Shao Q, Wangshu M & Li M (2015) Large scale *in vitro* propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: Pharmaceutically important and ornamental plant. *Industrial Crops and Products* 70:158-162.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.032>

Análisis cinético de biosensores acuáticos para un monitoreo ecotoxicológico temprano

¹Pamela Olivares-Ferretti, ¹Viviana Chávez, ²Matías Peredo-Parada, ^{1,3*}Jorge Parodi

¹Laboratorio de Investigación y Educación Biosocial Tonalli Ltda., Temuco, Chile.

²Plataforma de Investigación en Ecohidrología y Ecohidráulica, Ecohyd Ltda., Ñuñoa, Chile.

³Universidad Autónoma de Chile, Temuco, Chile.

*Jorge Parodi

Universidad Autónoma de Chile, Departamento de análisis de Datos, Temuco, Chile

jorge.parodi@uautonoma.cl

Jorge Parodi ORCID: 0000-0002-9117-5433

Pamela Olivares-Ferretti ORCID: 0000-0001-5759-3271

Título corto: Cinética de biosensores y ecotoxicología

Resumen

El uso de biosensores, como *Daphnia magna*, es clave para evaluar efectos tóxicos en cuerpos de agua superficiales continentales. Sin embargo, adolece de una metodología que no se ha revisado en décadas, lo que requiere tiempo y recursos, reduciendo así su efectividad. Nos propusimos evaluar el uso de parámetros cinéticos, como un indicador temprano y remoto en estudios ecotoxicológicos. Nuestros resultados indican que valores como la VCL, VSL y VAP se redujeron en más de un 50% al usar un compuesto tóxico disuelto en agua, como lo es el peróxido de hidrógeno; la motilidad total también disminuyó en un 50% al emplear este compuesto, pudiendo determinar una DL50 de 0,5 mM para dicho compuesto, relacionada con la CI50 de 0,7 mM para la motilidad. Al utilizar diversos compuesto, como nanomateriales, peróxido de hidrógeno, formalina y extracto de *Didymosphenia geminata*, pudimos determinar CI50 en los parámetros cinéticos, los cuales tuvieron un coeficiente de Pearson de 0,7 con las DL50 determinadas para las diferentes condiciones. Estos resultados sugieren que el estudio cinético tiene una relación directa con la mortalidad a las 24 horas y puede ser utilizado para estudios más rápidos de ecotoxicología y de forma remota en el futuro.

Palabras claves: Biosensores; *Daphnia magna*; Ecotoxicidad; Prevención; Viabilidad

Kinetic analysis of aquatic biosensors for early ecotoxicology monitoring

Abstract

The use of biosensors, such as *D. magna*, is key to assess toxic effects in inland surface water bodies. However, it suffers from a methodology that has not been reviewed for decades, which takes time and resources, reducing its timeliness. We set out to evaluate the use of kinetic studies as an early and remote indicator for the study of ecotoxicology tests. Our results indicate that parameters such as VCL, VSL and VAP were reduced by more than 50% when using a toxic compound dissolved in water, such as hydrogen peroxide, total motility was reduced by 50% also when using this compound and an LD50 of 0.5 mM for this compound could be determined, which was related to the CI50 of 0.7 mM for motility with this compound. When using different compounds, such as nanomaterial, hydrogen peroxide, formalin, and glucose, it was possible to determine CI50 in the kinetic parameters, which had a Pearson's coefficient of 0.7 with the LD50 determined for the different conditions. These results suggest that the kinetic study has a direct relationship with the mortality at 24 hrs and can be used for more rapid ecotoxicology and remote studies in the future.

Key Words: Biosensors; *Daphnia magna*; Ecotoxicity; Prevention; Viability

Introducción

La norma que regula las descargas de residuos líquidos, exige la ejecución de estudios de ecotoxicología para evaluar si los compuestos derramados o liberados al ambiente puedan tener efectos sobre los cuerpos de aguas. Para esto, se utilizan sistemas de biosensores, que corresponden a modelos biológicos sensibles a la contaminación ambiental. En el caso de sistemas de agua dulce, se emplea *Daphnia magna* y para sistemas de agua salada se usa *Artemia salina*.

Los bioensayos o pruebas de ecotoxicidad son herramientas útiles para determinar las concentraciones a las que algún elemento o compuesto genera respuestas negativas en organismos, lo que potencialmente puede representar problemas ambientales (Silva et al. 2003). Dado que la respuesta biológica es compleja y constituye la integración de distintos factores que pueden ser antagónicos y/o sinérgicos, el uso de bioensayos ha sido fuertemente recomendado para obtener una estimación más directa e integrada de la toxicidad ambiental (Ferrari et al., 1999).

Diversos estudios con bioensayos se han sido utilizados para evaluar la toxicidad ambiental de diferentes contaminantes, como: metales pesados (Oliver et al., 2003; Madoni & Romeo, 2006), petróleo crudo (Alayo & Iannacone, 2002) y pesticidas (Gustavson et al., 2000), determinados tanto en ambientes terrestres (Bierkens et al., 1998), marinos (Silva et al., 2003; Bellas et al., 2008), de agua dulce (Mkandawire, 2014) y sedimentarios (Ahlf et al., 2002).

A nivel internacional, se han estandarizado distintos protocolos de bioensayos para realizar evaluaciones toxicológicas (EPA, 1988; EPA, 1994; OCDE, 2003). En Chile, el Instituto Nacional de Normalización (INN) estableció el protocolo de bioensayo con las especies de *Daphnia* sp. y *Artemia* sp. (NCh 2083 of. 1999; protocolos de bioensayos de US EPA 2002).

Nuestros trabajos previos nos han permitido realizar análisis cinéticos a muy bajo costo, utilizando imágenes de video (Parodi et al 2021; Parodi 2017). Recientemente, mediante esta tecnología, pudimos evaluar el efecto de aguas con presencia de *Didymosphenia geminata* con estos parámetros, como reporteros de viabilidad (Olivares et al 2015).

Proponemos el uso de estudios cinéticos

tempranos y agudos como una forma de estimar los efectos en la viabilidad de los biosensores y permitir, de forma temprana, sugerir alteraciones en las fuentes de agua o realizar un monitoreo que posibilite una intervención temprana. Hemos validado nuestros protocolos para poder proporcionar una evaluación rápida de la toxicidad de diversos cuerpos de aguas. Esto nos permite considerar la transferencia de estas metodologías a empresas, con sistemas de monitoreo remoto que les permita tomar decisiones en tiempos más breves sobre las acciones que puedan afectar sus procesos productivos en las masas de agua que utilizan. La información presentada resume estas evaluaciones y nos permite proponer un sistema innovador, en el cual las alteraciones tempranas en la cinética se relacionan con la viabilidad de los biosensores de manera tardía.

Metodología

Mantenimiento de *Daphnia magna*

Los especímenes *D. magna* se manipularon de acuerdo con la norma NCh 2083:1999, manteniendo una temperatura constante de 16° C y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas/12 horas. El agua de cultivo para *D. magna* se preparó con 25 ml de solución salina (cloruro de calcio: 11,76 gr/L; sulfato de magnesio: 4,93 gr/L; bicarbonato sódico: 2,59 gr/L; cloruro de potasio: 0,23 gr/L), y se completó hasta 1.000 mL con agua filtrada destilada. Finalmente, el agua se aireó durante 24 horas antes de su uso. La densidad de cultivo aumentó de 10 a 15 organismos de *D. magna* por 200 mL de agua. Se colectaron neonatos y se sembraron 10 individuos por envase en 3 réplicas. Se mantuvieron las condiciones a 15 °C durante el experimento y se evaluaron las formas inmóviles como vivas después de 24 horas.

Ensayos cinéticos

Las formas de copepoditos se colectaron después de la eclosión y se observó su cinética durante un periodo de 5 días, en ausencia y presencia del compuesto. De 3 a 5 individuos fueron colocados en placas de plástico con agua aireada, en un volumen de 10 mL de agua de cultivo. Posteriormente, se transfirieron a un sistema de captura video y se registraron sus movimientos durante 2 minutos en la ausencia o presencia del compuesto, utilizando un estereomicroscopio

digital Crenova con un aumento de 10x. Los videos se digitalizaron con el programa Microcapture Pro. El análisis de los videos se realizó con el programa ImageJ, usando el complemento de CASA modificado. Se realizó un registro de la movilidad de la biomasa con los parámetros cinéticos, para posteriormente compáralos con el control.

Compuestos

Las *D. magna* se enfrentaron a cuatro compuestos: de peróxido de hidrogeno a 0,1 mM, de formalina a 100 ppm obtenida desde una solución al 37% usada para el control de hongos en peces de pisciculturas de agua dulce, de un extracto de *D. geminata* a una concentración de 50 ppm y de ácido gálico a una concentración de 10 ppm.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el programa GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.). Los datos fueron ordenados y

tratados con pruebas estadísticas de normalidad, con una prueba de ANOVA de dos vías y un post test de Bonferroni. En los gráficos se presentó el promedio \pm SEM, considerando un $P < 0,5$ como significativo. La correlación de los datos se estimó por regresión simple utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados

Viabilidad

Las formas neonatas de *D. magna* fueron expuestas durante 24 horas a los diferentes compuestos, en concentraciones previamente descritas como DL50. Esto permitió observar las formas móviles como indicadores de viabilidad. Después de 24 horas, el 50% de las formas permanecieron móviles, lo que indica una reducción del 50% en la viabilidad en todas las condiciones, como se muestra en la Figura 1.

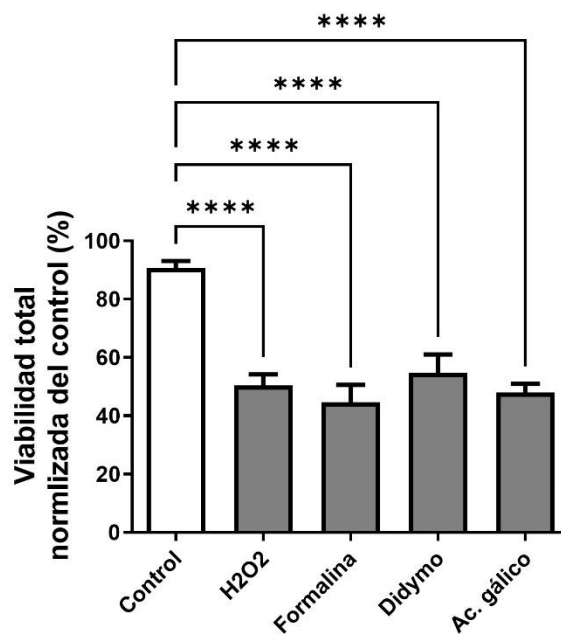


Figura 1. Gráfico de viabilidad de las formas neonatas de *D. magna*, expuestas 24 horas en agua de cultivo aireada, en las distintas condiciones. Las barras son representación de promedio \pm SEM.

Cinética

En las mismas condiciones mencionadas anteriormente, las formas adultas de *D. magna* fueron expuestas durante 5 minutos a los compuestos. Luego, se registró un video de sus movimientos y se analizaron los principales parámetros cinéticos. El

porcentaje de movilidad, se redujo en un 40% en todas las condiciones, mientras que la velocidad curvilínea (VCL) disminuyó en más del 50%. También se observaron alteraciones en la velocidad en línea recta (VSL) y la trayectoria promedio de velocidad (VAP), como se ilustra en la Figura 2.

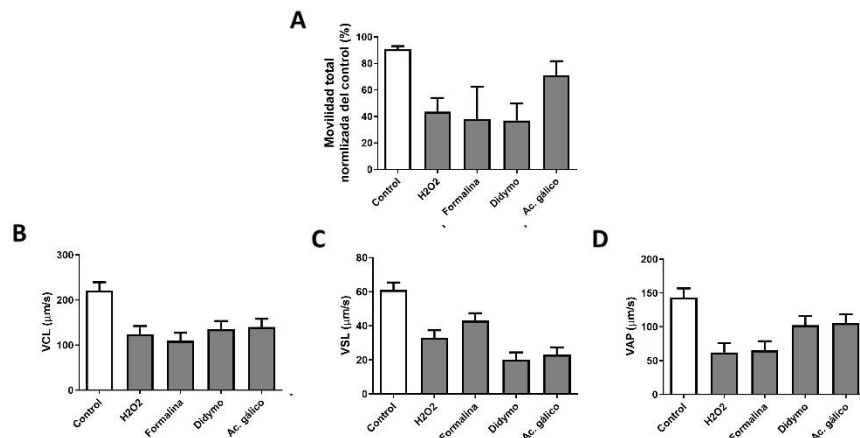


Figura 2. Gráfico de los cambios cinéticos de las formas neonatas de *D. magna*, expuestas 24 horas en agua de cultivo aireada, en las distintas condiciones. En A el valor del estudio de porcentaje de motilidad. Además de los valores cinéticos VCL (B), VSL (C) y VAP (D). Las barras son representación de promedio \pm SEM.

Correlación

Los datos de cinética y viabilidad se representaron en un gráfico de correlación. Se evaluó si los cambios cinéticos tenían una relación directamente proporcional con la viabilidad. En la Figura 3, se observa la relación entre la cinética y la viabilidad con los

diferentes compuestos. Se evidencia que a medida que la reducción en la cinética es mayor, la viabilidad disminuye. La Tabla 1 resume los valores de coeficiente de Pearson para las condiciones, mostrando una relación positiva entre los dos parámetros

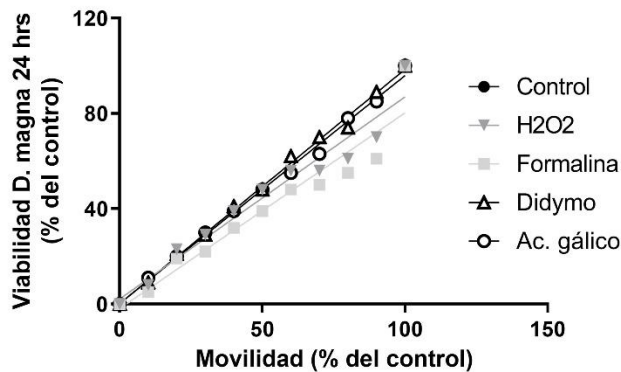


Figura 3. Correlación entre las mediciones movilidad total de las formas neonatas de *D. magna*, expuestas 24 horas en agua de cultivo aireada, en las distintas condiciones y la viabilidad. Los puntos son representación de promedio \pm SEM.

Tabla 1. Resumen del valor del Coeficiente de Pearson para las distintas condiciones en la relación movilidad y viabilidad.

Condición	Coficiente Pearson
H2O2	0.9
Formalina	0.86
Didymo	0.78
Ac. gálico	0.87

Discusion

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que el análisis cinético de modelos de biosensores está directamente relacionados con la viabilidad de estos, ofreciendo una observación más eficiente en términos de costos y tiempo. Trabajos previos usando técnicas similares permitieron evaluar el impacto de componentes acuáticos, sobre células espermáticas, estableciendo una correlación entre su viabilidad y cambios en su cinética (Olivares et al 2015; Parodi et al 2021). Este enfoque también se aplicó para analizar los efectos de compuestos en el agua con la presencia de *D. geminata*, evidenciando cambios en la cinética y la viabilidad de estos bioreporteros. Asimismo, el modelo se empleó en la búsqueda de compuestos farmacológicos para el control de ectoparásitos, centrándose en cambios cinéticos agudos observables con esta técnica (Parodi et al 2021).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el análisis cinético guarda relación con la viabilidad. La exposición a concentraciones de DL50 resultó en una disminución tanto en la viabilidad (Figura 1) y como en la cinética (Figura 2). La correlación entre ambos aspectos, al ser evaluada, mostró una proporción directa con un coeficiente de Pearson superior a 0,5, según se presenta en la Figura 3 y la Tabla 1. Estos hallazgos indican que la observación rápida de la cinética de los biosensores puede indicar viabilidad, sugiriendo que a menor cinética, menor viabilidad.

No obstante, es importante señalar que las observaciones realizadas, tanto por nosotros y como por otros investigadores, señalan que elevados parámetros cinéticos también pueden conducir a la muerte de los biosensores, posiblemente asociados a cambios en la energía. Por lo tanto, realizar correlaciones con moléculas estimuladoras también deben ser consideradas para establecer una relación más robusta entre los valores de cinética y viabilidad.

Consideramos que las aplicaciones de este modelo son amplias en la industria. Especialmente en aquellas donde las descargas de compuestos son un problema logístico. La toma de muestras y el envío de las mismas para pruebas de viabilidad en una masa de formas neonatas, puede aumentar significativamente el tiempo de los ensayos.

Nuestro modelo basado en el análisis de videos y su cuantificación cinética, ofrece una oportunidad para las empresas que pueden enviar imágenes del movimiento para su análisis y recibir comentarios en horas para evaluar los efectos de sus descargas y determinar los pasos a seguir. Esperamos destacar este desarrollo a la industria y promover su aplicación incluso en ausencia de una normativa ambiental específica al respecto.

Conclusiones

Este estudio revela una correlación directa entre el análisis cinético de biosensores, utilizando *D. magna*, y su viabilidad, observando una disminución significativa en ambas características tras la exposición a concentraciones DL50 de los compuestos. La relación positiva respaldada por el coeficiente de Pearson sugiere que la cinética puede ofrecer una evaluación rápida de la salud de los biosensores. Aunque se requieren más investigaciones, este enfoque muestra prometedoras aplicaciones en la industria para el monitoreo ambiental de descargas de compuestos, facilitando análisis remotos para decisiones más ágiles en los procesos productivos. Este estudio sienta las bases para la potencial implementación de este enfoque, resaltando su utilidad en la gestión ambiental, incluso en ausencia de normativas específicas.

Agradecimientos

Agradecemos a Ecohyd por el acceso a muestra de agua, Tonalli Ltda, por el acceso a equipos y material biológico

Referencias

Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., & Ricking, M. (2002). A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality a German Approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *Journal of Soils and Sediments*, 2(1), 37-42.

Alayo, M., & Iannacone, J. (2002). Ensayos ecotoxicológicos con petróleo crudo, Diesel 2 y Diesel 6 con dos subespecies de *Brachionus plicatilis* Müller 1786 (Rotifera: Monogononta). *Gayana (Concepción)*, 66(1), 45-58.

- Bellas, J., Saco-Álvarez, L., Nieto, Ó., & Beiras, R. (2008). Ecotoxicological evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons using marine invertebrate embryo-larval bioassays. *Marine pollution bulletin*, 57(6), 493-502.
- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van Den Heuvel, R., Verschaeve, L., Weltens, R., & Schoeters, G. (1998). Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37(14), 2935-2947.
- Ferrari, B., Radetski, C. M., Veber, A. M., & Ferard, J. F. (1999). Ecotoxicological assessment of solid wastes: A combined liquid-and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6), 1195-1202.
- Fuentes ME, Quiñones RA, Gutiérrez MH, Pantoja S. (2015) Growth and respiration of fungal species isolated from the coastal zone off Central-southern Chile. *Fungal Ecology* 13, 135-149
- Gustavson, K. E., Sonsthagen, S. A., Crunkilton, R. A., & Harkin, J. M. (2000). Groundwater toxicity assessment using bioassay, chemical, and toxicity identification evaluation analyses. *Environmental Toxicology*, 15(5), 421-430.
- Holt, E.A. and Miller, S.W., 2011. Bioindicators: Using organisms to measure environmental impacts. *Nature Education Knowledge*. 3: 8-13.
- Johnson TW, Sparrow FK (1961) Fungi in Oceans and Estuaries. J. Cramer, Weinheim
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E (1979) *Marine Mycology: The Higher Fungi*. Academic Press, New York
- Madoni, P., & Romeo, M. G. (2006). Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environmental Pollution*, 141(1), 1-7.
- Mkandawire, M., Teixeira da Silva, J. A., & Dudel, E. G. (2014). The Lemna bioassay: contemporary issues as the most standardized plant bioassay for aquatic ecotoxicology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 4(2), 154-197.
- NCh 2083. Of. 1999. Aguas – Bioensayo de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustacea, Cladocera). Instituto Nacional de Normalización, INN – Chile.
- OECD. 1993. *Daphnia* sp. acute immobilization test and reproduction test, Method 202, OECD Guidelines for Testing chemicals.
- Oliver, I., Alberto, J., & Alvaríño Flores, L. (2003). Efecto Ecotoxicológico agudo del Mercurio sobre Larvas del "Muy Muy" *Emerita analoga* (Stimpson)(Decapoda: Hippidae) procedentes de cuatro localidades de Lima. *Ecología Aplicada*, 2(1), 111-115.
- Pamela Olivares, Paola Orellana, Guillermo Guerra, Matías Peredo-Parada, Viviana Chavez, Alfredo Ramirez, Jorge Parodi: Water contaminated with *Didymosphenia geminata* generates changes in *Salmo salar* spermatozoa activation times. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 04/2015; DOI:10.1016/j.aquatox.2015.03.022
- Parodi, Jorge, Hernandez, Klaudia, Pizarro, María Olivares-Ferreti, Pamela & Sanchez, Rodrigo A low-cost screening system for kinetic analysis of *caligus rogercresseyi*; new focus on pharmacological study of caligidosis disease 2021, *Aquaculture Research*, 52 (11) <https://doi.org/10.1111/are.15447>
- Parodi, J., Guerra, G., Cuevas, M., Ramirez-Reveco, A., Romero, F., 2017. Effects of storage time on the motility, mortality and calcium levels of Atlantic salmon *Salmo salar* spermatozoa. *J Fish Biol* 90, 1506-1516.
- Silva, J., Torrejón, G., & Bay-Schmith, E. (2003). Calibration of the acute toxicity bioassay with *Daphnia pulex* (CRUSTACEA: CLADOCERA) using a reference toxicant. *Gayana (Concepc.)*, 67(1), 87-96.
- Vasseur, P., and Cossu-Leguille, C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ. Int.* 28: 711-717.

Kéfir de agua: Características, producción y fabricación de biopelículas como una alternativa de uso de excedentes. Revisión.

Water kefir: Characteristics, production, and manufacturing of biofilms as an alternative use of surplus. Review

Vargas Sara A.^{ab}. y Ruiz-Espinosa H.^{b*}.

^a Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología. Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Demarcación Territorial Benito Juárez, C.P. 03940, Ciudad de México

^b Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México, Facultad de Ingeniería Química, Colegio de Ingeniería en Alimentos, 18 Sur y Avenida San Claudio, 72570 Puebla, México

* E-mail: hector.ruiz@correo.buap.mx

Resumen

El desarrollo de nuevos materiales de base biológica que ayuden a disminuir los desechos plásticos se ha convertido en una prioridad industrial para la sostenibilidad. El uso de biomasa microbiana representa una alternativa viable al ser una fuente de polímeros completamente renovable. La presente revisión se centra en el uso de biomasa microbiana obtenida a partir del kéfir de agua para formar películas biodegradables con aplicaciones alimentarias. Al obtenerse un exceso de biomasa en cada fermentación, darle un valor agregado a este excedente permitiría obtener dextrano a un costo asequible, sin requerir procesos de extracción complejos, mientras que paralelamente se genera un producto nutritivo con propiedades funcionales benéficas para la salud, representando una alternativa atractiva a los materiales poliméricos convencionales.

Palabras claves: *Biopelículas, dextrano, fermentación, kéfir de agua, microbiota.*

Abstract

The development of new bio-based materials that help reduce plastic waste has become an industrial priority sustainability-wise. The use of microbial biomass represents a viable alternative as it is a completely renewable source of polymers. The present review focuses on the use of microbial biomass obtained from water kefir to form biodegradable films with food applications. As an excess of biomass is obtained in each water kefir fermentation, giving added value to this surplus would allow dextran to be obtained at an affordable cost, without requiring complex extraction processes, while in parallel a nutritious product with functional properties beneficial to health is generated, representing a attractive alternative to conventional polymeric materials.

Key Words: *Biofilm, dextran, fermentation, sustainable packing, water kefir.*

Introducción

El kéfir de agua es una bebida fermentada artesanal, ligeramente espumosa, afrutada y carbonatada, con alto contenido en ácido láctico (hasta 2%) y bajo contenido alcohólico (normalmente inferior al 1%), tradicionalmente producida por fermentación de una solución de sacarosa a la que se le añaden frutas frescas o secas y los denominados granos de kéfir de agua (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Moretti et al., 2022).

Los granos de kéfir tanto de leche como de agua son partículas gelatinosas que contienen microorganismos probióticos. Si bien, los dos tipos de bebidas fermentadas se obtienen a partir de estos granos, éstas tienen características físicas y químicas diferentes y una composición microbiológica distinta; mientras que el kéfir de leche se ha estudiado ampliamente, solo algunos estudios abordan al kéfir de agua (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021), cuyo consumo se ha incrementado recientemente y exhibe una tendencia a la alza, potenciado por la tendencia global hacia el consumo de productos percibidos como saludables, entre ellos, los fermentados. Entre los países con mayor consumo de kéfir de agua se encuentran Estados Unidos, México y Canadá, en Norteamérica; Francia, Grecia, Turquía, Rumanía, Rusia, Reino Unido, Bélgica, Países Bajos, Noruega, Suecia, España y Portugal en Europa; y Brasil, Chile, Perú y Argentina en América (Moretti et al., 2022).

Además de las tendencias de mercado orientadas a productos percibidos como saludables durante la pandemia de COVID 19 se exploraron agentes antivirales no convencionales para reducir el riesgo de infección y promover una recuperación rápida de esta enfermedad. Debido al potencial de actividad antiviral, los alimentos fermentados y sus bacterias probióticas recibieron especial interés. Varias cepas de probióticos demostraron una amplia gama de actividades antivirales y diferentes mecanismos de acción, debido a la estimulación de la función del sistema inmunitario y a la producción de componentes bioactivos (Moretti et al., 2022; Muhialdin et al., 2021). Al kéfir de agua se le han atribuido propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y hepatoprotectoras y se considera puede ayudar a mejorar la salud intestinal y la

respuesta inmune (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021).

El desarrollo de polímeros de base biológica está ganando cada vez más importancia en materia de investigación y desarrollo industrial, potenciado por preocupaciones medioambientales (incremento de desechos plásticos, calentamiento global, reducción en la disponibilidad de recursos fósiles). La industria del empaquetado se encuentra en búsqueda de nuevos materiales asequibles y más durables que los tradicionales (Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022). En particular, existe un interés creciente en el desarrollo de membranas renovables y biodegradables obtenidas a partir de proteínas, polisacáridos y lípidos, que pueda emplearse como recubrimiento de alimentos y actuar como barrera para controlar la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, lípidos y otros ingredientes con el objetivo de preservar el sabor, mantener la calidad e incrementar la vida de anaquel de los productos; además pueden ser usadas como acarreadores (carriers) para ingredientes funcionales, como antimicrobianos, o antioxidantes y, para mejorar la apariencia y manipulación de los productos (Linares-Bravo et al., 2022).

En el campo industrial, la mayoría de películas de base biológica son aquellas que proceden de plantas (almidón, pectina), algas (alginato, carragenina), proteínas animales (gelatina, caseína) y algunos polisacáridos microbianos (xantana) (Linares-Bravo et al., 2022; Moretti et al., 2022). La búsqueda de alternativas poliméricas y/o diferentes estrategias de formulación de películas ha ido ganando cada vez más protagonismo. De hecho, se han reportado mejoras considerables en las propiedades de nanocompuestos, mezclas y la obtención de películas activas, principalmente involucrando bases de polisacáridos. Dentro de esta clase de biopolímeros, los exopolisacáridos (EPSs), como el dextrano presente en el kéfir de agua, han recibido especial atención. Éstos son producidos por una variedad de bacterias, las cuales los secretan en forma de cápsulas o como una delgada capa alrededor de la célula bacteriana (Marangoni Júnior, Vieira & Anjos, 2020). Particularmente, en la producción de kéfir de agua, a medida que se producen los ciclos de fermentación, la cantidad de biomasa aumenta y la que no se utiliza como inóculo para la siguiente fermentación, es

decir, la biomasa sobrante, suele desecharse. Este excedente de volumen de granos de kéfir puede emplearse como fuente de extracción de dextrano (Linares-Bravo et al., 2022; Moretti et al., 2022). De ahí que una alternativa para la valorización de esta biomasa residual sea su incorporación en matrices a base de biopolímeros para el desarrollo sostenible de películas (Marinho et al., 2023).

Si bien, el uso del kefirano (EPS del kéfir de leche) ha sido bastante documentado, poco se sabe sobre la bioactividad de los EPSs del kéfir de agua. Debido a sus atractivas propiedades tecnológicas recientemente se ha buscado el uso alternativo de estos polisacáridos para la formación de películas (Coma et al., 2019; Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022). Con base en lo anterior, la presente revisión se centra en el uso de biomasa microbiana de kéfir de agua como fuente de biopolímeros para formar nuevos materiales y utilizarlos en la formulación de películas de base biológica para su uso en industria alimentaria.

Dextrano

Los polímeros de base biológica son aquellos que se sintetizan a partir de recursos renovables en lugar de utilizar recursos fósiles como el petróleo y el gas natural, preferiblemente a través de procesos biológicos y bioquímicos. Se caracterizan por ser carbono- neutrales, por lo que la concentración de CO₂ atmosférico no cambia aún después de la incineración. Dentro de los polímeros de base biológica se encuentran los biopolímeros, que son polímeros naturales formados por plantas (como celulosa, almidón), animales (como quitina, gelatina) y microorganismos (como kefirano, β-glucano, dextrano) (Cottet et al., 2020).

El dextrano es sintetizado en particular por las LAB cuando son expuestas a un medio con sacarosa como fuente de carbono. En algunas LAB como *Lactobacillus* sp., la sacarosa puede entrar directamente en la célula vía el sistema de fosfotransferasa (SFT) y metabolizarla para formar D-lactato o convertirse en dextrano. Las bacterias dextran-sacarosas, localizadas extracelularmente son las responsables de hidrolizar la sacarosa en sus monómeros fructosa y glucosa, formando un intermedio con glucosa (glicosil-enzima) para más tarde llevar a cabo la polimerización y formar

dextrano, mientras que la fructosa resultante ingresa a la bacteria a través de SFT para satisfacer su demanda metabólica. El dextrano también puede ser sintetizado vía enzimática, usando directamente dextranosacarosas (1,6-alfa-D-glucano-6-alfa-glucosiltransferasa), la cual polimeriza la glucosa de la sacarosa en dextrano (Díaz-Montes, 2021).

La matriz de los granos de kéfir de agua está formada principalmente por dextrano (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021). El dextrano es un EPS sintetizado en el kéfir de agua por *L. hilargdii* a partir de sacarosa y es completamente insoluble. Químicamente, es un homopolisacárido, α-1,6 dextrano ramificado, con un peso molecular que varía entre 450-2000 kDa, con un grado de polimerización estimado entre 3460 y 3630 monosacáridos. Su cadena molecular principal está formada por unidades de glucosa unidas por enlaces α-1,6 con algunas ramificaciones formadas por enlaces glucosídicos α-1,3 (Moretti et al., 2022; Pendón et al., 2022).

En general, los dextranos son reconocidos como moléculas bioactivas con alto potencial para ser considerados prebióticos y resultan una alternativa prometedora para ser utilizados como aditivos alimentarios funcionales (Moretti et al., 2022). Recientemente se ha buscado el uso alternativo de este polisacárido para la formación de películas (Coma et al., 2019; Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022) y como hidrocoloide para emplearse en productos horneados (Moretti et al., 2022).

Kéfir de agua

El kéfir de agua es una bebida fermentada artesanal, normalmente producida por la fermentación de una solución de sacarosa a la que se le han añadido frutas frescas o secas. Tiene un sabor afrutado y ligeramente ácido y se percibe como carbonatado en boca (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Moretti et al., 2022). Su composición y características sensoriales dependen de las variables de fermentación (Pendón et al., 2022).

El kéfir de agua contiene microorganismos viables, residuos de medio de fermentación (azúcar o frutas) y varios metabolitos como resultado de la fermentación de la sacarosa, glucosa y fructosa, principalmente ácidos orgánicos (láctico, acético), etanol, CO₂, manitol, vitaminas (del complejo B) y

aminoácidos como la arginina. Además, en esta bebida también se pueden encontrar diferentes polisacáridos producidos por los microorganismos principalmente, glucanos (polímeros de glucosa) y en menor medida levanos (polímeros de fructosa). Se han identificado alrededor de treinta compuestos aromáticos que influyen en el sabor del kéfir de agua incluyendo metil ésteres, que se derivan de algunas frutas usadas en el proceso (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Pendón et al., 2022). La fermentación se lleva a cabo por *granos* de kéfir de agua que también se conocen como *tibicos* o *tibi*; son estructuras gelatinosas de 5 a 20 mm de diámetro, con forma irregular similar a una coliflor, y constituyen la matriz de polisacáridos (dextrano, levano) en la que los microorganismos coexisten de forma simbiótica. Su contenido aproximado de materia es del 10-14% (p/p) (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022); tienen apariencia gelatinosa y translúcida y su color varía de amarillo a marrón, pues puede estar influenciado por el material fermentado (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Moretti et al., 2022).

Beneficios a la salud del consumo de kéfir de agua

Los microorganismos que se encuentran en el kéfir de agua no son patógenos y, junto con los ácidos orgánicos que producen (y que se encuentran en el producto fermentado) son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Salmonella typhimurium*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, así como de hongos filamentosos como *Aspergillus flavus* (Moretti et al., 2022). En adición a esta actividad antimicrobiana, al kéfir de agua se le han asignado características inmunomodulantes, antihipertensivas, antitumorales, anticancerígenas, hepatoprotectivas, antitoxigénicas, hipocolesteromias, hiperglicémicas, antihiperlipídicas, antioxidantes, antiedematosas, antiinflamatorias y antiulcerogénicas. Asimismo, puede ayudar a mejorar la salud intestinal y la inmunidad (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). Estos efectos podrían atribuirse tanto a los microorganismos benéficos que se encuentran en la bebida fermentada como a sus metabolitos (ácidos orgánicos y oligosacáridos), de forma directa,

o indirecta, a través de la estimulación de la microbiota intestinal. Sin embargo, aún se necesitan más investigaciones para comprender los múltiples beneficios a la salud asociados al consumo de kéfir de agua (Moretti et al., 2022), ya que las diferencias en el método de producción y factores tales como el origen del inóculo, los sustratos utilizados, la temperatura de fermentación y el tiempo influyen en el tipo y concentración de agentes bioactivos generados (Lynch et al., 2021). Es importante mencionar que a menudo se consume el kéfir como una bebida artesanal o de fabricación casera, por lo que no ni el proceso de fermentación ni la identidad de las cepas probióticas empleadas en su fabricación están regulados; por tanto, es necesario incorporarla a la legislación alimentaria de los países donde se consume (Moretti et al., 2022). Hasta 2021 ninguna cepa bacteriana había recibido aprobación para ser considerada como probiótico en la Unión Europea (Lynch et al., 2021).

Proceso de fermentación

La composición del kéfir de agua y sus características sensoriales dependen de diferentes factores del proceso de fermentación como el inóculo (origen de los granos), la concentración y tipo de azúcar, composición del medio, capacidad buffer, concentración de calcio, incorporación de oxígeno, tiempo y temperatura de fermentación, el tipo de fruta añadida, entre otros (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022). Durante la fermentación, hay procesos que suceden simultáneamente como el crecimiento de los granos de kéfir y la síntesis de glucano. Durante las primeras 24 h de fermentación, la concentración de sacarosa disminuye en un 98%, mientras que la concentración de etanol se incrementa, y sucesivamente, la de ácido láctico, glicerol, acetato y manitol; este consumo inicial de sacarosa está positivamente correlacionado con la producción de etanol por las levaduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*). Las levaduras también poseen una invertasa que hidroliza la sacarosa, incrementando la concentración de fructosa y glucosa, que son metabolizadas por las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. En etapas avanzadas del proceso, los niveles de etanol disminuyen debido a su conversión en acetato por las bacterias ácido acéticas (Pendón et al., 2022).

Artículos

El kéfir de agua tradicionalmente se produce de forma casera, es por eso que hasta la fecha no se ha desarrollado un proceso a escala industrial ni cultivos iniciadores de cepa definidos (Lynch et al., 2021). Si bien, la fermentación del kéfir de leche se ha estudiado ampliamente, se puede encontrar menos información científica concerniente a la

producción a escala comercial del kéfir de agua, las características de los granos y parámetros de fermentación óptimos (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021). En el Tabla 1 se enlistan algunas condiciones generales de fermentación reportadas en la bibliografía.

Tabla 1. Condiciones de fermentación del kéfir de agua

Biomasa (% p/v)	Sustrato (% p/v)	Temperatura de fermentación (°C)	Tiempo (h)	Referencia
6-20	Azúcar (6-30)	21	24-48	(Pendón et al., 2022).
6 a 30	Sacarosa (6,10)	20-25	24-72	(Moretti et al., 2022)
10	Azúcar refinada, azúcar morena, azúcar de coco, azúcar demerara, melaza de caña (10)	27	48	(Tavares et al., 2023)
20	Azúcar (4)	21	17,21,25,29	(Laureys et al., 2022)

Fuente: Elaboración propia.

Las condiciones de fermentación también afectan los metabolitos que se producen, y esto está estrechamente relacionado con el efecto biológico de la bebida, ya que los componentes bioactivos proporcionarán diferentes beneficios potenciales para la salud en función de su naturaleza y modo de acción, que en muchos casos aún se deben dilucidar. Cualquier variación en el proceso de fermentación puede originar cambios en la microbiota y en la calidad del producto, por lo que las principales variables de proceso son revisadas a continuación (Safak et al., 2023; Zannini et al., 2023).

Microorganismos presentes en el kéfir de agua

Los granos de kéfir de agua constituyen un sistema microbiológico complejo de bacterias y levaduras que coexisten de forma simbiótica y que permanecen inmersas e inmovilizadas en una matriz de EPSs (principalmente dextrano y levano) (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). Existen variaciones en la microbiota de los granos que dependen de su origen geográfico, de las condiciones de fermentación y de los sustratos utilizados (Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022). De manera general, los grupos microbianos

presentes en el grano de kéfir de agua son bacterias ácido lácticas (LAB) ($10^7 - 10^8$ UFC/g de grano; principalmente *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. y *Streptococcus* sp.), ácido acéticas (BAA) ($10^6 - 10^7$ UFC/g grano), levaduras ($10^6 - 10^7$ UFC/g grano) (Lynch et al., 2021), y los microorganismos productores de EPS, que podrían ser responsables del crecimiento del grano, como *L. nagelii*, *L. hordei*, *L. satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. casei*, (Guzel-Seydim, Gökırmaklı & Greene, 2021; Pendón et al., 2022). Se considera a *L. hilgardii* como el principal productor de polisacáridos insolubles en el grano de kéfir, sin embargo, cuando esta bacteria no está presente, otros productores de dextrano deben asumir ese rol (Lynch et al., 2021). A través de técnicas de biología molecular se han identificado especies bacterianas como *L. kefirii*, *L. parabuchneri*, *Acetobacter lovaniensis*, *Bifidobacterium aquikefirii*; y levaduras como *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Dekkera bruxellensis*. Tanto en las bebidas de kéfir como en los granos, se ha reportado la presencia de *Phylum Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* (Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022; Pendón et al., 2022).

Sacarosa

La sacarosa, generalmente añadida como azúcar morena, es la fuente de carbono más utilizada en la fermentación del kéfir de agua. Las soluciones de miel y agua de melaza de uva también son buenos medios alternativos debido a sus efectos positivos sobre el crecimiento de los granos de kéfir y sus propiedades sensoriales. Cuando la sacarosa se sustituye gradualmente por glucosa y fructosa, se observa una disminución en las tasas de producción volumétrica de etanol, ácidos láctico y acético, y glicerol. Sin embargo, la glucosa se fermenta más rápido que la fructosa y se prefiere como sustrato alternativo a la sacarosa (Pendón et al., 2022). Si bien el azúcar es la fuente más utilizada, debido a la buena capacidad de los microorganismos de los granos de kéfir para adaptarse a diferentes sustratos, la bebida se ha reportado la producción de kéfir de agua con diferentes sustratos de azúcar incluyendo melaza de caña, azúcar demerara y azúcar moreno, así como otras fuentes alternas de azúcar como coco (*Cocus nucifera*) (Tavares et al., 2023). Como opción para dar valor agregado a subproductos agroindustriales, se ha propuesto el uso de bagazo y cáscaras de frutas, entre otras materias primas, como fuente de azúcares fermentables para la producción sustentable de kéfir; sin embargo, aún se necesitan estudios adicionales para demostrar su viabilidad, dado que el uso de estos sustratos puede conducir a la generación de otros compuestos metabólicos, alterando las características sensoriales y propiedades biológicas de la bebida (Moretti et al., 2022).

Frutas

El uso de frutas modifica la fermentación y la tasa de producción de ácido láctico y acético, así como también el contenido de nutrientes y las características del producto final (Pendón et al., 2022). De manera habitual, los higos frescos o secos parecen ser los frutos más utilizados, sin embargo, también se han empleado frutas secas, como pasas, dátiles y

ciruelas (Laureys et al., 2022). El uso de higos secos también influye en el contenido de calcio en la fermentación, lo que a su vez, promueve el aumento de masa, como ya se mencionó antes, para la síntesis de dextrano se requiere de la enzima glucano-sacarasa que requiere calcio para operar, por lo que su presencia puede mejorar significativamente el crecimiento del grano (Lynch et al., 2021).

pH

Cuando el pH es significativamente bajo se observa una disminución en el crecimiento del grano, ya que se inhibe la producción de las glucano-sacarosas lo que evita la formación de glucano (Laureys et al., 2022; Lynch et al., 2021).

Oxígeno

La disponibilidad de oxígeno afecta la composición química del producto final ya que las condiciones aeróbicas favorecen la proliferación de bacterias ácido-acéticas, lo que aumenta la concentración de ácido acético y disminuye los niveles de etanol, por el probable consumo de este metabolito por estas bacterias (Pendón et al., 2022).

Producción del kéfir de agua

La metodología general para la producción de kéfir de agua se ilustra en la Figura 1. Primero se prepara un medio de sacarosa con o sin frutas secas o extractos de frutas; se añaden los granos de kéfir y se incuban a 21°C por 2-3 días (Tabla 1). Después de la fermentación, los granos se separan del medio por filtración, se lavan, se secan y se mantienen en un tanque de refrigeración hasta la próxima inoculación; esencialmente pueden reutilizarse *ad infinitum*. Es importante mencionar que el uso de cultivos iniciadores definidos no es común en la elaboración de kéfir de agua de forma artesanal. Dado que la regulación del proceso de producción de kéfir es incipiente, también es necesario definir muchos parámetros de calidad para el escalado de este producto (Laureys et al., 2022; Lynch et al., 2021; Moretti et al., 2022).

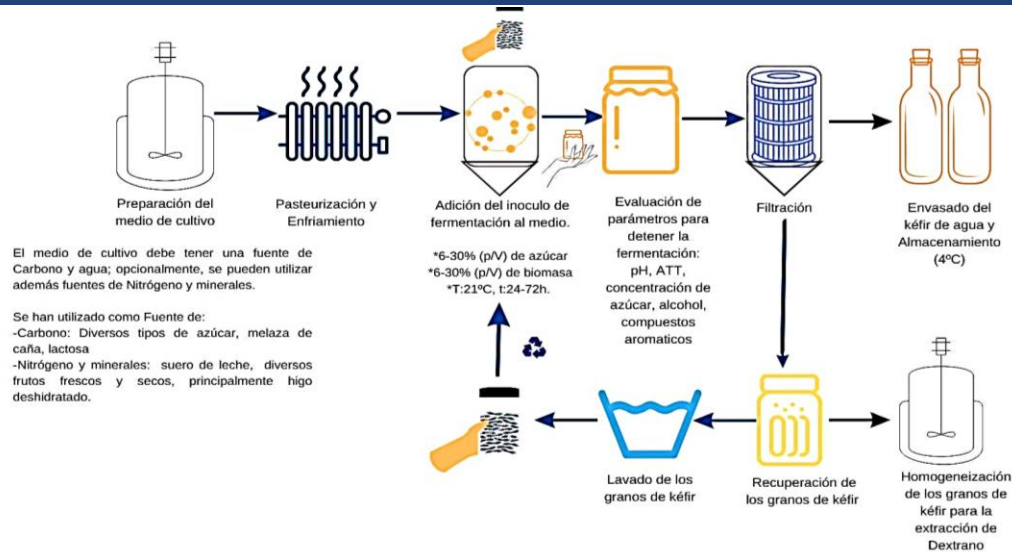


Figura 1. Diagrama de proceso general de producción del kéfir de agua

Fuente: Elaboración propia con información de: Guzel-Seydim, Gökırmaklı, & Greene, (2021); Laureys, Leroy, Vandamme, & De Vuyst, (2022); Lynch, Wilkinson, Daenen, & Arendt, (2021); Moretti et al., (2022); Zannini et al., (2023).

Existe una interrelación entre la composición del medio, las condiciones de fermentación, la composición microbiana, la cinética y los productos de fermentación del kéfir de agua resultante. Por lo tanto las características de cada proceso de fermentación dependen de la selección específica de los sustratos utilizados (Safak et al., 2023; Zannini et al., 2023).

Producción de exo-polisacáridos (EPSs) a partir de la biomasa de kéfir

El kéfir de agua contiene una cantidad elevada de bacterias productoras de EPSs; la fracción exo-polisacárida del kéfir de agua contiene principalmente dextranos, con una composición estructural y pesos moleculares variables. Los dextranos del kéfir de agua están unidos principalmente en la posición O_3 y O_2 ; además, en la bebida se encuentran trazas de levanos. Por su parte, los granos de kéfir están compuestos por dextranos ramificados en la posición O_3 , preferentemente. Comparados con la bebida, los granos contienen una porción elevada de unidades de glucosa con enlaces 1,3. Los análisis de metilación y la huella enzimática han demostrado que los dextranos en los granos de kéfir y en la bebida contienen cantidades variables de los mismos elementos estructurales y consecuentemente pueden ser producidos por diferentes microorganismos (Fels et al., 2018).

Las BAL (principalmente *L. hilgardii*), son conocidas por producir diferentes tipos de dextrano, que se clasifican en dextrano insoluble y soluble de acuerdo con sus enlaces y la presencia o ausencia de ramificaciones. Los granos de kéfir de agua (como sus productos fermentados) están constituidos casi en su totalidad por dextranos ramificados a los cuales se les atribuye su nula solubilidad. Es posible que incluso dentro de un mismo grano, existan diferentes tipos de dextranos, aunque se ha probado también que su estructura no se ve afectada por la composición del medio (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022).

La producción de dextrano aparente ser una adaptación del nicho microbiológico a un entorno alto en sacarosa; los EPSs se producen extracelularmente por la acción de una enzima secretada conocida como glucano sacarasa, que puede ser liberada en el medio o retenida en la célula (Lynch et al., 2021). La síntesis de dextrano por *L. Hilgardii* se produce por una glucano- sacarasa extracelular (T: 40°C, pH: 4.3–4.6) que se activa cuando el pH disminuye durante el crecimiento bacteriano, pero se inactiva si el pH sigue disminuyendo (pH~3) o a bajas concentraciones de calcio, ya que las glucano-sacarosas tienen una región de unión al calcio cerca de su centro activo. De esta manera, valores bajos de pH producen granos pequeños con alta concentración microbiana (Lynch et al., 2021; Pendón et al., 2022).

El crecimiento del grano reviste gran importancia, ya que un desarrollo insuficiente limita la producción exitosa del kéfir; sin embargo, la generación de excedentes de los granos posibilita su utilización para obtener nuevos biomateriales con aplicaciones industriales. En la Figura 2 se resumen gráficamente los factores que influyen en el crecimiento de la biomasa de kéfir. Como ya se mencionó, el pH, la concentración de calcio, la viabilidad y tipo de sustratos y nutrientes, la temperatura y el tiempo de fermentación pueden influir en la actividad de las glucano-sacarosas, afectando la tasa de biosíntesis (Pendón et al., 2022; Zannini et al., 2023). Además, es importante considerar las

características intrínsecas del inóculo; si bien el incremento en la biomasa ocurre durante los procesos de subcultivo (Figura 1), obtener un bajo rendimiento es un problema común que limita la producción de la bebida, la caracterización bioquímica y microbiológica del cultivo inicial y el uso posterior de los granos. Usar un inóculo de kéfir congelado, descongelado y reactivado, no incrementa la biomasa, debido al daño irreversible que se produce en el grano (Pendón et al., 2022). Por lo tanto, definir las condiciones del medio de cultivo, el origen del inóculo y la cinética de crecimiento de la biomasa es un factor clave en la producción del kéfir.

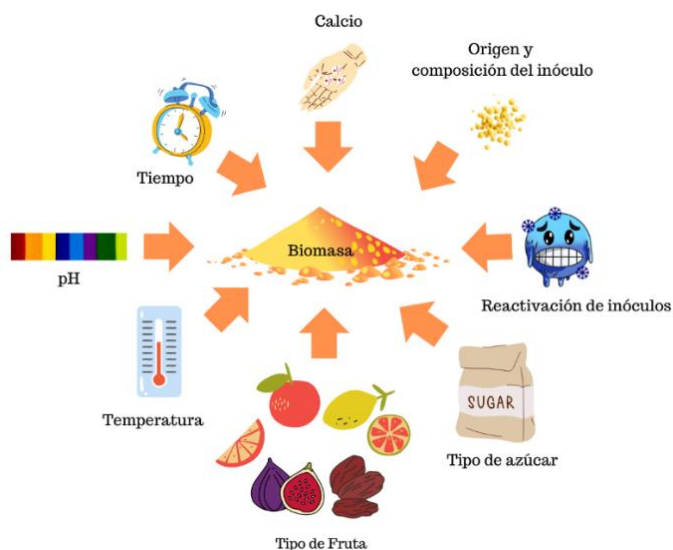


Figura 2. Factores que influyen en el rendimiento de la biomasa de kéfir
Fuente: Elaboración propia con información de Pendón et al., (2022); Zannini et al., (2023).

Extracción y caracterización tecnológica de EPSs de kéfir y su uso para elaboración de películas

El enfoque tradicional para desarrollar nuevos materiales biodegradables ha sido la purificación de biopolímeros de interés a partir de su biomasa original, en ocasiones realizando modificaciones físico químicas para mejorar su capacidad tecnológica.

Si bien, la extracción de EPSs del kéfir resulta compleja, aquellos procesos que utilizan toda la biomasa resultan más eficientes; en este sentido, el aprovechamiento de los polisacáridos de kéfir de agua se considera más eficiente tecnológicamente hablando que aquellos del kéfir de leche (Cottet et al., 2020). Se han reportado procesos de extracción de EPSs del kéfir con calor, NaOH y una precipitación final con etanol absoluto; su

caracterización estructural indica que éstos están formados principalmente por un homopolisacárido de dextrano, que tiene estabilidad térmica y fotoquímica; en cuanto a sus propiedades tecnológico funcionales se ha observado que posee aplicaciones potenciales como estabilizante de emulsiones, con excelentes propiedades adhesivas y formadoras de películas, capaces de formar geles y dispersiones viscosas a bajas concentraciones, reafirmando entonces su gran potencial para el desarrollo de productos en la industria alimentaria, biomédica, cosmética y farmacéutica (Cottet et al., 2020; Lucena et al., 2022).

Diversas publicaciones han abordado el uso de EPSs de kéfir para la elaboración de películas. En la Figura 3 se observa un diagrama de proceso simplificado elaborado

Artículos

con base en lo reportado por distintos autores (Coma et al., 2019; Cottet et al., 2020; Linares-Bravo et al., 2022). La formación de películas involucra el uso de al menos un agente formador de películas (polisacáridos o proteínas), solventes y plastificantes. De manera general, para elaborarlas se prepara un dispersante que contenga biopolímeros y luego se remueve el solvente (método de secado) con el objetivo de disminuir la separación entre los polímeros mejorando así su interacción. Esta interacción permite la formación de una red macromolecular que

forma la estructura en la película. Las propiedades de la película dependen de la estructura y la química de las cadenas poliméricas, de las condiciones de derretimiento, y de la presencia de plastificantes, los cuales son requeridos para mejorar la integridad de la película y sus propiedades mecánicas. Usualmente son pequeñas moléculas que desestabilizan los puentes de hidrógeno, disminuyen las fuerzas intermoleculares e incrementan la estabilidad y la movilidad de las cadenas poliméricas (Linares-Bravo et al., 2022).

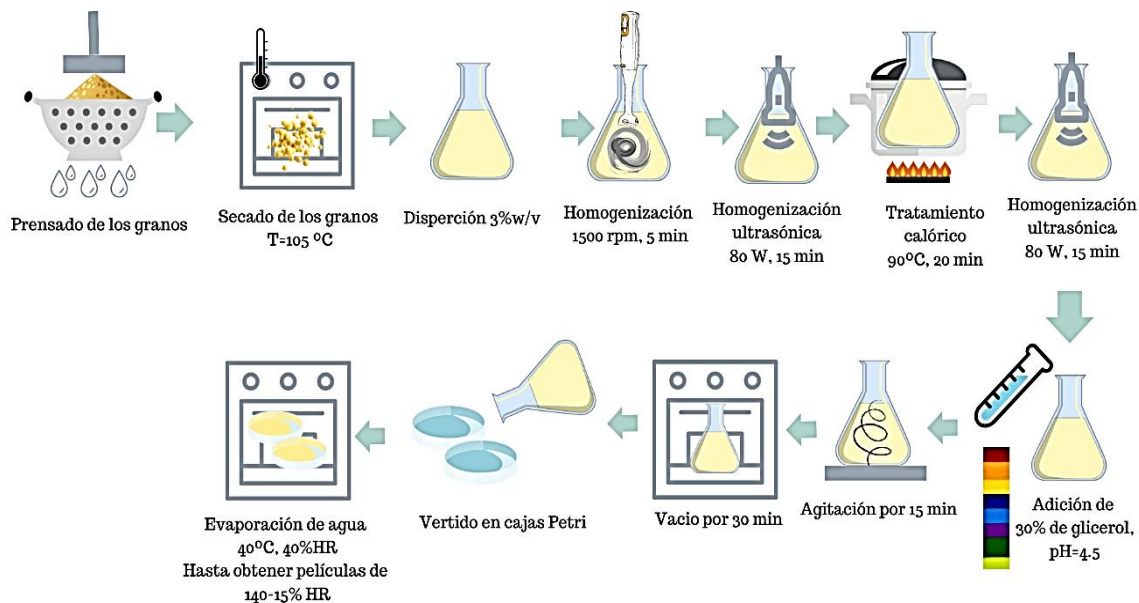


Figura 3. Diagrama de proceso simplificado con los principales pasos del proceso de recuperación de EPSs de kéfir y la formación de películas descritos en la literatura

Fuente: Elaboración propia con información de Pendón et al., 2022; Zannini et al., 2023.

El uso del dextrano a partir de la biomasa de kéfir de agua es un tema de estudio reciente. Coma et al., (2019) propusieron un sistema de extracción del dextrano utilizando toda la biomasa del kéfir de agua y estudiando el efecto de adición de distintas proporciones de glicerol como plastificante. El proceso consistió en lavar y prensar los granos, secarlos a 105°C y preparar una dispersión al 3% (peso seco) de granos de kéfir. Esta dispersión primero se homogeneizó mecánicamente (15,000 rpm, 5 min) y después se sometió a homogeneización ultrasónica (80 W, 15 min), seguida de un tratamiento térmico en baño de agua (90°C, 20 min). Después se aplicó un segundo tratamiento ultrasónico en las mismas condiciones, y se agregó el plastificante

(0,10,20,30% por peso seco de kéfir, pH final 4.5). Finalmente, las dispersiones se sometieron a vacío (30 min) para eliminar las burbujas de aire incorporadas durante el proceso. Para obtener espesores cercanos a 1 mm y 17 g en las películas, la dispersión se colocó en placas Petri de plástico (D= 8.6cm) y se evaporó el agua en un horno ventilado (40°C, 40% HR), hasta obtener un contenido residual de agua en las películas de 10 a 15%. El uso del plastificante al 30% permitió obtener películas flexibles y fáciles de manipular. Este mismo procedimiento fue retomado más tarde por Linares-Bravo et al., (2022), con la finalidad de comparar las propiedades fisicoquímicas de las películas de kéfir con las películas convencionales obtenidas a partir de almidones de taro y yuca. Los resultados de

caracterización reológica, dureza y A_w (<0.6) fueron similares. Las películas de kéfir mostraban continuidad, uniformidad y alta transparencia sin grietas, por lo que pueden representar una alternativa atractiva para reemplazar a los materiales convencionales.

Uso de películas a base de kéfir

Se han realizado diversos estudios sobre la caracterización y las propiedades de películas elaboradas a partir de biomasa de kéfir de agua, utilizando diferentes composiciones. El uso directo de la biomasa sin un proceso de extracción exhaustivo del dextrano es una característica común en varios procedimientos; en este tenor, Coma et al., (2019) elaboraron películas con 3% (p/p) de kéfir en base seca, añadiendo glicerol en diferentes concentraciones (0,10,20,30%) como plastificante, reportando que el glicerol al 30% en peso permitía obtener películas homogéneas, continuas, sin grietas, uniformes y de alta transparencia. La presencia del plastificante tuvo un efecto en las propiedades térmicas, disminuyendo la temperatura de transición vítrea (T_g) de las muestras, en las propiedades mecánicas al obtenerse películas más flexibles, de gran elasticidad y fáciles de manipular con un grosor aproximado de 6×10^{-5} m, así como también en la cantidad de agua de hidratación y la permeabilidad al vapor de agua. Por otra parte, Linares-Bravo et al., (2022) compararon películas a base de kéfir con películas convencionales de almidón extraído de taro y yuca. Las primeras mostraron flexibilidad, elasticidad, continuidad, uniformidad y alta transparencia sin grietas, mientras que las elaboradas con almidones exhibían una mayor dureza y por lo tanto eran quebradizas, concluyendo que los granos de kéfir de agua tienen potencial para ser utilizados en el desarrollo de nuevos materiales biodegradables, como una alternativa a las fuentes comunes de películas comestibles.

También se ha estudiado el uso de otros polímeros y nanocompuestos en la formulación, Marinho et al., (2023) utilizaron la siguiente formulación: 1.5% (p/v) quitosano 0.3% (p/v) granos de kéfir de agua, 2% (p/v) A. acético, 0.45% (p/v) glicerol, 3% de SiO_2 obteniendo películas con características uniformes, ligeramente rugosas debido a la adición de nanosilíce, con un grosor aproximado de 1.6×10^{-5} m. El uso de este

nanocompuesto también permitió mejorar la estabilidad térmica, aumentar la ductilidad sin interferir en su resistencia a la tracción. Además, las nanopartículas aumentaron la estabilidad térmica asociada a la humedad de las películas, la película de control (quitosano/kéfir de agua) experimentó una pérdida de masa del 5 % a $68.3 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que la película quitosano/kéfir de agua + 10 % SiO_2 mostró la misma reducción de masa a $75.7 \text{ }^\circ\text{C}$. En general, el uso de 3 % de SiO_2 puede ser la concentración más prometedora como alternativa sostenible para el envasado de alimentos, ya que es posible mejorar propiedades, como la resistencia a la tracción, la ductilidad y la estabilidad térmica de las películas.

Por otro lado, se ha estudiado el uso de otros compuestos de base biológica como polisacáridos, proteínas o lípidos y aditivos funcionales que permitan modificar o mejorar las propiedades del dextrano, con el objetivo de mejorar las propiedades de barrera mientras se mantienen las propiedades deseables de los alimentos. El uso de otros ingredientes en la formación de compuestos de películas comestibles brinda una amplia gama de posibilidades para modificar sus propiedades y adaptarse a los requisitos para diferentes alimentos (Zikmanis et al., 2021).

Finalmente, las películas de kéfir pueden tener distintas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica e incluso en el campo biomédico, ya que presentan una distribución uniforme de bacterias que pueden actuar para proteger heridas contra microorganismos patógenos (Linares-Bravo et al., 2022). En la industria alimentaria, estas películas biodegradables pueden ser funcionales, actuando como agentes antimicrobianos o antioxidantes (Coma et al., 2019), pudiendo utilizarse para el empaque de alimentos y el empaque activo (Cottet et al., 2020).

Prospectiva

La demanda actual de los consumidores de alimentos ha llevado a la industria alimentaria y de embalaje a enfrentar varios desafíos, el primero esta relacionado con la conservación de alimentos para prolongar la vida útil de los mismos, sin alterar sus propiedades originales, y sin el uso excesivo de aditivos; el segundo es la búsqueda de la generación de

procesos sostenibles reduciendo la producción de desechos debido al uso de envases convencionales a base de petróleo. Cabe destacar como un enfoque muy deseable la sustitución de los polímeros sintéticos por materiales biodegradables (Galus et al., 2020). El uso de películas y recubrimientos comestibles desarrollados a partir de biopolímeros alimentarios han avanzado significativamente durante los últimos años (Kumar et al., 2022).

Se han investigado varios materiales novedosos para ser utilizados en la producción de películas y recubrimientos comestibles. La fuente de donde se obtienen estos biomateriales, generalmente biopolímeros, es un factor muy importante que influye en las propiedades funcionales finales de los recubrimientos (Galus et al., 2020). El uso del dextrano generado a partir del kéfir de agua es un tema de investigación reciente, que no se ha explorado tanto como el uso del kefirano proveniente del kéfir de leche, y cuyo proceso de extracción es más sencillo, además de que se está utilizando el excedente de biomasa generado tras la fermentación, al que comúnmente no se le da aplicación. Debido a esto, y a las propiedades funcionales únicas que tienen los EPSs del kéfir de agua, incluyendo biodegradabilidad, inocuidad, biocompatibilidad, citocompatibilidad, actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*; es que recientemente están ganando protagonismo. Desde el punto de vista tecnológico el dextrano obtenido a partir del kéfir se puede utilizar para modificar propiedades texturales, mecánicas y reológicas de productos de recubrimiento, exhibiendo capacidades estabilizantes, emulsionantes, de adherencia y de barrera al vapor de agua que son satisfactorias para usarse en la formación de biopelículas y coberturas (Díaz-Montes, 2021; Lucena et al., 2022), lo que puede dar lugar a envases adecuados y recubrimientos protectores específicos con propiedades mejoradas, que contribuirían a aumentar la vida útil y mejorar la calidad de los alimentos (Coma et al., 2019).

Como ya se ha mencionado, algunas investigaciones han desarrollado películas de dextrano puro, evaluando diferentes concentraciones y tipos de plastificantes, el desarrollo de mezclas de dextrano con otros

biopolímeros, y el uso de nano- rellenos en películas. Sin embargo, aún falta investigar sobre el desarrollo de películas a base de mezclas de dextrano con otros biopolímeros incluyendo varios tipos de proteínas, polisacáridos, lípidos y el uso de diversos nano-compuestos, así como también la aplicación de estas películas en diferentes productos. Además, el hecho de que las diferentes formulaciones de recubrimientos dependan de los factores intrínsecos y extrínsecos del alimento, hace necesario el desarrollo de investigación para caracterizar y evaluar las propiedades de los EPS del kéfir de agua y su combinación con otros ingredientes. El desarrollo de nuevas composiciones de recubrimientos y películas es complejo y requiere una elección cuidadosa de los ingredientes del recubrimiento de EPS. Dado que los diferentes materiales utilizados para la fabricación de recubrimientos y películas tienen diferentes efectos sobre la calidad del alimento que se recubre, la elección de los ingredientes del recubrimiento dependerá de los factores intrínsecos y extrínsecos involucrados, por lo tanto, los materiales de cobertura que se desarrollen para un producto pueden no ser apropiados para otro. Por ello, se requiere ahondar en la caracterización y evaluación de propiedades de EPS microbianos y su combinación con otros ingredientes (Zikmanis et al., 2021).

Si bien, los beneficios del uso de películas y recubrimientos comestibles para la industria alimentaria son numerosos, solo se han desarrollado algunas aplicaciones industriales. Debido a esto el escalamiento industrial podría ser otra línea de investigación importante, considerando y delimitando parámetros como el vapor de agua, el oxígeno, la barrera aromática, la reducción de la pérdida de peso de los alimentos y los agentes antimicrobianos y antioxidantes añadidos (Kumar et al., 2022); así como también, las propiedades mecánicas, sensoriales, funcionales, junto con los costos de procesamiento. Por lo tanto, se requiere más investigación sobre este tema existiendo un amplio campo de investigación, para poder comercializar industrialmente estos recubrimientos o películas.

Conclusiones

A diferencia de los polisacáridos vegetales que son ampliamente conocidos e investigados, el uso de EPSs sigue siendo muy limitado, especialmente para películas y recubrimientos. A lo largo de esta revisión se describió el uso de los EPSs de la biomasa del kéfir como nueva fuente de biopolímeros para el desarrollo de materiales biodegradables, que pueden utilizarse en diferentes aplicaciones específicas. Los granos de kéfir de agua representan una alternativa viable, ya que su uso involucra no solo la producción de una bebida fermentada, sino que también el excedente de biomasa puede ser utilizado como fuente de EPSs, de forma directa sin utilizar un proceso de extracción complejo. El ecosistema microbiano y los metabolitos presentes en el kéfir de agua dependen profundamente de las variables y condiciones de fermentación y, en consecuencia, los beneficios para la salud y el crecimiento del grano. Se necesitan más estudios para establecer un proceso estandarizado para la producción del kéfir de agua, el uso de iniciadores definidos, sustratos utilizados, lo que permitiría la elaboración de productos con una calidad constante. Los EPSs del kéfir no tienen la desventaja ambiental asociada a los polímeros sintéticos, el cultivo de los granos resulta sencillo, y barato, además de que no se requieren técnicas complejas de extracción y tienen propiedades tecno-funcionales interesantes para la industria química y alimentaria, como su uso para la formación de películas y recubrimientos, debido a su adhesividad, uniformidad, continuidad y alta transparencia sin la formación de grietas por lo que estas películas representan una alternativa atractiva capaz de reemplazar los materiales convencionales.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología, CONAHCYT, por su apoyo con la beca recibida para la estancia posdoctoral.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, BUAP, por brindar sus instalaciones y el acceso a las bases de datos necesarias para la realización de este trabajo.

Referencias

Coma, M. E., Peltzer, M. A., Delgado, J. F., & Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an

innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 120(September), 109234.

<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>

Cottet, C., Ramirez-Tapias, Y. A., Delgado, J. F., de la Osa, O., Salvay, A. G., & Peltzer, M. A. (2020). Biobased materials from microbial biomass and its Derivatives. *materials*, 13(1263), 26.

<https://doi.org/doi:10.3390/ma13061263>

Díaz-Montes, E. (2021). Dextran : Sources , Structures, and Properties. *Polysaccharides*, 554–565.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>

Fels, L., Jakob, F., Vogel, R. F., & Wefers, D. (2018). Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *189(February)*, 296–303.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>

Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science and Technology*, 113(March), 42–53.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>

Laureys, D., Leroy, F., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2022). Backslopping Time, Rinsing of the Grains During Backslopping, and Incubation Temperature Influence the Water Kefir Fermentation Process. *Frontiers in Microbiology*, 13(May), 1–12.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871550>

Linares-Bravo, P., Cabo-Araoz, S. D., Luna-Solano, G., Urrea-García, G. R., & Cantú-Lozano, D. (2022). Obtention of New Edible Biofilms from Water Kefir Grains in Comparison with Conventional Biofilms from Taro (*Colocasia esculenta*) and Cassava (*Manihot esculenta*) Starch. *Processes*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/pr10091804>

Lucena, M. A., Ramos, I. F. D. S., Geronço, M. S., de Araújo, R., da Silva Filho, F. L., da Silva, L. M. L. R., de Sousa, R. W. R., Ferreira, P. M. P., Osajima, J. A., Silva-Filho, E. C., Rizzo, M. D. S., Ribeiro, A. B., da

Artículos

Costa, M. P. (2022). Biopolymer from Water Kefir as a Potential Clean-Label Ingredient for Health Applications: Evaluation of New Properties. *Molecules*, 27(12). <https://doi.org/10.3390/molecules27123895>

Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021). An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345(March). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>

Marangoni Júnior, L., Vieira, R. P., & Anjos, C. A. R. (2020). Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. *Carbohydrate Polymers*, 246(May), 116609. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116609>

Marinho, C. O., Marangoni Júnior, L., Cecci, R. R. R., & Vieira, R. P. (2023). Blends of Chitosan and Water Kefir Grain Biomass Incorporated with Nanosilica. *Coatings*, 13(2), 1–10. <https://doi.org/10.3390/coatings13020465>

Moretti, A. F., Moure, M. C., Quiñoy, F., Esposito, F., Simonelli, N., Medrano, M., & León-Peláez, Á. (2022). Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. *Future Foods*, 5(November 2021), 100123. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

Muhialdin, B. J., Zawawi, N., Abdull Razis, A. F., Bakar, J., & Zarei, M. (2021). Antiviral activity of fermented foods and their probiotics bacteria towards respiratory and alimentary tracts viruses. *Food Control*, 127(December 2020), 108140. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108140>

Pendón, M. D., Bengoa, A. A., Iraporda, C., Medrano, M., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2022). Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), 162–180. <https://doi.org/10.1111/jam.15385>

Tavares, P. P. L. G., Mamona, C. T. P., Nascimento, R. Q., dos Anjos, E. A., de Souza, C. O., Almeida, R. C. D. C., Mamede, M.E.D.O., Magalhães-Guedes, K. T. (2023). Non-Conventional Sucrose-Based Substrates: Development of Non-Dairy Kefir Beverages with Probiotic Potential. *Fermentation*, 9(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040384>

Zannini, E., Lynch, K. M., Nyhan, L., Sahin, A. W., O' Riordan, P., Luk, D., & Arendt, E. K. (2023). Influence of Substrate on the Fermentation Characteristics and Culture-Dependent Microbial Composition of Water Kefir. *Fermentation*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>

Zikmanis, P., Juhņeviča-Radenkova, K., Radenkova, V., Segliņa, D., Krasnova, I., Kolesovs, S., Orlovskis, Z., Šilaks, A., Semjonovs, P. (2021). Microbial Polymers in Edible Films and Coatings of Garden Berry and Grape: Current and Prospective Use. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1432–1445. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02666-3>

Understanding the effect of fermentation time on the physicochemical and microbiological characteristics of “*Popo*”, a traditional Mexican beverage

Comprendiendo el efecto del tiempo de fermentación sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del “*Popo*”, una bebida tradicional mexicana

Zuemy Hernández-Nolasco¹, Mariana Inés Acateca-Hernández¹, Enrique Flores-Andrade, Rafael Uzárraga-Salazar, Marisol Castillo-Morales^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Prolongación Oriente 6, Orizaba, Veracruz, 94340, México.

[*maricastillo@uv.mx](mailto:maricastillo@uv.mx)

Abstract

The *Popo* is a traditional frothy beverage crafted with fermented rice, roasted cocoa beans, cinnamon, and green chupipe fruits. Despite its widespread consumption in southeastern Mexico, there are no studies providing information on the fermentation of its dough, combining all its components to classify it as a fermented product. Hence, the aim of this study was to assess the impact of fermentation time on the physicochemical and microbiological characteristics of *Popo*. The fermentation process of the *Popo* dough prepared at the laboratory level (T1) was conducted at 25 ± 2 °C for 120 h. The study revealed an initial yeast count of 4.35 ± 0.01 log CFU/g, with a significant decrease over time. In contrast, BAL showed an increase in the first 48 h of fermentation, reaching a value of 9.54 ± 0.04 log CFU/g. Fermentation inhibited the growth of coliform microorganisms, initially present at 2.10 ± 0.05 log CFU/g, thus making *Popo* dough a safe option for consumption. Upon concluding the fermentation process, significant changes were observed, including a decrease in pH to 3.9 ± 0.02 , an increase in titratable acidity to 1.23 ± 0.03 %, and a moisture content of 39.67 ± 0.08 %. Therefore, it is recommended to subject *Popo* dough to a fermentation period of at least 48 h to enhance its microbiological quality.

Key Words: *Lactic acid bacteria, fermented beverage, microbial community, Popo*

Resumen

El *Popo* es una bebida espumosa tradicional elaborada con arroz fermentado, granos de cacao tostados, canela y frutos verdes de chupipe. Aunque se consume ampliamente en el sureste de México, no existen estudios que proporcionen información sobre la fermentación de sus masas, integrando todos sus componentes para identificarlo como un producto fermentado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tiempo de fermentación sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del *Popo*. El proceso de fermentación de la masa de *Popo* elaborada a nivel de laboratorio (T1) se realizó a 25 ± 2 °C durante 120 h. El estudio reveló un recuento inicial de levadura de 4.35 ± 0.01 log UFC/g, con una disminución significativa con el tiempo. En contraste, las BAL mostraron un aumento en las primeras 48 h de fermentación, alcanzando un valor de 9.54 ± 0.04 log UFC/g. La fermentación inhibió el crecimiento de microorganismos coliformes, inicialmente presentes en 2.10 ± 0.05 log UFC/g, lo que convirtió a la masa de *Popo* en una opción segura para el consumo. Al concluir el proceso de fermentación, se observaron cambios significativos, incluyendo una disminución del pH a 3.9 ± 0.02 , un aumento en la acidez titulable del 1.23 ± 0.03 % y un contenido de humedad de 39.67 ± 0.08 %. Por lo tanto, se sugiere someter las masas de *Popo* a una fermentación de al menos 48 h para mejorar su calidad microbiológica.

Palabras claves: *Bacterias ácido lácticas, bebida fermentada, comunidad microbiana, Popo*

Introduction

Fermented foods represent a valuable source of cultural identity worldwide, gaining particular significance in countries like Mexico, where approximately 200 fermented products, including around 20 beverages dating back to pre-Hispanic times, have been identified (Robledo-Márquez et al., 2021). Notable examples of these beverages include Atole agrio, Tesgüino, Pozol, Atzokot, and *Popo*, prepared from cereals, fruits, and plants, consumed over the years (López-Sánchez et al., 2023; Rubio-Castillo et al., 2021; Castillo-Morales et al., 2005).

Popo is a non-alcoholic beverage originating from southeastern Mexico, obtained through a process involving the grinding of the following ingredients: roasted and husked cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), cinnamon (*Cinnamomum*), green fruits of chupipe (*Gonolobus edulis*), and rice (*Oryza sativa*) previously soaked in water overnight (Hernández-Nolasco et al., 2023). For consumption, the resulting dense mass is dissolved in water, filtered to remove solid particles, and mixed with sugar and ice. Subsequently, it is vigorously shaken with a wooden grinder to generate abundant foam, which is then served in "jícaras" made from the "Jícara" (*Crescentia cujete*) (Barros & Buenrostro, 2011).

During the rice soaking process, spontaneous fermentation occurs, promoting the growth of fermentative microorganisms, especially lactic acid bacteria (BAL) (Ghosh et al., 2014). BAL produce various antimicrobial compounds, including organic acids, creating a low pH environment that is detrimental to the development and survival of pathogenic and spoilage microorganisms (Mgomi et al., 2023). However, the synthesis of these compounds might not be effective enough to completely eradicate them from the final product, where the most adapted microorganisms determine the microbiota of traditionally fermented foods (Lhomme et al., 2016).

In a previous study, it was observed that traditionally produced *Popo* doughs exhibited

the presence of total coliform microorganisms with a concentration exceeding 2 log CFU/g, surpassing the limit allowed by NOM-147-SSA1-1996 for safe consumption (Hernández-Nolasco et al., 2023). Generally, *Popo* production is carried out on a small scale or at home, employing traditional processing methods. Limited familiarity with good manufacturing practices and proper handling may lead to unhygienic production, involving the use of rudimentary equipment and a high dependence on manual labor.

To date, no studies have been conducted to provide information on the fermentation of *Popo* doughs, which involves the integration of all components to identify it as a fermented product. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effect of fermentation time on the physicochemical and microbiological characteristics of *Popo*.

Materials and Methods

1. Production of *Popo* Dough

The ingredients, consisting of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.), cinnamon (*Cinnamomum*), green chupipe fruits (*Gonolobus edulis*), and rice (*Oryza sativa*), were purchased from the local market in Acayucan, Veracruz, Mexico. All chemicals used were of analytical grade. The *Popo* dough, designated as treatment 1 (T1), was prepared according to a traditional procedure typical of the southeast Mexico, conducted at the laboratory level. The following ingredients were ground in a grain mill (SURTEK, model U1 MOGRA1, El Salto, Jalisco, Mexico): 1000 g of roasted and husked cocoa beans, 150 g of cinnamon, 400 g of seedless green chupipe fruits, and 3 kg of rice previously soaked for 12 h in potable water. The resulting dense dough was shaped into 300 g balls, which were wrapped in cling film and then incubated at 25 ± 2 °C for 120 h. Fermentation was monitored at 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h for microbiological and physicochemical analyses, as detailed in sections 2 and 3. The production of T1 is presented in Figure 1.

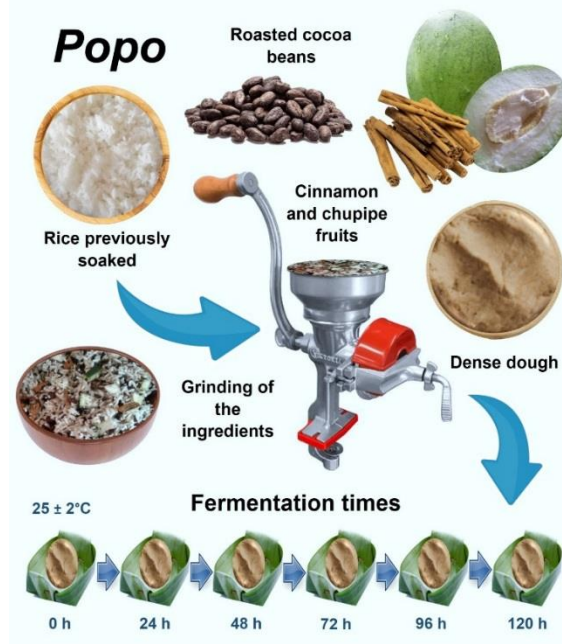


Figure 1. Elaboration process of Popo dough

2. Bacterial Isolation

To determine the quantity of viable bacterial cells present in T1, 10 g of each sample was taken and mixed with 90 mL of 0.85 % w/v saline solution. Subsequently, tenfold serial dilutions were performed. The diluted samples (1000 μ L) were plate spread on tryptone glucose yeast extract agar (TGEA; BD, Bioxon, Cuautitlán Izcalli, EMX, Mexico), potato dextrose agar (PDA; BD) with the addition of 10 % w/v tartaric acid to adjust the

pH to 3.5, violet red bile agar (VRBA; BD) adjusted to pH 7.4, and *Lactobacilli* MRS agar (MRS-VB; Difco, Sparks, MD, USA) (Table 1). The results were expressed as colony-forming units per gram of sample (CFU/g). The collected data were analyzed in terms of colony type and microbial population size (NOM-092-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, ISO 15214:1998; Jung et al., 2015).

Table 1. Specific medium used for viable cell isolation.

Type of Medium	Colony	Incubation Conditions
TGEA ^a	Total mesophilic aerobic bacteria	35 \pm 2 $^{\circ}$ C, 48 h
PDA ^b (pH 3.5)	Yeasts and molds	25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C, 120 h
MRS ^c	Lactic Acid Bacteria (LAB)	35 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C, 72 h
RVBA ^d (pH 7.4)	Total coliform microorganisms	35 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C, 24 h

Note: a)Tryptone Glucose-yeast Extract Agar, b)Potato Dextrose Agar, c)Lactobacilli MRS Agar, d)Red Violet Bile Lactose Agar.

3. Analysis of Physicochemical Properties

3.1 pH, titratable acidity, and moisture content
Physicochemical analyses of the *Popo* samples fermented at 25 $^{\circ}$ C were conducted following the methodology proposed by AOAC, including pH measurement (AOAC 981.12), determination of titratable acidity

(AOAC 942.15), and moisture content (MC) determination (AOAC 950.27).

3.2 Determination of Water Activity and Color

The measurement of water activity (a_w) was conducted using a water activity meter (Novasina LabMASTER, standard model, US) with internal temperature control at 25 $^{\circ}$ C after

prior calibration. Additionally, color parameters were determined using a Minolta colorimeter (Konica Minolta Sensing, Inc. CR-400, Osaka, Japan). The CIELAB system was employed to quantify the color of the samples. The total color difference (ΔE) was calculated using the following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_f - L^*_i)^2 + (a^*_f - a^*_i)^2 + (b^*_f - b^*_i)^2}$$

Where, L^*_f , a^*_f , and b^*_f are the values of the samples fermented over time, and L^*_i , a^*_i , and b^*_i are the values of the fresh samples.

4. Statistical Analysis

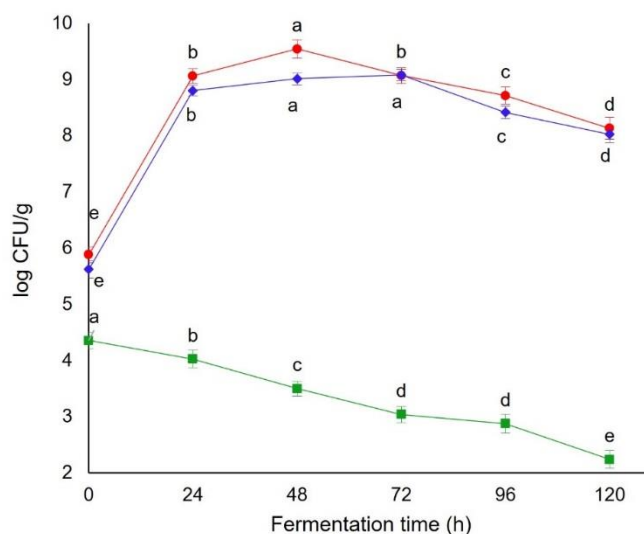
The laboratory-prepared *Popo* dough (T1) underwent a 120 h fermentation period at a temperature of 25 ± 2 °C. Measurements were taken at six different time points: 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h using a completely randomized design (CRD). Response variables included microbiological analyses (mesophilic aerobic bacteria, LAB, and yeast) and physicochemical analyses (pH, titratable acidity, MC, a_w , and total color difference (ΔE)).

The experiment was conducted in triplicate, and the results were expressed as mean values \pm standard deviations ($n = 3$). Statistical analysis was performed using Minitab Inc., (State College, PA, USA). A one-way analysis of variance (ANOVA) was applied for each evaluated response variable, followed by the Tukey test for mean comparison, with a significance level of 5 % ($p < 0.05$).

Results and Discussion

1. Bacterial Isolation

Traditional fermented foods are characterized by hosting lactic acid bacteria (LAB) and beneficial yeasts in their microbiota. These contribute to the consumer's health and enhance the quality, sensory attributes, and nutritional value of the foods (Aslam et al., 2020; Ilango & Antony, 2021). Figure 2 depicts the growth of the studied microbial groups throughout the fermentation process of the *Popo* dough prepared at the laboratory level (T1).



Note: abcd, different superscripts indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

Figure 2. Fermentation kinetics of *Popo* dough (T1) at 25 °C: Growth profile of mesophilic aerobic bacteria (—◆—), lactic acid bacteria (—●—), and yeasts (—■—).

The initial count of LAB was 5.88 ± 0.01 log CFU/g, a statistically significant exponential growth ($p < 0.05$) was observed during the first 48 h of the fermentation process, reaching a maximum of 9.54 ± 0.04 log CFU/g. After 72 h,

the population tends to decrease to 9.07 ± 0.00 log CFU/g. The count in the first 24 h of the study remained above the minimum recommended level for daily consumption in products with probiotic potential, which is 6 log

CFU/mL, as indicated by Enujiugha & Badejo (2017). Studies by Giri et al. (2018) and Miyagawa et al. (2016) showed slightly lower counts, with a maximum concentration of 8.98 and 7 log CFU/mL, respectively, in the case of Bhaati jaanr and Sochu/shochu rice-based beverages. The production of lactic acid triggers an increase in the activity of proteases, α -amylases, and glucoamylases in soaked rice, inducing the degradation of proteins and starch (Cheirsilp et al., 2023). This process provides additional substrate, ensuring greater growth of LAB (Axel et al., 2016).

The initial concentration of aerobic mesophilic bacteria was 5.61 ± 0.01 log CFU/g. At 72 h, consistency in its growth was evident, reaching a maximum point at 9.07 ± 0.00 log CFU/g. In the beverage-making process, rice spontaneous and uncontrolled fermentation, driven by the native microbiota of the cereal (Mishra et al., 2022). Puerari et al. (2015) studied chicha, a rice beverage, where aerobic mesophilic bacteria showed an initial count close to that of LAB, reaching a maximum of 5.11 log CFU/mL. In another study, Ghosh et al. (2015) reported a higher concentration of 10.51 log CFU/g during the 48-72 h of fermentation of Haria, an ethnic fermented rice beverage.

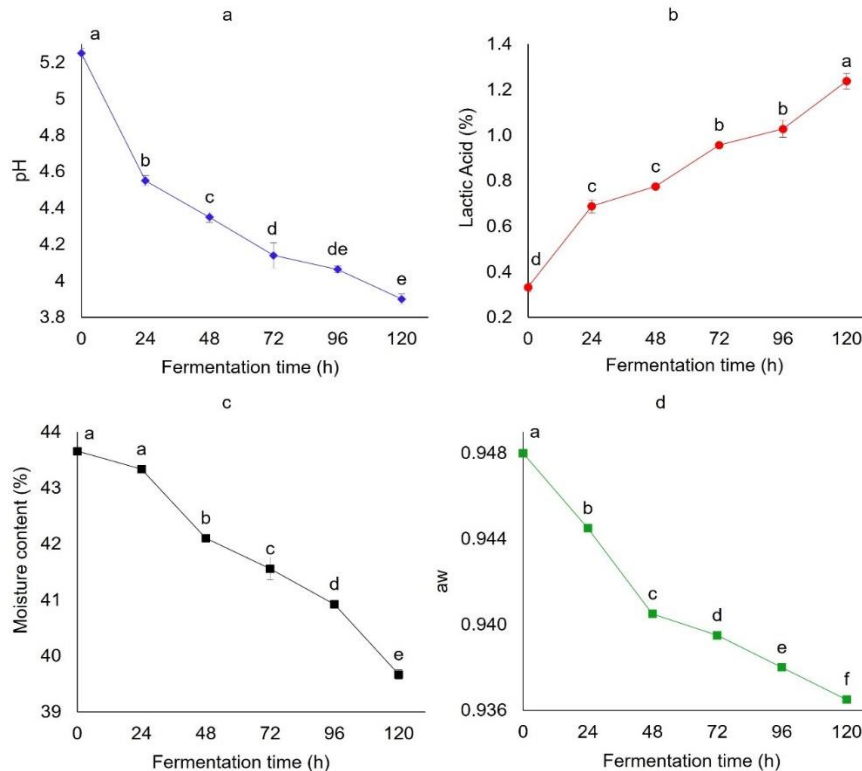
In traditional fermented foods from various regions worldwide, yeasts are produced in significant amounts, ranging between 10^5 and 10^8 CFU/g (Rakmai et al., 2019). The initial yeast population was 4.35 ± 0.01 log CFU/g. However, over the 120-hour period, a significant decrease ($p < 0.05$) in this population was observed, ultimately reaching 2.23 ± 0.05 log CFU/g. However, various studies have pointed out the limited presence of yeasts (Omemu et al., 2007; Sanni & Adesulu, 2013). The decrease in the yeast population can be attributed to various factors, such as variations in raw materials, the production process, the addition of water during milling, and the increase in acidity during fermentation, among others (Omemu et al., 2007; Teniola & Odufa,

2001). This decrease could be a consequence of the anaerobic conditions present during the incubation of the *Popo* doughs (Ghosh et al., 2015). Lv et al. (2012) observed that the growth of LAB could influence the growth of yeasts. In the studies conducted by Pswarayi & Gänzle (2019) and Ghosh et al. (2015), yeast counts below 3 log CFU/g were identified in mahewu and Haria, cereal-based beverages. Finally, Piló et al. (2018) recorded counts of 5.8 log CFU/g in chicha, a traditional Andean sparkling beverage made from grains such as corn, rice, and oats.

The initial count of total coliform microorganisms was 2.10 ± 0.05 log CFU/g, subsequently decreasing to levels below the detection limit of 10 CFU/g in all samples throughout the fermentation process. The initial count could be linked to the microbiological quality of the soaked rice, which exhibited a count of 2.02 ± 0.09 log CFU/g (data not shown). This implies that the survival of these microorganisms might depend not only on the initial pH value (5.25) in the doughs but also on factors such as raw materials, production process, milling, and ambient temperature. Adinsi et al. (2017) reported the presence of coliforms ranging from 2.4 to 3.5 log CFU/g in Gowé samples, an African beverage made from sorghum and corn. The initial counts of LAB, aerobic mesophilic bacteria, yeasts, and total coliform microorganisms in T1 were similar to those obtained by Hernández-Nolasco et al., 2023, in traditionally prepared *Popo* doughs. The presence of fungi was not detected.

2. Analysis of Physicochemical Properties

The evaluation of physicochemical properties at different stages of fermentation provided an understanding of the process dynamics. Figure 3 displays the values obtained for the assessed physicochemical analyses: pH, titratable acidity, moisture content (MC), and water activity (a_w) during the fermentation process of T1 at analysis times of 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h.



Note: abcd, different superscripts indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

Figure 3. Physicochemical analysis kinetics in the fermentation of the Popo mass (T1) at 25 °C: pH (—●—), titratable acidity (—●—), moisture content (—■—), and aw (—■—).

An initial pH of 5.25 ± 0.02 and titratable acidity of 0.33 ± 0.01 % were recorded. As the fermentation time progressed, a significant decrease in pH ($p < 0.05$) was observed, reaching 3.9 ± 0.02 (Figure 3,a), while titratable acidity significantly increased ($p < 0.05$), reaching a value of 1.23 ± 0.03 % at 120 h (Figure 3,b). The decrease in pH is attributed to the concentration of antimicrobial substances and organic acids produced during the fermentation process, primarily by LAB. As part of their anaerobic fermentative metabolism, LAB generate lactic acid. This process leads to the acidification of the medium, creating unfavorable conditions that inhibit pathogenic, toxigenic, and spoilage organisms (Mgomi et al., 2023). It has been demonstrated that fermented beverages based on cocoa and rice, such as Pozol and Chicha, undergo a drastic decrease in their pH level, dropping from 7.3 to 4-3 (Robledo-Márquez et al., 2021; Silva et al., 2018).

The titration of acids does not allow differentiation between different acidifying compounds; the percentage of titratable

acidity is expressed in relation to the predominant known organic acid (Coelho et al., 2020). The presence of lactic acid and other organic acids can be attributed to the spontaneous fermentation that occurs during the soaking of rice, initiated by its native microbiota. LAB and yeasts produce various antimicrobial compounds, such as bacteriocins, hydrogen peroxide, ethanol, and organic acids (Puerari et al., 2015). Acidity significantly influences the sensory and nutritional characteristics of foods (Paredes et al., 2022). These results align with those reported by Ghosh et al. (2014), who studied the microbiota in Haria, a fermented rice-based beverage, demonstrating an increase in acidity from 0.01 % to 1.42 % at 96 h.

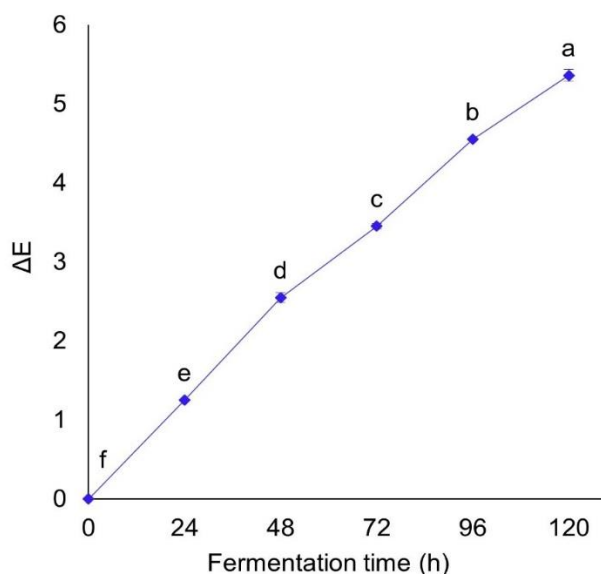
The MC was 43.65 ± 0.01 %, significantly decreasing ($p < 0.05$) to a final value of 39.67 ± 0.08 % (Figure 3,c). However, these changes were deemed insignificant, as the use of cling film as wrapping material reduced the evaporation of water molecules and promoted the growth of LAB. Jiménez-Vera et al. (2010) observed a similar pattern of moisture loss

associated with fermentation time in balls of white pozol and cocoa wrapped in grilled banana leaves. The initial MC and a_w of T1 can be attributed to the soaking of rice. By subjecting rice grains to hydration, they absorb a certain amount of water until reaching equilibrium moisture content, due to the water diffusion mechanism (Balbinoti et al., 2018; Panda & Shrivastava, 2019).

The a_w is a fundamental parameter that determines the amount of water available in the food system, facilitating both microbial growth and biochemical and chemical reactions (Ostrowska-Ligęza & Lenart, 2015). In this context, the initial a_w in T1 was 0.94 ± 0.00 , which was expected for a fresh food product. As the fermentation progressed, water at the molecular level gained greater mobility, causing a significant decrease ($p < 0.05$) in a_w , ultimately reaching 0.93 ± 0.00

(Figure 3,d). The presence of elevated a_w values underscores the importance of maintaining rigorous quality and safety control. This is because most bacteria, molds, and yeasts require high levels of a_w (0.97 - 0.90) for their growth (Tapia et al., 2020).

The total color difference (ΔE) is a measure indicating the magnitude of color difference between two samples (test and control/reference) in the CIELAB three-dimensional color space (Patras et al., 2011). In Figure 4, it can be observed how the ΔE value increased significantly ($p < 0.05$) from 1.24 ± 0.01 to 5.35 ± 0.07 during the fermentation process of T1. This indicates that it is possible to distinguish the color variation at 120 h compared to the initial time, as a $\Delta E > 5$ is visually perceptible (Pathare et al., 2013).



Note: abcd, different superscripts indicate statistically significant differences ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

Figure 4. Total color difference (ΔE) (—•—) in the fermentation of the Popo mass (T1) at 25 °C.

The changes in color in T1 could be primarily associated with the loss of MC during the fermentation process, incubation conditions, and packaging. Costa et al. (2017) indicated that color changes in a probiotic fermented beverage during storage could be related to the degradation of pigments and other constituents due to the metabolic activity of microorganisms involved in the fermentation process. The most significant total color difference ($p < 0.05$) was observed in

luminosity, which ranged from 55.21 ± 0.12 at the initial time to 50.02 ± 0.00 at the end of the fermentation process (data not shown), indicating that T1 gradually acquired a lighter appearance over time.

Conclusion

The fermentation of the Popo dough at 25 °C brought about significant changes in its physicochemical and microbiological characteristics as time progressed. The

community of mesophilic aerobic bacteria, yeasts, and LAB exhibited an efficient utilization of the available nutrients in the dough, highlighting the complex dynamics of the fermentation process. The study revealed an initial yeast count of 4.35 ± 0.01 log CFU/g, with a significant decrease over time. Meanwhile, at 48 h, a logarithmic phase for LAB exceeding 6 log CFU/g was recorded, significantly influencing the decrease in pH and the increase in titratable acidity throughout the process. Visually perceptible color

References

AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). Official Methods of Analysis, 17th Ed. 2003. Washington, DC: USA.

Aslam H, Green J, Jacka FN, Collier F, Berk M, Pasco J, Dawson SL (2020) Fermented foods, the gut and mental health: A mechanistic overview with implications for depression and anxiety. *Nutritional Neuroscience* 23(9): 659-671.
<https://doi.org/10.1080/1028415X.2018.154332>

Axel C, Brosnan B, Zannini E, Furey A, Coffey A, Arendt EK (2016) Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *International Journal of Food Microbiology* 239: 86-94.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006>

Balbinoti TCV, Jorge LM de M, Jorge RMM (2018) Mathematical modeling of paddy (*Oryza sativa*) hydration in different thermal conditions assisted by Raman spectroscopy. *Journal of Cereal Science* 79: 390-398.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.11.019>

Barros C, Buenrostro M (2011) Pozol, Popo, Champurrado: *Revista Digital Universitaria* 12(4).

Castillo-Morales M, Wachter-Rodarte MC, Hernández-Sánchez H (2005) Preliminary studies on chorote – a traditional Mexican fermented product. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(3): 293-296.
<https://doi.org/10.1007/s11274-004-3634-x>

Cheirsilp B, Satansat J, Wanthong K, Chaiyasain R, Rakmai J, Suwannarach N, Kumla J, Pathom-aree W, Wang G,

changes were identified in the masses. Fermentation consistently demonstrated inhibition in the development of coliform microorganisms, transforming the *Popo* dough into a safe option for human consumption, in accordance with the standards established by NOM-147-SSA1-1996. While this study focused on a specific fermentation temperature, it is necessary to explore broader ranges of process variables to achieve a comprehensive understanding of their effects on the beverage's characteristics.

Srinuanpan S (2023) Bioprocess Improvement for fermentation of pigmented Thai glutinous rice-based functional beverage (Sato) with superior antioxidant properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 50: 102701.

Coelho RMD, Almeida ALD, Amaral RQGD, Mota RND, Sousa PHMD (2020) Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 22: 100272.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>

Costa KKFD, Soares Júnior MS, Rosa SIR, Caliaro M, Pimentel TC (2017) Changes of probiotic fermented drink obtained from soy and rice byproducts during cold storage. *LWT – Food Science and Technology* 78: 23-30.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.017>

Enujiugha Victor N, Badejo AA (2017) Probiotic potentials of cereal-based beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(4): 790-804.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.930018>

Ghosh K, Maity C, Adak A, Halder SK, Jana A, Das A, Parua S, Das Mohapatra PK, Pati BR, Mondal KC (2014) Ethnic preparation of *Haria*, a rice-based fermented beverage, in the province of lateritic West Bengal, India. *Ethnobotany Research & Applications* 12: 039-049.

Ghosh K, Ray M, Adak A, Dey P, Halder SK, Das A, Jana A, Parua (Mondal) S, Das Mohapatra PK, Pati BR, Mondal KC (2015) Microbial, saccharifying and antioxidant properties of an Indian rice based fermented beverage. *Food Chemistry* 168: 196-202.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.42>

Giri SS, Sen SS, Saha S, Sukumaran V, Park SC (2018) Use of a potential probiotic, *Lactobacillus plantarum* I7, for the preparation

of a rice-based fermented beverage. *Frontiers in Microbiology* 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00473>

Hernández-Nolasco Z, Acateca-Hernández MI, Márquez-López MA, Flores-Andrade E, Castillo-Morales M (2022) Caracterización fisicoquímica y microbiológica del Popo, una bebida tradicional de la región sureste de México. *Journal CIM*, IQ-454-IQ-460.

Ilango S, Antony U (2021) Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. *Trends in Food Science & Technology* 118: 617-638.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.034>

ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 degrees C.

Jiménez-Vera R, González-Cortés N, Magaña-Contreras A, Corona-Cruz A (2010) Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1(1): 070-080.

Jung JK, Ko SH, Oh SW, Lim JY, Chun TH, Kim S, Myoung KS, Jang SS, Huh CS, Han YS (2015) Fermentation and microbial characteristics of korean traditional fermented milk. *Tarak* 44(4): 602-609.
<https://www.ejkn.org/journal/view.html?spag=602&volume=44&number=4>

Lhomme E, Urien C, Legrand J, Dousset X, Onno B, Sicard D (2016) Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology* 53, 41–50.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.014>.

López-Sánchez R, Hernández-Oaxaca D, Escobar-Zepeda A, Ramos Cerrillo B, López-Munguía A, Segovia L (2023) Analysing the dynamics of the bacterial community in pozol, a Mexican fermented corn dough. *Microbiology* 169(7): 001355.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.001355>

Lv XC, Weng X, Zhang W, Rao PF, Ni L (2012) Microbial diversity of traditional fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine as determined by PCR-mediated DGGE. *Food*

Control 28(2): 426-434.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.025>

Mgomi FC, Yang Y, Cheng G, Yang Z (2023) Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm* 5: 100118.
<https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2023.100118>

Mishra S, Mithul Aravind S, Charpe P, Ajlouni S, Ranadheera CS, Chakkaravarthi S (2022) Traditional rice-based fermented products: Insight into their probiotic diversity and probable health benefits. *Food Bioscience* 50: 102082.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102082>

Miyagawa H, Suzuki E, Kosakai T, Kawano K, Iwai K, Takase Y (2016) Isolation of lactic acid bacteria from sweet potato shochu mash and their influence on shochu quality. *Journal of the brewing society of Japan* 111(6): 405-411.
<https://doi.org/10.6013/jbrewsocjapan.111.45>

NOM-092-SSA1-1994. NORMA OFICIAL MEXICANA BIENES Y SERVICIOS. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-111-SSA1-1994. NORMA OFICIAL MEXICANA BIENES Y SERVICIOS. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-113-SSA1-1994. NORMA OFICIAL MEXICANA BIENES Y SERVICIOS. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NOM-147-SSA1-1996. NORMA OFICIAL MEXICANA BIENES Y SERVICIOS. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas o sus mezclas y productos de panificación. Omemu AM, Oyewole OB, Bankole MO (2007) Significance of yeasts in the fermentation of maize for ogi production. *Food Microbiology* 24(6):571-576.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.006>

Ostrowska-Ligęza E, Lenart A (2015) Influence of water activity on the compressibility and mechanical properties of cocoa products. *LWT - Food Science and Technology* 60(2): 1054-1060.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.040>

Panda BK, Shrivastava SL (2019) Microwave assisted rapid hydration in starch matrix of

- paddy (*Oryza sativa* L.): Process development, characterization, and comparison with conventional practice. *Food Hydrocolloids* 92: 240-249.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.066>
- Paredes JL, Escudero-Gilete ML, Vicario IM (2022) A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. *LWT - Food Science and Technology* 154: 112728.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112728>
- Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ (2013) Color measurement and analysis in fresh and processed foods: A review. *Food and Bioprocess Technology* 6(1): 36–60.
<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Patras A, Brunton NP, Tiwari BK, Butler F (2011) Stability and degradation kinetics of bioactive compounds and color in strawberry jam during storage. *Food and Bioprocess Technology* 4(7): 1245–1252.
<https://doi.org/10.1007/s11947-009-0226-7>
- Piló FB, Carvajal-Barriga EJ, Guamán-Burneo MC, Portero-Barahona P, Dias AMM, Freitas LFDD, Gomes FDCO, Rosa CA (2018) *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (Chicha) of Ecuador. *Brazilian Journal of Microbiology* 49(4): 808-815.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.002>
- Pswarayi F, Gänzle MG (2019) Composition and origin of the fermentation microbiota of mahewu, a zimbabwean fermented cereal beverage. *Applied and Environmental Microbiology* 85(11): e03130-18.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03130-18>
- Puerari C, Magalhães-Guedes KT, Schwan RF (2015) Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. *Food Microbiology* 46: 210-217.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.009>
- Rakmai J, Cheirsilp B, Srinuanpan S (2019) Designation of rice cake starters for fermented rice products with desired characteristics and fast fermentation. *Journal of Food Science and Technology* 56(6): 3014-3022.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03784-9>
- Robledo-Márquez K, Ramírez V, González-Córdova AF, Ramírez-Rodríguez Y, García-Ortega L, Trujillo J (2021) Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico: Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food Research International* 147: 110482.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>
- Rubio-Castillo ÁE, Santiago-López L, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A, Sáyago-Ayerdi S G, González-Córdova AF (2021) Traditional non-distilled fermented beverages from Mexico to based on maize: An approach to Tejuino beverage. *International Journal of Gastronomy and Food Science* 23: 100283.
<https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100283>
- Sanni AI, Adesulu AT (2013) Microbiological and physico-chemical changes during fermentation of maize for masa production. *African Journal of Microbiology Research* 7(34): 4355-4362.
<https://doi.org/10.5897/AJMR12.1362>
- Silva CFGD, Santos FL, Santana LRRD, Silva MVL, Conceição TDA (2018) Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. *Food Science and Technology* 38(3): 543-550.
<https://doi.org/10.1590/1678-457x.10617>
- Tapia MS, Alzamora SM, Chirife J (2020) Effects of water activity (aw) on microbial stability as a hurdle in food preservation. Barbosa-Cánovas GV, Fontana AJ, Schmidt SJ, Labuza TP (Eds). *Water Activity in Foods 1a ed.*, Wiley. 323-355.
<https://doi.org/10.1002/9781118765982.ch14>
- Teniola OD, Odunfa SA (2001) The effects of processing methods on the levels of lysine, methionine and the general acceptability of ogi processed using starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 63(1-2): 1-9.
[https://doi.org/10.1016/S01681605\(00\)00321-4](https://doi.org/10.1016/S01681605(00)00321-4)



www.smbb.com.mx