



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

Romero Viscarra, Andrea Cristina

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención de título de Ingeniera en Biotecnología

M. Sc. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

10 de marzo del 2022



Romero\_UIC Copyleaks.docx

Scanned on: 14:46 April 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	67
Words with Minor Changes	14
Paraphrased Words	114
Omitted Words	0



Escanea el código QR para más información  
SAFAEL EDUARDO  
VARGAS VERDESOTO



Website | Education | Businesses



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha en bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*" fue realizado por la señorita Romero Viscarra, Andrea Cristina, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022



Firmado electrónicamente por:  
RAFAEL EDUARDO  
VARGAS VERDESOTO

Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

C. C. 1708200538



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura  
Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Romero Viscarra, Andrea Cristina**, con cédula de ciudadanía n° 1727735829, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular **Título: Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha en bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Romero Viscarra, Andrea Cristina

C.C.: 1727735829



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo Romero Viscarra, Andrea Cristina, con cédula de ciudadanía n° 1727735829, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular:  
**Título: Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha en bacterias de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* spp.** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de marzo de 2022

Romero Viscarra, Andrea Cristina

C.C.: 1727735829

## DEDICATORIA

A mis abuelos Bolívar e Inés, por su amor incondicional, su apoyo, consejos y aliento cada día, por ser las primeras personas en enseñarme e impulsarme a aprender más cosas sobre la naturaleza.

A mis padres, que con su esfuerzo y cariño me impulsaron a cumplir este sueño, por confiar en mí, apoyarme en cada decisión y brindarme tantos consejos que me han permitido ser quien soy ahora.

A María Inés y Xavier, mis hermanos, quienes a lo largo de este proyecto y toda la vida han estado junto a mí en aquellos momentos difíciles, haciéndome sonreír y distrayéndome cuando estaba cansada.

A mi familia, a aquellos con los que he compartido toda mi vida, cada día estuvieron pendientes de mí y de cualquier cosa que necesitaba, por todas sus enseñanzas y afecto siempre.

A mis amigos, un gran apoyo emocional durante toda mi vida universitaria, con quienes compartí risas, lágrimas, nervios, estrés, pero sobre todo ser una de las razones para esforzarme mucho más. A mi mejor amiga por estar en todo momento, desde primer semestre aconsejándonos, ayudándonos y buscando una solución a los problemas.

A esas siete personas al otro lado del mundo, que con su música me inspiraron cada día, me dieron la fuerza para seguir y ser una de las razones de mi felicidad, me enseñaron que cada sueño es diferente y que el momento más oscuro es justo antes del amanecer.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE por abrirme sus puertas hace tanto tiempo atrás desde primer semestre y permitirme realizar todo este trabajo en sus instalaciones.

A mi tutor de trabajo de integración curricular M. Sc. Rafael Vargas, gracias por su apoyo, paciencia y enseñanza durante todo el proyecto, su acompañamiento y motivación en cada etapa fueron importantes para la correcta realización de este escrito.

Agradezco a todos los docentes del departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura, a la directora de carrera M. Sc. Karina Ponce, quienes con sus conocimientos, sabiduría y enseñanza me permitieron formar mi perfil profesional cada día.

Gracias a mi familia por su ayuda incondicional en la realización de este proyecto, por estar pendientes siempre y ser mi pilar fundamental.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	1
DEDICATORIA .....	6
AGRADECIMIENTOS.....	7
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	8
Índice de Tablas.....	11
Índice de Figuras .....	12
Resumen.....	13
Abstract .....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Antecedentes .....	15
Justificación e Importancia.....	16
Objetivos del trabajo de titulación.....	18
Objetivo general .....	18
Objetivos específicos.....	18
Hipótesis.....	18
Capítulo II: Marco referencial .....	20
<i>Camellia sinensis</i> (L.).....	20
Té verde.....	21
Té negro.....	21
Kombucha .....	22
Definición.....	22

Preparación y fermentación .....	23
Composición .....	23
Beneficios .....	23
Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	24
Difusión en disco .....	24
Macrodilución en caldo.....	25
Técnica Drop plate .....	25
Microorganismos utilizados en el estudio.....	25
<i>Escherichia coli</i> .....	25
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
<i>Pseudomonas spp</i> .....	26
Capítulo III: Metodología.....	27
Cultivo iniciador de Kombucha .....	27
Preparación de té de kombucha con té verde y té negro .....	27
Toma de muestras .....	27
Medición de pH y sólidos solubles totales.....	28
Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	28
Diseño Experimental .....	30
Capítulo IV: Resultados .....	32
Fermentación de la kombucha.....	32
pH y sólidos solubles totales.....	33

	10
Actividad antimicrobiana .....	37
Difusión en disco .....	37
Macrodilución en caldo.....	39
Técnica Drop plate .....	41
Capítulo V: Discusión .....	49
Capítulo VI: Conclusiones .....	54
Capítulo VII: Recomendaciones .....	55
Referencias.....	56
Apéndices .....	68

## Índice de Tablas

Tabla 1 pH y sólidos solubles totales medidos a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de fermentación.....	33
Tabla 2 ANOVA indicando la interacción entre las kombuchas y tiempo de fermentación en los valores de pH.....	36
Tabla 3 ANOVA indicando la interacción entre la kombucha y tiempo de fermentación en los valores de sólidos solubles totales.....	37
Tabla 4 Diámetros de la zona de inhibición con el método de difusión en disco.....	38
Tabla 5 Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración bactericida mínima (CBM) en $\mu\text{L}/\text{mL}$ de la kombucha de té verde y kombucha de té negro frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas</i> spp. ....	46

## Índice de Figuras

Figura 1 Tipos de té y formas de producción a partir de <i>C. sinensis</i> .....	21
Figura 2 Tubos para la macrodilución en caldo .....	29
Figura 3 Aspecto de la kombucha de té verde y té negro en los días de fermentación .	32
Figura 4 Variación de pH con respecto a los días de fermentación .....	34
Figura 5 Variación de los sólidos solubles totales medidos en función de los grados Brix (%) con respecto a los días de fermentación.....	35
Figura 6 Difusión en disco, resultados en <i>E. coli</i> .....	39
Figura 7 Macrodilución en caldo para <i>Pseudomonas spp</i> .....	40
Figura 8 Técnica Drop Plate colonias blancas formadas en MSA .....	41
Figura 9 Técnica Drop Plate para el día 0 de fermentación .....	42
Figura 10 Técnica Drop plate para el día 7 de fermentación.....	43
Figura 11 Técnica Drop plate para el día 14 de fermentación .....	44
Figura 12 Técnica Drop Plate para el día 21 de fermentación .....	45
Figura 13 Técnica Drop Plate para el día 28 de fermentación .....	46
Figura 14 Concentración bactericida mínima en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada tipo de kombucha .....	47
Figura 15 Concentración mínima inhibitoria en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada tipo de kombucha.....	47

## Resumen

La kombucha es una bebida obtenida por fermentación de té con endulzante y un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras que se conoce como SCOBY. En este estudio, la bebida fue preparada a partir de infusiones de té verde y té negro, dejando fermentar por 28 días. Se realizó un análisis químico (pH y sólidos solubles totales) y de la actividad antimicrobiana a lo largo del tiempo de fermentación, frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp. por los métodos de difusión en disco, macrodilución en caldo y la técnica Drop plate. La kombucha de té verde tuvo un limitado efecto antimicrobiano desde el día 14, siendo la bacteria más susceptible *Pseudomonas* spp con una Concentración Bactericida Mínima (CBM) igual a 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en los días 14 y 21, mientras que al día 28 una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , concentración más baja que la de la kombucha de té negro (125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), la kombucha de té verde fue la única que produjo una CMI de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  al día 28 en *E. coli*. Estos resultados indican que la kombucha de té verde tiene un efecto antimicrobiano mayor en *Pseudomonas* spp. desde el día 14 de fermentación comparada con la kombucha de té negro, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

*Palabras clave:* fermentación, actividad antimicrobiana, té verde, té negro.

### Abstract

Kombucha is a beverage obtained by fermenting tea with sweetener and a symbiotic consortium of bacteria and yeasts known as SCOBY. In this study, the drink was prepared from infusions of green tea and black tea, left to ferment for 28 days. A chemical analysis (pH and total soluble solids) and antimicrobial activity were performed throughout the fermentation time, against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas* spp. by disk diffusion methods, macrodilution in broth and the Drop plate technique. Green tea kombucha had a limited antimicrobial effect from day 14, being the most susceptible bacteria *Pseudomonas* spp with a MBC equal to 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  on days 14 and 21, while on day 28 a MIC of 62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , lower concentration than black tea kombucha (125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), green tea kombucha was the only one that produced an MIC of 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  at day 28 in *E. coli*. These results indicate that green tea kombucha has a greater antimicrobial effect on *Pseudomonas* spp. from day 14 of fermentation compared to black tea kombucha, but this difference is not statistically significant.

*Keywords:* fermentation, antimicrobial activity, green tea, black tea.

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

En el mundo actual se ha visto un aumento significativo en cuanto a fermentaciones y los denominados alimentos funcionales, ya que existe una mayor inclinación de los consumidores por productos naturales sin un excesivo procesamiento y que confieran beneficios a la salud (Mousavi *et al.*, 2020). Uno de estos productos es la kombucha, se define como una bebida obtenida por fermentación de té con endulzante y un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) (Ivanišová *et al.*, 2020); compuesta por dos fases, una líquida ácida que se conforma principalmente por ácido acético, ácido láctico y ácido glucónico (Villarreal *et al.*, 2018) y un biofilm compuesto mayormente por bacterias del ácido acético (AAB) del género *Gluconacetobacter* con los oligotipos *G. saccharivorans* y *G. xylinus* (De Filippis *et al.*, 2018), *Komagataeibacter rhaeticus*, *Acetobacter* spp., *Lactobacillus* spp. (Gaggia *et al.*, 2019) y levaduras como *Brettanomyces bruxellensis*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Zygosaccharomyces bailii* (Villarreal *et al.*, 2020).

La kombucha se conoce por ser un producto ancestral dada su evidencia desde la dinastía Tsin originaria de China, luego siendo difundida en toda Asia, con evidencia de que un médico llamado Kombu llevó el hongo a Japón por orden del emperador con el objetivo de tratar una afección estomacal (Antolak *et al.*, 2021).

Al ser una bebida fermentada produce diversas sustancias que le confieren propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y de regulación de la actividad gastrointestinal (Kapp & Sumner, 2019). Su actividad antimicrobiana ha sido estudiada a lo largo de los años, demostrando la actividad antimicrobiana de la kombucha en bacterias Gram positivas y Gram negativas como por ejemplo *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, entre las principales (Greenwalt *et al.*, 1998), luego Battikk *et al.* (2013) determinó que la kombucha

de té verde inhibía a bacterias como *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Siguiendo en esta misma línea de investigación se demostró que la kombucha podía inhibir a las bacterias patogénicas *E. coli*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella Typhi* (Kaewkod *et al.*, 2019). Llegando a la actualidad con el estudio de (Al-Mohammadi *et al.*, 2021) que evidenció que la mayor actividad antimicrobiana de la kombucha se presenta en *S. aureus* y *E. coli*.

La tendencia a consumir productos naturales ha ido en incremento gracias a los estudios realizados siendo más evidente desde el año 2019 y llegando a 2021 con ventas de \$112.75 millones, proyectando una tasa de crecimiento del 25.6% para 2026 (Market Data Forecast, 2021).

### **Justificación e Importancia**

El aumento en la incidencia de infecciones en la piel causadas por bacterias en heridas abiertas es una de las afecciones más comunes en el ser humano (Eckmann & Dryden, 2010), muchas de ellas siendo catalogadas como infecciones nosocomiales (NIs) es decir, infecciones producidas después de hasta 72 horas del ingreso o salida del hospital (Lemiech *et al.*, 2021), llegando a ser la sexta causa de muerte en los Estados Unidos (Liu & Dickter, 2020). Estas infecciones se ven agravadas por la gran cantidad de bacterias resistentes a antibióticos, siendo que las bacterias causantes de infecciones más comúnmente encontradas son *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella Pneumoniae* y *S. typhi* (Oli *et al.*, 2017). Por ello es que ahora con la finalidad de reducir este tipo de infecciones y mejorar la salud se ha investigado varios productos naturales que tengan actividad antimicrobiana, resaltando este efecto en productos fermentativos incluidos en la alimentación diaria, uno de ellos la kombucha que tiene esta actividad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas gracias a la presencia de varios componentes orgánicos como el ácido acético que es un inhibidor bacteriano (Coelho *et al.*, 2020).

*E. coli* está asociada con las infecciones en la piel y tejidos blandos (SSTIs) que pueden llegar a cuadros graves que requieren hospitalización y el tratamiento con antibióticos, representando un 10% de los casos de sepsis que pueden ser mortales (Ranjan *et al.*, 2017). Estas infecciones se producen por la *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), caracterizadas por ser resistentes a una amplia gama de antibióticos y propagándose en todo el mundo, siendo el clon ST131 uno de los ejemplos más conocidos (Nicolas *et al.*, 2014). Esta bacteria es de alta preocupación ya que es la causante de fascitis necrotizante, infecciones en heridas por quemaduras y por intervenciones quirúrgicas (Petkovšek *et al.*, 2009) y que debido a la resistencia bacteriana se vuelven complicadas de tratar.

En el caso de *S. aureus* es uno de los organismos mayormente causantes de SSTIs como el impétigo, abscesos subcutáneos y la infección de úlceras (Krishna & Miller, 2012), transmitiéndose por la presencia de la bacteria en portadores sanos que al no tener una adecuada higiene infectan a pacientes con los que entran en contacto (Liu & Dickter, 2020). Estas infecciones son un problema para la salud pública debido a su incremento y por la aparición de cepas resistentes, un ejemplo, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y a vancomicina (VRSA), por ello su tratamiento se ha vuelto mucho más complicado y se ha buscado nuevas alternativas al uso de antibióticos (Sangboonruang *et al.*, 2021).

*Pseudomonas* spp. de igual manera son causantes de una gran cantidad de infecciones en todo el cuerpo humano, denotando que al ser un microorganismo oportunista ataca con mayor facilidad en heridas y quemaduras (Paulsson *et al.*, 2019). Wu *et al.* (2011) menciona que *P. aeruginosa* es la causante de infecciones cutáneas tanto superficiales como profundas como la celulitis gangrenosa y fascitis necrotizante en pacientes sanos e inmunocomprometidos, en los últimos con una tasa de mortalidad alta a causa de la resistencia propia o desarrollada de las cepas ambientales a muchos de los antibióticos e inclusive a diferentes desinfectantes (Zhong & He, 2019).

En América Latina los patógenos predominantes resistentes a antibióticos son *P. aeruginosa* (24.7%), *E. coli* (15.1%) y *S. aureus* (29.4%) (Moet *et al.*, 2007), siendo de relevancia debido a su alta recurrencia a causa de factores como la falta de sanidad, el fácil acceso a antibióticos y el deficiente sistema de salud (Bonelli *et al.*, 2014). Es así como se reconoce la implicación de estas tres bacterias en la salud pública y la importancia de encontrar alternativas al uso de antibióticos o que reduzcan un poco su administración.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de la kombucha de té verde y la kombucha de té negro frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* spp. con la finalidad de dar impulsos al involucramiento de productos naturales, por ejemplo, la kombucha, para contrarrestar ciertas enfermedades que afectan la salud humana como son las infecciones bacterianas.

## **Objetivos del trabajo de titulación**

### ***Objetivo general***

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

### ***Objetivos específicos***

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

## **Hipótesis**

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

## Capítulo II: Marco referencial

### ***Camellia sinensis* (L.)**

*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, 1887 es un arbusto perteneciente a la familia Theaceae, originario de China, conocido porque sus hojas y flores se utilizan en la obtención de té verde, té negro, té blanco y té de oolong, entre los principales, cada uno de ellos como resultado de la forma de procesamiento (Bortolini *et al.*, 2021) (Figura 1). Desde su origen ha ido incrementando su popularidad, volviéndose la segunda bebida más consumida en el mundo solo sobrepasada por el agua (Khan & Mukhtar, 2019).

Entre sus principales componentes se encuentran polifenoles, ácidos como el ácido gálico, p-cumárico, ácido ferúlico, teobromina que es un alcaloide perteneciente a las metilxantinas (Azevedo *et al.*, 2019), además de vitaminas; todos estos le confieren diversas propiedades para controlar o disminuir enfermedades cardiovasculares, la diabetes, protección del hígado y de enfermedades degenerativas (Chen *et al.*, 2020). Estos componentes suelen verse afectados por diferentes condiciones como el tipo de suelo, clima, luz, forma de procesamiento, región y técnicas de cosecha (Musial *et al.*, 2020).

Figura 1

Tipos de té y formas de producción a partir de *C. sinensis*.



*Nota.* Adaptado de Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview, por Bortolini *et al.*, 2021, *Food Chemistry: X*, 12, 100160.

### Té verde

El té verde se obtiene de las hojas maduras sometidas a vapor de *C. sinensis* y sin pasar por fermentación, componiéndose en su mayoría por catequinas, teanina y cafeína (Mancini *et al.*, 2017). Entre sus beneficios, se encuentran el ser un antiinflamatorio, anticancerígeno al controlar la proliferación celular, antioxidante y ayudar a enfermedades como la diabetes y la obesidad ya que estimula la liberación de insulina e inhibir a enzimas digestivas (Reygaert, 2018).

Ohishi *et al.* (2016) indica que la actividad antiinflamatoria se debe a que las catequinas eliminan las especies reactivas del oxígeno (ROS) que son las que activan a NF-κB, este a su vez regula a citoquinas y enzimas pro inflamatorias como TNF-, IL-1 y MMPs.

### Té negro

El té negro se obtiene de las hojas marchitas, trituradas y secadas de *C. sinensis*, sometidas a un proceso de oxidación enzimática que se conoce como la etapa de

fermentación, con esto las catequinas se oxidan para formar compuestos como teasinensinas, teaflavinas y teacitrinas, haciendo que la cantidad de catequinas sea menor frente al té verde y esto ocasione variaciones en su actividad biológica (Tanaka & Matsuo, 2020).

De acuerdo a Sharma & Rao (2009) el té negro se compone principalmente de teaflavinas, tearubiginas, catequinas, cafeína, quercetina y kaempferol. Se destacan propiedades como la antioxidante, antibacteriana y anticancerígena al ser que las teaflavinas inducen la apoptosis de las células cancerígenas al hacer que la membrana mitocondrial sea más permeable (Zhang *et al.*, 2019), implicado también en la reducción de peso al inhibir la absorción y acumulación de lípidos, al ser que promueve el metabolismo aumentando la actividad de la proteína quinasa activada por AMP, siendo que los polifenoles de este tipo de té son más eficaces que los de té verde en cuanto a esta última propiedad (Pan *et al.*, 2016).

## **Kombucha**

### ***Definición***

La kombucha se define como una bebida de fermentación a partir de diferentes tipos de té junto con un endulzante y un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY) que se forma en la superficie del líquido una vez avanzan los días de fermentación (Coton *et al.*, 2017).

En ella se pueden encontrar una gran diversidad de levaduras y bacterias, predominando las AAB y las bacterias del ácido láctico (LAB) (Yang *et al.*, 2010). Entre las más predominantes se encuentran las del género *Komagataeibacter* como *K. rhaeticus* (Arikan *et al.*, 2020) y de otros géneros como *Acetobacter*, *Lactobacillus* y *Gluconacetobacter* (Marsh *et al.*, 2014) y levaduras del género *Schizosaccharomyces* (*Schizosaccharomyces pombe*), y las especies *Saccharomyces ludwigii* y *Candida* spp., entre las más comunes (Sun *et al.*, 2015).

### **Preparación y fermentación**

El proceso común que se sigue para elaborar la kombucha consiste en la preparación de una infusión de té con la adición de azúcar, transfiriendo el líquido a un recipiente de vidrio y dejando enfriar hasta llegar a aproximadamente 20°C y colocando el SCOBY extendido en la superficie, siempre tomando en cuenta la utilización de utensilios limpios, por último se sella con una tela o papel permitiendo el ingreso de aire y para su fermentación se deja a temperatura ambiente entre 3 hasta un máximo de 60 días (Martínez *et al.*, 2018).

### **Composición**

Gracias al proceso de fermentación la kombucha se caracteriza por tener varios compuestos bioactivos que le dan características beneficiosas en la salud humana. Entre ellos se destacan los compuestos fenólicos como el galato de epigallocatequina (EGCG), galocatequina (GC), epigallocatequina (EGC), por mencionar algunos de ellos (Velićanski *et al.*, 2014). Aminoácidos y ácidos orgánicos, por ejemplo, el ácido glucónico, ácido acético, ácido glucurónico, ácido láctico (Antolak *et al.*, 2021). Vitaminas siendo las más importantes la A, B, C y E (Jakubczyk *et al.*, 2020), elementos esenciales, principalmente Zinc, Manganeseo y Hierro (de Miranda *et al.*, 2022).

### **Beneficios**

Los componentes que tiene esta bebida le han hecho ser reconocida como un alimento funcional, teniendo un efecto positivo en la regulación gastrointestinal y de presión arterial, una actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria y hepatoprotectora (Dutta & Paul, 2019).

Estudios en modelos animales diabéticos indican que la kombucha inhibe a la  $\alpha$ -amilasa en el páncreas, además de otras enzimas, disminuyendo los niveles de glucosa en sangre además de retrasar la absorción de LDL y aumentar el HDL y protegiendo de daños al hígado y riñones (Aloulou *et al.*, 2012).

La kombucha mejora la salud debido a su capacidad de desintoxicación, aumento en la inmunidad, aumento de energía y antioxidación, estas propiedades siendo aumentadas por el ácido glucurónico que tiene la capacidad de conjugarse con metabolitos tóxicos haciéndolos más solubles y se facilite su eliminación, esta capacidad de transformación se ve disminuida con la edad y falta de vitaminas, por lo que el consumo de kombucha es importante para mantener la salud conforme el paso del tiempo (Vina *et al.*, 2014)

También se ha probado su efecto anticancerígeno en líneas celulares, determinando que la kombucha lograba reducir las células de cáncer de próstata viables a través de alteraciones en la angiogénesis (Srihari *et al.*, 2013). De esta manera considerando a la kombucha como una posible sustancia que podría usarse en el tratamiento del cáncer.

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana**

Las pruebas de detección de la susceptibilidad antimicrobiana son diversas al ser utilizadas para la investigación de nuevos antimicrobianos, entre las más comúnmente usadas se encuentran las pruebas de dilución en caldo dividiéndose en macrodilución y microdilución, el método del gradiente antimicrobiano o conocido como E-test que ocupa tiras impregnadas con diferentes concentraciones del antimicrobiano, la prueba de difusión en disco y métodos automatizados basados en la turbidez (Reller *et al.*, 2009). En este estudio se utilizó el método de difusión en disco y macrodilución en caldo junto con el conteo de este método por la técnica Drop plate.

### ***Difusión en disco***

Esta prueba se basa en el cultivo de un microorganismo en una placa con agar en la que se colocan discos de papel filtro de 6 mm impregnados con el antimicrobiano, relacionando la concentración necesaria del antimicrobiano para inhibir a una bacteria u hongo al evidenciarse la formación de un halo de inhibición en la superficie del agar medido en milímetros (Ramírez &

Castaño, 2009). Tiene como ventajas el ser de bajo costo, poder usar una gran cantidad de antimicrobianos y analizar varios microorganismos, pero como desventajas está la variabilidad de los resultados dependiendo de la forma de medición de las zonas de inhibición (Nijs *et al.*, 2003).

### **Macrodilución en caldo**

La macrodilución en caldo es una de las pruebas para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) basada en la preparación de diluciones del agente antimicrobiano en caldo, y agregando un inóculo bacteriano, teniendo mínimo 1 mL como volumen final en cada tubo, pasado el tiempo de incubación se lee la CIM con observación simple de acuerdo a la turbidez, cuando el organismo se ha inhibido completamente la turbidez es mínima (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2018a).

### **Técnica Drop plate**

Esta técnica de recuento bacteriano es una de las más rápidas y sencillas, requiriendo solamente placas sembradas con agar en las que se dispensan gotas de 10 a 30  $\mu\text{L}$  de las diluciones previamente obtenidas, dejando incubar de forma invertida y contando las colonias formadas para luego reportar el resultado en UFC/mL (Naghili *et al.*, 2013).

### **Microorganismos utilizados en el estudio**

Las cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp. se obtuvieron del cepario del Área de Microbiología del Laboratorio de Enzimología del CICTE, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Sangolquí, Ecuador.

### ***Escherichia coli***

Bacilo de la familia *Enterobacteriaceae* que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente y humanos, clasificadas en aquellas inocuas y

patógenas causantes de una gran cantidad de enfermedades, transmitida por la contaminación de alimentos y la ingesta de agua sin tratamiento previo (Jang *et al.*, 2017).

Es una bacteria Gram-negativa, aeróbica facultativa, oxidasa-negativa, con cepas tanto no fermentadoras como fermentadoras de lactosa, estas últimas formando colonias rosadas en medio selectivo (Croxen *et al.*, 2013).

### ***Staphylococcus aureus***

Bacteria Gram-positiva, parte de la familia *Staphylococcaceae*, encontrada generalmente en la piel y en la nasofaringe del humano, transmitida de una persona a otra, de animales a humanos o por la contaminación de alimentos, y conocida por causar infecciones nosocomiales (Pasachova *et al.*, 2019). Entre sus características se encuentra el ser catalasa y coagulasa positivo, anaerobia facultativa y bajo microscopio observadas como esferas ordenadas en pares o racimos y su nombre siendo a causa de la coloración amarilla de las colonias en medios diferenciales altamente nutritivos (Gnanamani *et al.*, 2017).

### ***Pseudomonas spp.***

Son bacterias Gram-negativas pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae*, conocidas por ser patógenos oportunistas causantes de varios tipos de infecciones principalmente en personas inmunocomprometidas (Branski *et al.*, 2009). Presentan forma de bacilos ligeramente curvados ordenados en pares, se puede aislar en agar MacConkey, se encuentran naturalmente en materia orgánica en descomposición, suelos y agua, además de ambientes hospitalarios en diferentes superficies, instrumentos y alimentos considerándose como una bacteria patógena; para identificarla, por ejemplo, *P. aeruginosa* forma colonias verdes (Murray *et al.*, 2016).

## Capítulo III: Metodología

### Cultivo iniciador de Kombucha

El té utilizado en la preparación fue té verde y negro de una marca comercial. El cultivo madre de té de kombucha fue de una marca comercial, del cual se tomó el SCOBY y una cierta cantidad de líquido nombrado como té iniciador para una primera preparación, la cual fue utilizada posteriormente para la elaboración de la kombucha a ser utilizada en este estudio.

### Preparación de té de kombucha con té verde y té negro

La kombucha fue preparada con bolsas de dos tipos diferentes de té, té verde y té negro. En base a la preparación de Cardoso *et al.* (2020), se hirvió 1200 mL de agua y se añadió 60 g azúcar blanca, una vez diluida el azúcar se colocó una bolsa de té manteniéndola por 5 minutos, se retiró la bolsa de té y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. En 5 botellas de vidrio previamente lavadas con agua hervida se dispensó 200 mL del té preparado en cada una y se adicionó 20 mL del té iniciador, por último, se colocó 6 g de SCOBY procurando que quedara extendido en toda la superficie del líquido, se cubrió el recipiente con papel toalla y se ajustó con una liga, dejando fermentar a temperatura ambiente durante 28 días, de los cuales se tomaron muestras a los 0, 7, 14, 21 y 28 días para su respectivo análisis químico y antimicrobiano. Para los controles negativos se colocó 200 mL de té verde y té negro en dos botellas y se mantuvieron cerradas hasta la realización de los ensayos.

### Toma de muestras

Para cada uno de los días establecidos, la kombucha fue filtrada con papel Whatman (Cardoso *et al.*, 2020) colocando el líquido resultante en un recipiente estéril para proceder con el análisis químico y antimicrobiano.

### **Medición de pH y sólidos solubles totales**

La determinación de pH se realizó con un potenciómetro, colocando una alícuota de la kombucha sin filtrar en un recipiente cubriendo todo el electrodo con el líquido, se tomaron cuatro mediciones. Los sólidos solubles totales fueron medidos por medio de un conductímetro o brixómetro, colocando una gota de cada kombucha en el prisma y observando la escala en porcentaje marcada por el lente, de igual manera con cuatro mediciones.

### **Evaluación de la actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de la kombucha fue evaluada en base al método de difusión en disco, macrodilución en caldo y Drop plate para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Para los dos métodos, los inóculos bacterianos fueron preparados incubando 24 h antes a *E. coli* y *Pseudomonas* spp. en medio TSI y *S. aureus* en medio BHI, de las cuales se tomó con un hisopo estéril un inóculo para suspenderlo en un tubo con 9 mL de agua destilada estéril hasta llegar a tener una turbidez ajustada a una escala McFarland de 0.5 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) (CLSI, 2012).

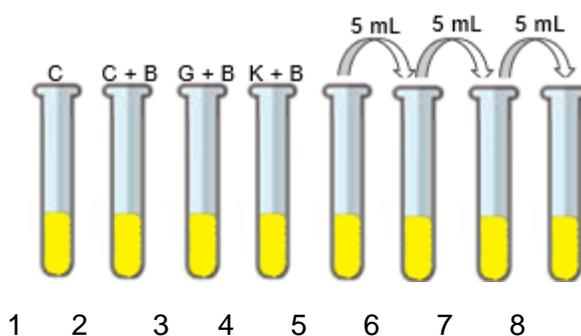
En el método de difusión en disco, las bacterias fueron sembradas en medio agar Mueller-Hinton (MHA), sumergiendo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana con un McFarland de 0.5, girándolo y luego presionando en la pared donde no había líquido para eliminar el exceso, este hisopo fue pasado por toda la superficie del agar en la caja Petri realizando giros tanto del hisopo como de la caja para que no quede ningún lugar sin inóculo, se dejó hasta 15 minutos para disminuir el exceso de humedad (CLSI, 2012), discos de papel filtro de 6mm impregnados con 10  $\mu$ L de kombucha y con los controles negativos fueron colocados en cada caja Petri, en total fueron 5 discos, el primero con la kombucha de té verde, el segundo con la kombucha de té negro, el tercero con una infusión de té verde, el cuarto con

la infusión de té negro y el quinto con gentamicina en concentración de 1 µg/mL (Kaewkod *et al.*, 2019), se realizaron cuatro réplicas con cada una de las bacterias. Los resultados se leyeron a las 18 horas de incubación con la caja invertida, midiendo con una regla el diámetro de la zona de inhibición y reportando en milímetros (CLSI, 2012).

En el método de macrodilución en caldo, las diluciones seriadas fueron preparadas en tubos de ensayo colocando 2.5 mL de caldo nutriente junto con 5 mL de kombucha, luego tomando 5 mL de este tubo y colocándolo en el siguiente tubo que tenía 2.5 mL de caldo nutriente y así sucesivamente hasta tener 4 diluciones, todos los tubos fueron inoculados con 2.5 mL del cultivo bacteriano; como control negativo se tenían 2.5 mL de gentamicina con 2.5 mL de la bacteria y como control positivo un tubo con 2.5 mL de caldo nutriente y 2.5 mL del cultivo bacteriano, para la medición de la CMI se dejó incubar por 18h (Cardoso *et al.*, 2020). Los resultados se obtuvieron por medio de observación simple con la vista comparando con el control positivo.

## Figura 2

*Tubos para la macrodilución en caldo.*



*Nota.* Caldo nutriente – C. Caldo nutriente y bacteria – C + B. Gentamicina y bacteria – G + B. Kombucha y bacteria – K + B.

En la Figura 2, se encuentra la forma en la que se ordenaron los tubos de ensayo para la realización de la prueba, los tubos 5, 6, 7 y 8 fueron las diluciones de la kombucha, correspondientes a 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16, que para la CMB y CMI se expresaron como 500, 250, 125 y 62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , la kombucha sin diluir correspondió a 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

En la técnica Drop plate se utilizó dos medios de cultivo para las tres bacterias, *E. coli* y *Pseudomonas spp.* en medio MacConkey Lactosa (MKL) y *S. aureus* en Agar Manitol Salado (MSA), cada caja Petri fue dividida en ocho cuadrantes destinados a cada uno de los tubos provenientes de la macrodilución en caldo. Se tomó uno de los tubos, se agitó y con una micropipeta se recogió 10  $\mu\text{L}$  que fueron dispensados para formar gotas en cada uno de los cuadrantes de la caja Petri, se dejó secar por 10 minutos (Herigstad *et al.*, 2001) y dejando la caja Petri invertida para incubar hasta 18 h.

En aquellos cuadrantes en los que se pudo contar las colonias se reportó el resultado en UFC/mL con la siguiente fórmula (Whitmire & Merrell, 2012).

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

## Diseño Experimental

El diseño experimental y análisis estadístico fue realizado en el software InfoStat, planteando un diseño experimental comparativo simple en el tiempo. Como unidades experimentales se tomaron a la kombucha de té verde y la kombucha de té negro a los diferentes tiempos de fermentación (0, 7, 14, 21 y 28 días). Las variables de respuesta para el análisis químico fueron los valores de pH y sólidos solubles totales en porcentaje, para la evaluación antimicrobiana los diámetros de la zona de inhibición en mm y la CMI y CBM en  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) igual a 0.05 y utilizando el test de Duncan para la evaluación de las variables de respuesta con la finalidad de determinar la existencia de diferencias significativas.

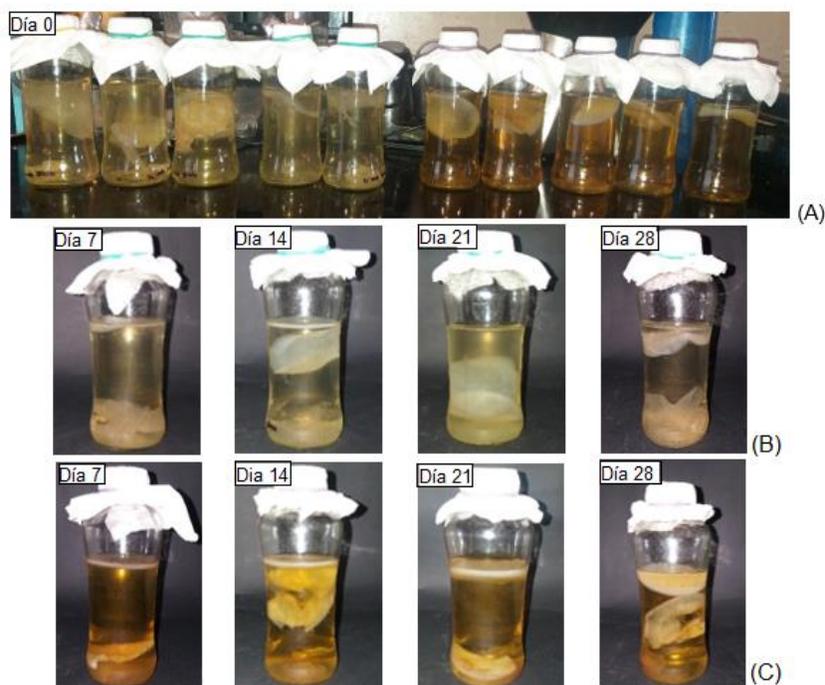
## Capítulo IV: Resultados

### Fermentación de la kombucha

Se elaboró 1200 mL de cada tipo de té, dividiéndolo en botellas con 200 mL para cada tiempo de fermentación (6 botellas), en 5 fue colocado el SCOBY y té iniciador y en una solo el té como control, al inicio de la fermentación se vio una diferencia en la coloración de ambos té, el té verde de un color amarillo ligeramente más claro, mientras que el té negro, amarillo mucho más oscuro, similar al ámbar. Conforme el paso de los días de fermentación el color de las dos kombuchas se hizo más oscuro y además se fue formando una película delgada en la superficie del líquido, siendo esta capa el SCOBY, que fue de un mayor grosor en la kombucha de té negro (Figura 3).

### Figura 3

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



## pH y sólidos solubles totales

La medición de pH y sólidos solubles totales se realizó a los días 0, 7, 14, 21 y 28 con un potenciómetro y refractómetro, respectivamente, en la Tabla 1 se evidenciaron los valores promedio obtenidos cada día y en el Anexo 1 se encuentran todos los resultados con las repeticiones.

**Tabla 1**

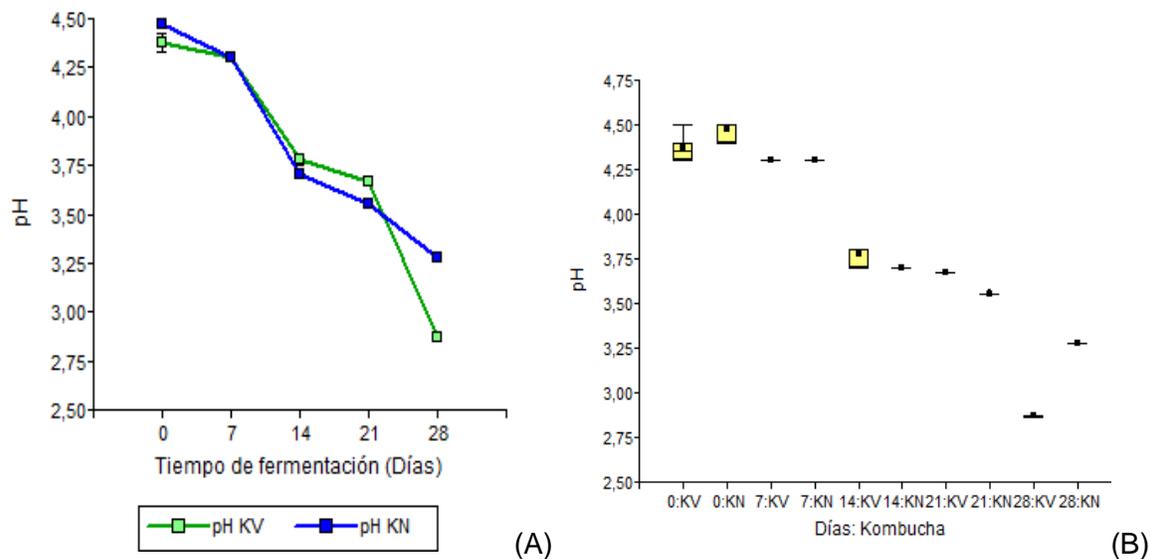
*pH y sólidos solubles totales medidos a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de fermentación.*

<b>Kombucha</b>	<b>Tiempo de fermentación (Días)</b>	<b>pH</b>	<b>Sólidos solubles totales (%)</b>
Té verde	0	4.38	5.5
Té verde	7	4.30	5.5
Té verde	14	3.78	5.25
Té verde	21	3.67	5
Té verde	28	2.87	4
Té negro	0	4.48	6
Té negro	7	4.30	5.5
Té negro	14	3.7	5.5
Té negro	21	3.55	5
Té negro	28	3.28	5

La kombucha de té verde varió su pH desde un promedio de 4.38 en el día 0 a un pH de 2.87 en el día 28. La kombucha de té negro varió su pH desde 4.48 el día 0 hasta 3.28 el día 28. Comparando el día 0, la kombucha con pH más ácido corresponde a la de té verde, en el día 7 el pH de ambas kombuchas fue el mismo con un promedio de 4.3, al día 14 el pH de la kombucha de té negro fue menor (3.8) al de la kombucha de té verde (3.7), el día 21 fue similar ya que el pH de la kombucha de té verde fue de 3.67 y el de la kombucha de té negro de 3.55, en el día 28 fue cuando se vio la variación más significativa, la kombucha de té verde bajó su pH hasta 2.87 y la kombucha de té negro a un 3.28 (Figura 4). Con esto se determinó que la kombucha con mayor acidez correspondió a la de té verde al final de la fermentación.

## Figura 4

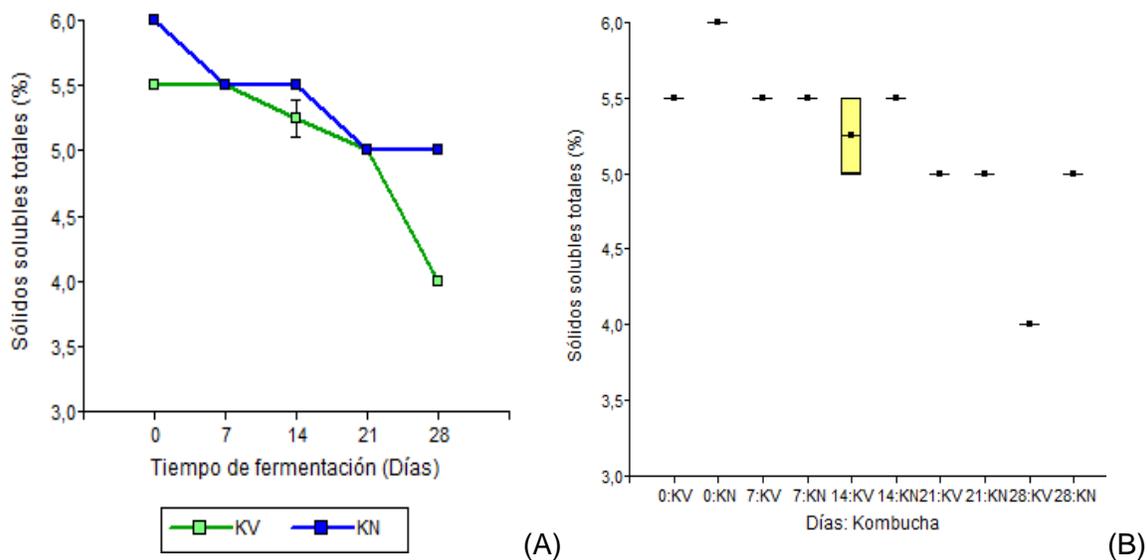
Variación de pH con respecto a los días de fermentación (A) Gráfico de puntos. (B) Box-Plot.



La medición de sólidos solubles totales dio como resultado una disminución del porcentaje medido comparando el día 0 con el día 28. Es así como en el día 0, la kombucha de té verde comenzó con 5.5% que se mantuvo hasta el día 7, en el día 14 tuvo un promedio de 5.25%, al día 21 bajó a 5%, finalmente en el día 28 a un 4%. En la kombucha de té negro se comenzó con un 6%, disminuyó a 5.5% el día 7 y manteniéndose igual en el día 14, al día 21 fue de 5% el cual no varió en el día 28 (Figura 5). Con esto se identifica que la menor cantidad de sólidos solubles totales al final de los días de fermentación fue de la kombucha de té verde.

**Figura 5**

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



La interacción entre el tiempo de fermentación y tipo de kombucha se evidenció con un ANOVA, para el pH (Tabla 2), indicando que existen diferencias significativas en el pH obtenido dependiendo del tipo de té con el que se hizo la kombucha y tiempo de fermentación (valor- $p < 0.0001$ ). Los valores de pH de la kombucha de té negro al día 14 y la kombucha de té verde al día 21 fueron colocados en un mismo grupo ya que no existió una diferencia significativa, igual que en el día 7 al ser los valores iguales.

**Tabla 2**

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

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
pH	40	1,00	0,99	0,98

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

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

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0014 gl: 30

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

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

De la misma manera se procedió con los sólidos solubles totales, el ANOVA realizado (Tabla 3), indica diferencias significativas entre el tipo de té con el que se hizo la kombucha y tiempo de fermentación (valor-p < 0.0001) en cuanto a la variación de los sólidos solubles totales. Los valores de la kombucha de té verde al día 0 y 7 junto con los de la kombucha de té negro al día 7 y 14 fueron los mismos (5.5%), la kombucha de té negro al día 21, 28 y con la kombucha de té verde al día 21 fueron iguales (5%), y el menor valor correspondió a la kombucha de té verde al día 28.

**Tabla 3**

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

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Brix	40	0,98	0,97	1,75

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

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

Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0083 gl: 30

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

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

## Actividad antimicrobiana

### Difusión en disco

La actividad antimicrobiana analizada por la técnica de difusión en disco comparando las dos kombuchas estudiadas frente a té verde y té negro sin fermentar como control negativo, y control positivo gentamicina en concentración de 1  $\mu$ L/mg se presenta en la Tabla 4. Todos los resultados con sus repeticiones se evidencian en el Anexo 3.

**Tabla 4**

*Diámetros de la zona de inhibición con el método de difusión en disco.*

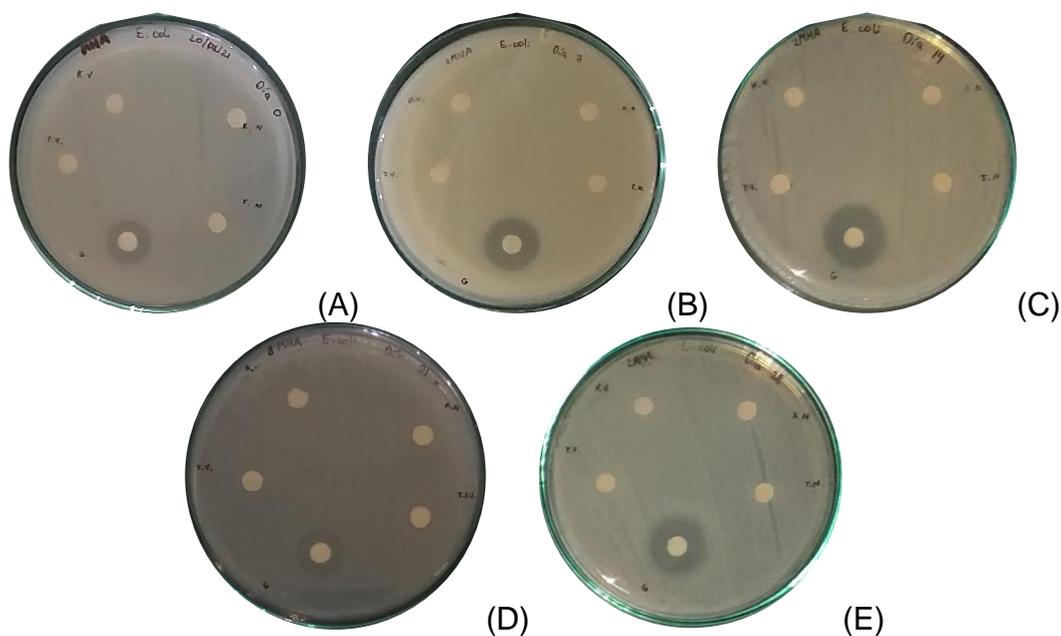
Tiempo de fermentación	Muestra	Diámetro de la zona de inhibición (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.
Día 0	Té verde	0	0	0
	Kombucha té verde	0	0	0
	Té negro	0	0	0
	Kombucha té negro	0	0	0
	Gentamicina	14	12	11
Día 7	Té verde	0	0	0
	Kombucha té verde	0	0	0
	Té negro	0	0	0
	Kombucha té negro	0	0	0
	Gentamicina	15	13	12
Día 14	Té verde	0	0	0
	Kombucha té verde	0	0	0
	Té negro	0	0	0
	Kombucha té negro	0	0	0
	Gentamicina	17	19	16.5
Día 21	Té verde	0	0	0
	Kombucha té verde	0	0	0
	Té negro	7	0	0
	Kombucha té negro	7	0	0
	Gentamicina	16	17	18
Día 28	Té verde	0	0	0
	Kombucha té verde	0	0	0
	Té negro	0	0	0
	Kombucha té negro	0	0	0
	Gentamicina	17	16	15

Los resultados mostraron que a los días 0, 7 y 14 y 28 de fermentación, tanto en la kombucha de té verde como en la kombucha de té negro y los dos té sin fermentar no se formaron halos de inhibición para ninguna de las tres bacterias, en el día 21 ni la kombucha de té verde ni té verde formaron halos de inhibición, la kombucha de té negro y el té negro en cambio formaron un halo de 7 mm en *E. coli* (Figura 6).

En cuanto a la gentamicina como control positivo se tuvieron diámetros promedio de 15.95 mm, 15.3 mm y 14.4 mm para *E. coli*, *S. aureus* y *Pseudomonas* spp., respectivamente.

### Figura 6

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



*Nota.* En cada caja Petri, de izquierda a derecha, Kombucha de té verde – KV. Kombucha de té negro – KN. Té verde – TV. Té negro – TN. Gentamicina – G.

### Macrodilución en caldo

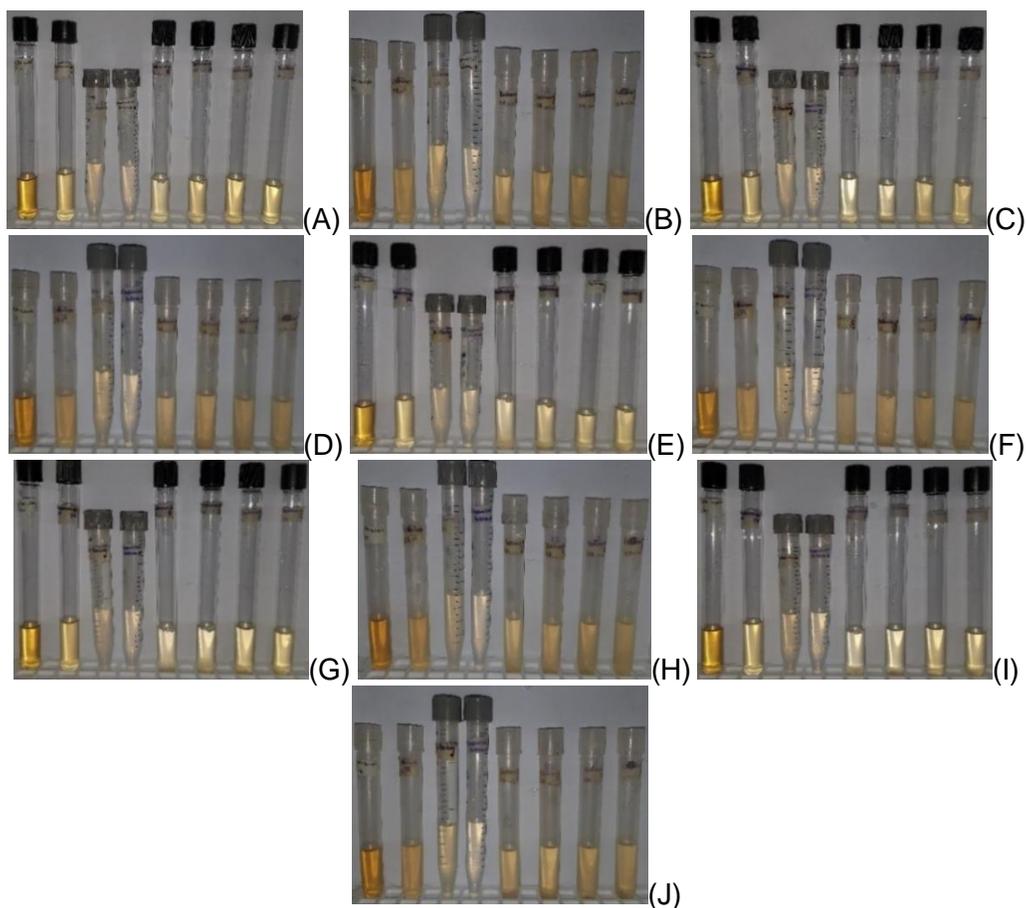
En la Figura 7 se resumieron los resultados por cada día, observando la turbidez comparada con el caldo nutriente con bacteria (control positivo). En el Anexo 4 se encuentran todos los resultados.

Para las tres bacterias con la kombucha de té verde, al día 0 se observó una turbidez menor en la primera dilución, al día 7 hasta en la segunda dilución, en el día 14 en la primera dilución, al día 21 hasta la segunda dilución y en el día 28 hasta la tercera dilución. En la kombucha de té negro en las tres bacterias a los días 0 y 7 la turbidez menor fue en la primera

dilución, al día 14 no se observó diferente turbidez en ninguna dilución, al día 21 en la primera dilución y al día 28 hasta la segunda dilución.

### Figura 7

Macrodilución en caldo para *Pseudomonas* spp. (A) Kombucha de té verde (KTV) día 0. (B) Kombucha de té negro (KTN) día 0. (C) KTV día 7. (D) KTN día 7. (E) KTV día 14. (F) KTN día 14. (G) KTV día 21. (H) KTN día 21. (I) KTV día 28. (J) KTN día 28.



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

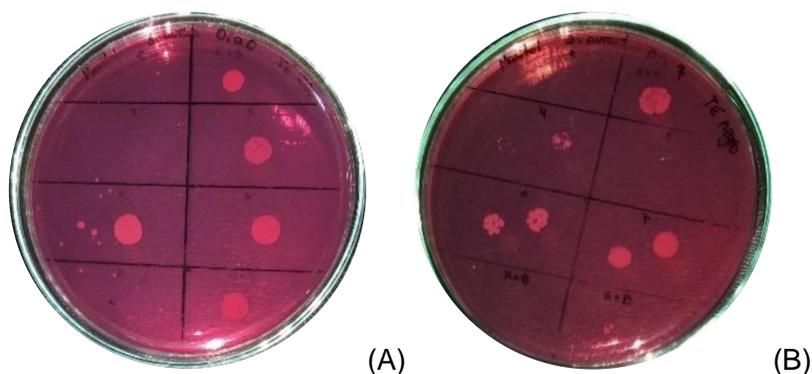
### **Técnica Drop plate**

Para confirmar o descartar la presencia de la bacteria en cada uno de los tubos de la macrodilución en caldo se procedió a realizar la técnica Drop plate en medios diferenciales, si no hubo crecimiento eso indicó que la kombucha y/o sus diluciones lograron inhibir a la bacteria. Con ello determinando la CMI y CBM. En los Anexos 5, 6, 7, 8 y 9 se evidencian todos los resultados de esta técnica. Además, las colonias que se pudieron contar se reportaron en UFC/mL.

En los cinco días de fermentación analizados se observó que las colonias formadas en MSA eran de coloración blanquecina (Figura 8), lo cual no corresponde a *S. aureus* siendo que forma colonias amarillas con un cambio de color en el medio a amarillo, ya que las características fenotípicas de las colonias no correspondían a las esperadas, por ende, estos resultados se descartaron y solo se mostraron los correspondientes a *E. coli* y *Pseudomonas* spp.

### **Figura 8**

*Técnica Drop Plate colonias blancas formadas en MSA (A) Día 0, kombucha de té verde. (B) Día 7, kombucha de té negro.*



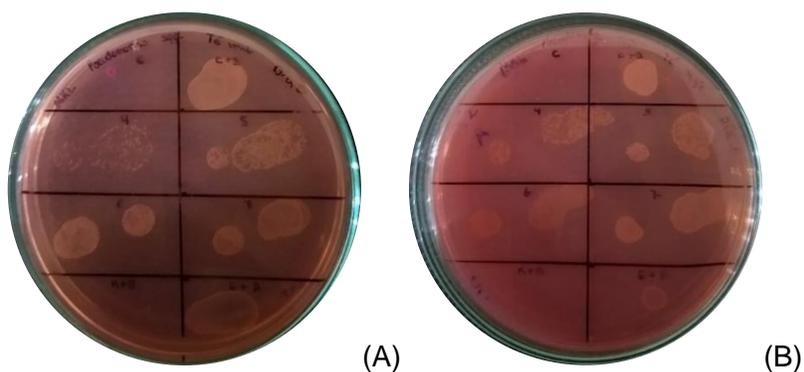
*Nota.* En cada placa, de izquierda a derecha, C – Caldo nutriente. C + B – Caldo nutriente y bacteria. 4 – Primera dilución. 5 – Segunda dilución. 6 – Tercera dilución. 7 – Cuarta dilución. K + B – Kombucha y bacteria. G + B – Gentamicina y bacteria.

En el día 0, *E. coli* no fue inhibida con ninguna de las diluciones ni kombucha sin diluir tanto de té verde como de té negro, observándose colonias rosadas de gran tamaño.

*Pseudomonas* spp. en la primera dilución de la kombucha de té verde hubo 230 colonias (11500 UFC/mL), las siguientes diluciones presentaron colonias incontables, en la kombucha sin diluir en cambio se pudo ver la gota ligeramente traslúcida. En la kombucha de té negro sin diluir no hubo crecimiento, en la primera dilución se contaron 244 colonias (12200 UFC/mL), en las siguientes diluciones las gotas presentaron colonias incontables. Con el antibiótico si hubo crecimiento. Las colonias eran incoloras a ligeramente rosas (Figura 9).

### Figura 9

Técnica Drop Plate para el día 0 de fermentación. (A) *Pseudomonas* spp. en kombucha de té verde. (B) *Pseudomonas* spp. en kombucha de té negro.



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

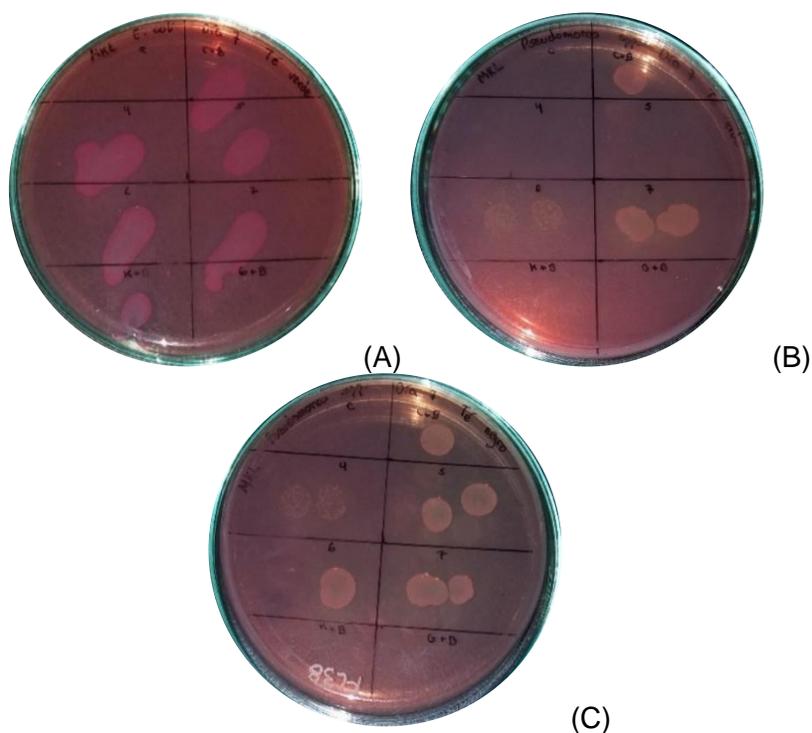
En el día 7, para *E. coli* ni la kombucha de té verde (Figura 10A), la kombucha de té negro ni sus diluciones inhibieron a la bacteria, en el antibiótico no hubo crecimiento.

La kombucha de té verde sin diluir inhibió a *Pseudomonas* spp., se observó una colonia pequeña en la primera dilución (100 UFC/mL), 29 colonias (725 UFC/mL) en la segunda dilución,

las dos gotas en la tercera y cuarta dilución fueron incontables (Figura 10B). La kombucha de té negro sin diluir inhibió a *Pseudomonas* spp., hubo 142 colonias (7100 UFC/mL) en la primera dilución, colonias grandes en la segunda, tercera y cuarta dilución (Figura 10C).

### Figura 10

*Técnica Drop Plate para el día 7 de fermentación. (A) E. coli en kombucha de té verde. (B) Pseudomonas spp. en kombucha de té verde. (C) Pseudomonas spp. en kombucha de té negro.*



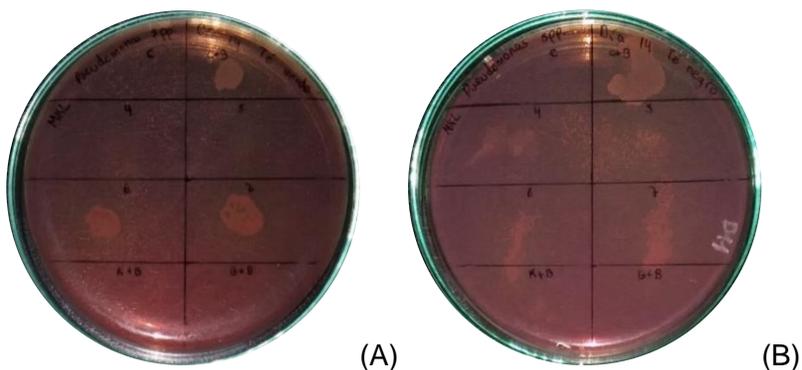
*Nota.* En cada placa, de izquierda a derecha, C – Caldo nutriente. C + B – Caldo nutriente y bacteria. 4 – Primera dilución. 5 – Segunda dilución. 6 – Tercera dilución. 7 – Cuarta dilución. K + B – Kombucha y bacteria. G + B – Gentamicina y bacteria.

Al día 14 de fermentación, ni la kombucha de té verde ni la de té negro junto con sus diluciones logró inhibir a *E. coli*.

*Pseudomonas* spp. fue inhibida con la kombucha de té verde sin diluir, con las dos primeras diluciones se vio una ligera coloración en la gota, y con las dos siguientes diluciones la presencia de varias colonias incontables (Figura 11A). 4 colonias (400 UFC/mL) con la kombucha de té negro sin diluir, en la primera dilución la gota con ligera coloración, 374 colonias (9350 UFC/mL) en la segunda dilución, 111 colonias (1388 UFC/mL) en la tercera dilución y 380 colonias (2375 UFC/mL) en la cuarta dilución (Figura 11B).

### Figura 11

Técnica Drop Plate para el día 14 de fermentación. (A) *Pseudomonas* spp. en kombucha de té verde. (B) *Pseudomonas* spp. en kombucha de té negro.



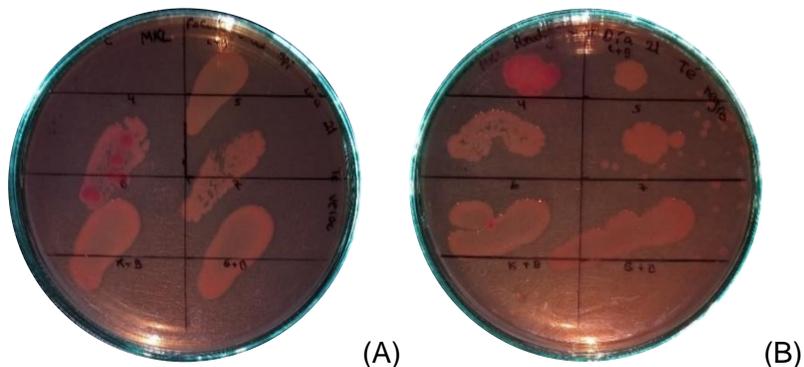
*Nota.* En cada placa, de izquierda a derecha, C – Caldo nutriente. C + B – Caldo nutriente y bacteria. 4 – Primera dilución. 5 – Segunda dilución. 6 – Tercera dilución. 7 – Cuarta dilución. K + B – Kombucha y bacteria. G + B – Gentamicina y bacteria.

Al día 21, *E. coli* no fue inhibida ni con la kombucha de té verde ni la de té negro.

*Pseudomonas* spp. fue inhibida con la kombucha de té verde sin diluir, con las primeras dos diluciones se vieron colonias que no se pudieron contar y con las siguientes diluciones el crecimiento bacteriano en toda la gota (Figura 12A). Con la kombucha de té negro sin diluir creció una sola colonia (100 UFC/mL), en las dos primeras diluciones colonias diferenciadas incontables y en las demás, crecimiento en toda la gota (Figura 12B).

## Figura 12

Técnica Drop Plate para el día 21 de fermentación. (A) *Pseudomonas* spp. en kombucha de té verde. (B) *Pseudomonas* spp. en kombucha de té negro.



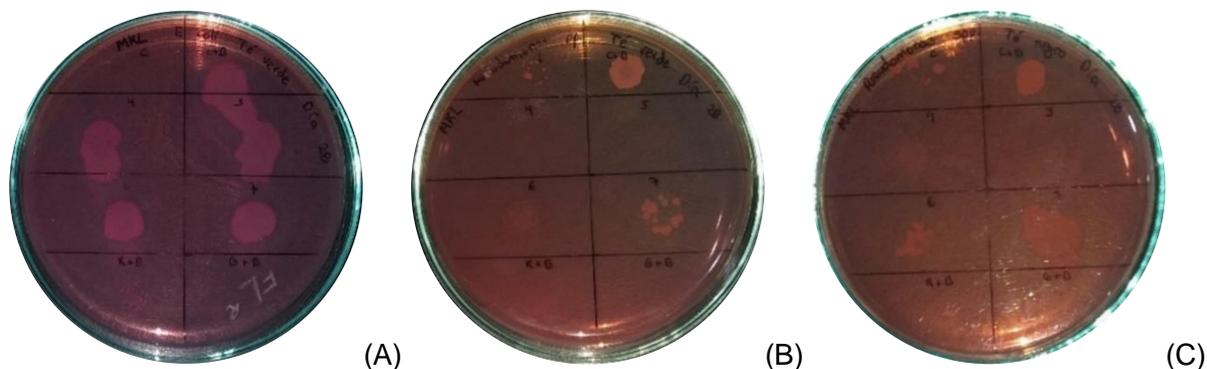
*Nota.* En cada placa, de izquierda a derecha, C – Caldo nutriente. C + B – Caldo nutriente y bacteria. 4 – Primera dilución. 5 – Segunda dilución. 6 – Tercera dilución. 7 – Cuarta dilución. K + B – Kombucha y bacteria. G + B – Gentamicina y bacteria.

Al día 28, en *E. coli* fueron observadas 26 colonias (2600 UFC/mL) con la kombucha de té verde sin diluir, las diluciones no la inhibieron (Figura 13A); la kombucha de té negro y sus diluciones no tuvieron ningún efecto.

Para *Pseudomonas* spp., en la kombucha de té verde hasta la segunda dilución se observó una ligera coloración en las gotas, en la tercera dilución colonias sumamente pequeñas incontables, en la cuarta dilución 16 colonias (100 UFC/mL) (Figura 13B). Con la kombucha de té negro hasta la segunda dilución colonias muy pequeñas, 14 colonias (175 UFC/mL) en la tercera dilución y colonias grandes en la cuarta dilución (Figura 13C).

### Figura 13

Técnica Drop Plate para el día 28 de fermentación. (A) *E. coli* y kombucha de té verde. (B) *Pseudomonas* spp. y kombucha de té verde. (C) *Pseudomonas* spp. y kombucha de té negro.



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

Los resultados de esta técnica se resumen en la Tabla 5.

**Tabla 5**

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

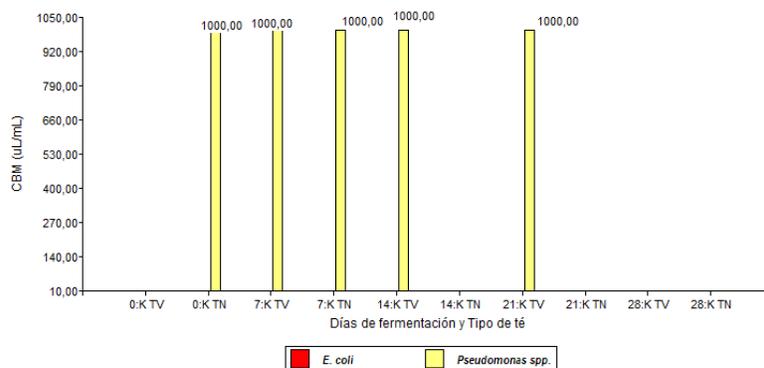
Bacteria	Kombucha té verde									
	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	500	1000	250	1000	250	1000	-	-	62.5
Bacteria	Kombucha té negro									
	Día 0		Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	1000	500	1000	500	-	62.5	-	1000	-	125

Nota. No se presentó inhibición bacteriana – (-)

Para una mejor visualización, estos resultados se presentaron la Figura 14 y la Figura 15.

### Figura 14

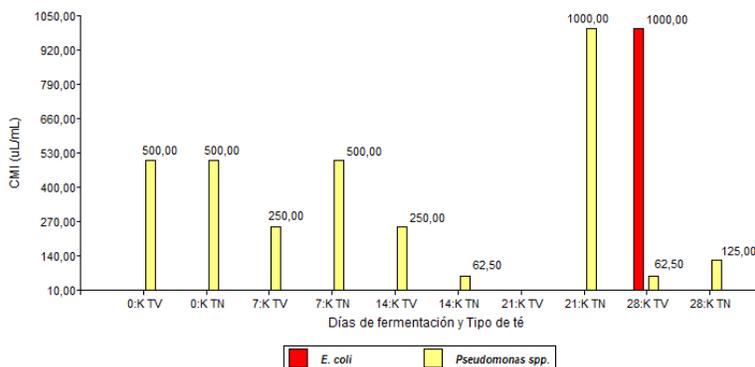
Concentración bactericida mínima en cada uno de los tiempos de fermentación y para cada tipo de kombucha.



Nota. Kombucha de té verde – K TV. Kombucha de té negro – K TN.

### Figura 15

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



Nota. Kombucha de té verde – K TV. Kombucha de té negro – K TN.

Con los resultados de la macrodilución en caldo y la técnica Drop plate se determinó que la kombucha de té verde tiene un limitado efecto antimicrobiano en *Pseudomonas* spp, teniendo una mayor actividad antimicrobiana desde el día 14 al 28 presentando una CBM de 1000 µL/mL, mientras que para estos mismos días con la kombucha de té negro no hubo ninguna CBM.

En el caso de *E. coli*, hubo una CMI de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  con la kombucha de té verde al día 28, es decir, con aquella que no estaba diluida mientras que con la kombucha de té negro no hubo inhibición en ningún día.

La CMI para *Pseudomonas* spp. al día 7 fue mejor la kombucha de té verde (250  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) a la de té negro (500  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), al día 14 la kombucha de té verde mantuvo la misma CMI que el día 7 y para la kombucha de té negro fue de 62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , al día 21 solo hubo una CMI de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para la kombucha de té negro y al día 28, la menor dilución que tuvo un efecto antimicrobiano fue la de la kombucha de té verde (62.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) comparada con la de té negro (125  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ).

Además, al realizar un ANOVA para la CMI (Anexo 10) y CBM (Anexo 11) se vio que la interacción entre el tipo de té de la kombucha y las bacterias, el tipo de té de la kombucha y el tiempo de fermentación, el tiempo de fermentación y las bacterias, no son significativamente diferentes (valor-p > 0.05). Por lo que a pesar de que se observó una inhibición ligeramente mayor de parte de la kombucha de té verde, esta no es significativamente diferente a la inhibición de la kombucha de té negro.

## Capítulo V: Discusión

La variación de pH y sólidos solubles totales conforme el paso de los días de fermentación depende principalmente de la producción de ácidos orgánicos por parte de las levaduras y bacterias presentes en el SCOBY de la kombucha a través de la conversión de la sacarosa a glucosa que luego las bacterias transforman a ácidos orgánicos (Al-Mohammadi *et al.*, 2021), los ácidos orgánicos que se encuentran en mayor concentración es el ácido acético, ácido glucónico (Battikh *et al.*, 2013) y en menor cantidad ácido glucurónico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido cítrico y ácido málico (Ivanišová *et al.*, 2020), estos ácidos aumentan su concentración conforme los días de fermentación. Los resultados de esta investigación, indican que la kombucha de té verde con un pH y °Brix iniciales de 4.38 y 5.5%, respectivamente, descendiendo al día 28 a 2.87 y 4%, para la kombucha de té negro comenzando con 4.48 y 6% y bajando a 3.28 y 5% al día 28, respectivamente, concuerdan con otros estudios (Jayabalan *et al.*, 2008); Shahbazi *et al.*, 2018 ; Gaggia *et al.*, 2019) que mencionan que el pH de la kombucha varía desde un valor de 5 a 3 entre los primeros días de fermentación y luego disminuyen ligeramente los días posteriores, ocurriendo lo mismo con los azúcares, debido al incremento de los ácidos orgánicos.

Pero si se compara el pH en cada día de fermentación por medio de intervalos de confianza (Anexo 2), se ve que hay una menor acidez en la kombucha tanto del té verde como té negro obtenida en este estudio, tomando como referencia otro estudio, al día 14 se tenía un pH promedio de 3.39 para la kombucha de té verde y de 3.04 al día 21 con la kombucha de té negro (Valiyan *et al.*, 2021), estos valores se ubican bajo los intervalos de confianza obtenidos (3.70 – 3.85) y (3.54 – 3.56), respectivamente. Con ello demostrando que el pH de este estudio es más alto que otros referenciales comparando cada día, pero al final de la fermentación se mantiene dentro de los valores comunes.

En cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana de las kombuchas, la prueba de difusión en disco no arrojó resultados significativos comparándolos con los obtenidos en la macrodilución en caldo y la técnica Drop plate, se puede suponer que la no formación de halos de inhibición pudo haber sido a causa de la baja capacidad de difusión de los componentes antimicrobianos de la kombucha, se indica que la tasa de difusión del ácido acético influye directamente en el crecimiento bacteriano (Lindahl *et al.*, 2018), siendo que se disocia en función del valor del pH del medio de cultivo, a un pH menor o igual a 4.75 la mayor parte se encuentra en su forma no disociada, de esta manera pueden pasar por la membrana celular hasta llegar al citosol en donde se disocia y bajan el pH hasta que la célula no resiste y muere (Trček *et al.*, 2015); el medio MHA tiene un pH de 7.3 (Power & Johnson, 2009) por lo que esto pudo afectar la disociación del ácido e influir directamente en la acción antimicrobiana.

Además, una desventaja del método es que no se puede determinar la cantidad de antimicrobiano difundido en la placa (Balouiri *et al.*, 2016) por lo tanto pudo ser que no hubo la suficiente difusión de la kombucha para inhibir a las bacterias. Otro factor pudo haber sido una interacción desfavorable entre el medio y la kombucha, tomando como ejemplo lo que sucede con los cationes divalentes como Magnesio y Calcio, una alta cantidad de estos cationes cuando se evalúan aminoglucósidos y tetraciclinas ocasiona que se reduzcan las zonas de inhibición esperadas (CLSI, 2012).

Mientras que en el antibiótico si se pudo ver la formación de halos de inhibición en *E. coli* y *Pseudomonas* spp de 15.95 mm y 14.4 mm, respectivamente, *E. coli* ubicándose en un intervalo  $\geq 15$  en bacterias susceptibles y *Pseudomonas* spp. en el intervalo 13 – 14 en bacterias intermedias (CLSI, 2018b). Con esto indicando que el método de difusión fue correctamente realizado y si se forman halos de inhibición.

Los resultados de la macrodilución en caldo y la técnica Drop plate indican que las dos kombuchas tienen una cierta actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas* spp. y una más

baja en *E. coli*, derivada de los componentes formados durante el tiempo de fermentación, por ejemplo, el ácido acético y flavonoides como epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG), epicatequina (EC) y galato de epigalocatequina (EGCG) (Kallel *et al.*, 2012).

Al día 0 de fermentación se observó la inhibición de *Pseudomonas* spp., con las dos kombuchas en estudio, esto causado principalmente por su acidez al agregar el té iniciador (Kaewkod *et al.*, 2019) ocasionando que tenga un pH más ácido, esto se contrasta con que la kombucha con un pH neutro no tiene un efecto inhibitorio, pero aquella con una cierta acidez a pesar del tiempo de fermentación sí lograba tener un efecto inhibitorio (Cetojevic *et al.*, 2008)

En esta investigación se puede ver que la kombucha de té verde tuvo un ligero efecto antimicrobiano en *E. coli* al día 28 de fermentación, mientras que la kombucha de té negro no tuvo ningún efecto en esta bacteria; para *Pseudomonas* spp. el resultado indica que la actividad antimicrobiana de la kombucha de té verde es ligeramente más eficaz que la de té negro desde el día 14 de fermentación hasta el día 28 presentado en esta investigación, a pesar de que en varios estudios se ha evidenciado el gran efecto inhibitorio que tiene la kombucha en *E. coli* (Greenwalt *et al.*, 1998); Ivanišová *et al.*, 2020 ; Valiyan *et al.*, 2021) y en *Pseudomonas* spp. (Battikh *et al.*, 2013), al contrastar los resultados se identifica que existe una diferencia notable con estudios anteriores siendo que no se obtuvo una alta actividad antibacteriana.

Lo anterior a causa de que la kombucha se ve afectada por diversos factores como son la temperatura, origen del SCOBY, contenido de azúcar y el tipo y origen del té usado. En el caso del té se toma en cuenta el tiempo de infusión, ya que a un mayor tiempo hay una mayor cantidad de compuestos bioactivos (Antolak *et al.*, 2021), siendo que la mayor cantidad de flavonoides en una infusión de té verde se obtienen entre 3, 5 a 7 minutos dependiendo de la temperatura que puede estar entre los 70°C a 100°C (Zimmermann & Gleichenhagen, 2011); esto justifica el tiempo de infusión implementado en la investigación que fue de 5 minutos.

Uno de los factores decisivos que influye en las distintas propiedades de la kombucha y por lo tanto en el efecto inhibitorio, es la diversidad bacteriana y de levaduras en el SCOBY y en el líquido, Las especies bacterianas encontradas corresponden mayormente a *Acetobacter*, *Bacillus*, *Komagataeibacter* y *Gluconobacter* y levaduras del género *Starmella* y *Galiella* siendo las más abundantes, y en menor cantidad *Candida* sp. (Kaashyap *et al.*, 2021) Mientras que en otra investigación hubo mayor predominancia de *Candida* sp. (Chakravorty *et al.*, 2016). En cambio, en otro estudio se menciona que en la kombucha hay mayor predominancia de bacterias del ácido acético como *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconobacter oxydans*, del ácido láctico *Oenococcus oeni* y levaduras como *Zygosaccharomyces* (Coton *et al.*, 2017). Esta variación de la diversidad de microorganismos encontrados difiere en cuanto a ausencia o presencia en la kombucha, uno de los factores a los que se debe esta variabilidad es el origen del SCOBY y el té iniciador, tomando en cuenta que dependiendo del lugar de origen se denota una cierta diferencia en sus metabolitos a causa de las distintas bacterias y levaduras (Chu & Chen, 2006).

La kombucha se compone a más de ácidos orgánicos, por catequinas, etanol, vitamina C y B, elementos como Na, Mn, Zn y aminoácidos (Watawana *et al.*, 2015). La mayor actividad antimicrobiana de la kombucha de té verde se debe a la mayor presencia de catequinas, que son unos de los flavonoides predominantes en la kombucha y reconocidos por su actividad antimicrobiana (Bhattacharya *et al.*, 2016). Uno de sus mecanismos para su actividad antimicrobiana se basa en la unión con la membrana celular haciendo que se rompa y el contenido citoplasmático se elimine, con eso ocasionando la muerte de la bacteria (Renzetti *et al.*, 2020), en el caso específico de EGCG, al tener carga negativa se une al lipopolisacárido que tiene carga positiva y genera peróxido de hidrógeno que ocasiona el daño en toda la membrana celular y al final haciendo que la bacteria muera, es así como este componente ocasiona la inhibición de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Jeon *et al.*, 2014). Estos resultados respaldan

la limitada actividad antimicrobiana de la kombucha de té verde pero ligeramente mayor que la kombucha de té negro sobre *Pseudomonas* spp.

## Capítulo VI: Conclusiones

La elaboración de la kombucha de té verde y de té negro se realizó acorde a métodos bibliográficos, consiguiendo la formación de SCOBYs densos a más días de fermentación y la acidificación del té.

El pH y sólidos solubles totales fueron medidos en los tiempos de fermentación respectivos, determinando que conforme el paso de los días de fermentación los valores de estos dos parámetros descendían.

La evaluación del efecto inhibitorio de la kombucha de té verde y de té negro en *E. coli* y *Pseudomonas* spp. determinó que las dos kombuchas tienen un limitado efecto antimicrobiano siendo más notable desde el día 14 de fermentación.

Al día 14 y 21 la kombucha de té verde alcanzó una CBM igual a 1000  $\mu\text{L/mL}$ , mientras que el té negro en estos mismos tiempos no presentó ninguna CBM. Al día 28 solo la kombucha de té verde logró una ligera inhibición en *E. coli*, con esto demostrando que la kombucha de té verde tuvo una actividad antimicrobiana ligeramente mayor desde el día 14 comparada con la kombucha de té negro, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Mantener un control y seguimiento adecuado de viabilidad y pureza del cepario para evitar contaminación y sea seguro trabajar con los microorganismos conservados.

Repetir las pruebas de evaluación de la actividad antimicrobiana con una cepa de *S. aureus* correctamente identificada para poder comprobar o descartar la hipótesis presentada.

Investigar otros métodos que complementen los resultados de la actividad antimicrobiana con las tres bacterias estudiadas, como el método de difusión en pozos de agar.

## Referencias

- Al-Mohammadi, A., Ismaiel, A., Ibrahim, R., Moustafa, A., Abou Zeid, A., & Enan, G. (2021). Chemical constitution and antimicrobial activity of kombucha fermented beverage. *Molecules*, 26(16), 5026. doi:10.3390/molecules26165026
- Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M., Hargafi, K., Jaouadi, B., . . . Ammar, E. (2012). Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1-9. doi:10.1186/1472-6882-12-63
- Antolak, H., Piechota, D., & Kucharska, A. (2021). Kombucha tea—A double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1541. doi:10.3390/antiox10101541
- Arikan, M., Mitchell, A., Finn, R., & Gürel, F. (2020). Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Journal of food science*, 85(2), 455-464. doi:10.1111/1750-3841.14992
- Azevedo, R. S., Teixeira, B. S., da Silva Sauthier, M. C., Santana, M. V., Dos Santos, W. N., & de Andrade Santana, D. (2019). Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. *Food chemistry*, 273, 39-44. doi:10.1016/j.foodchem.2018.04.030
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2013). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*, 37(2), 231-236. doi:10.1111/j.1745-4514.2011.00629.x

- Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M. M., Chakravorty, S., Sarkar, S., Chakraborty, W., . . . Gachhui, R. (2016). Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. *Current microbiology*, *73*(6), 885-896. doi:10.1007/s00284-016-1136-3
- Bonelli, R. R., Moreira, B. M., & Picão, R. C. (2014). Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: history, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, *17*(1-2), 24-36. doi:10.1016/j.drug.2014.02.001
- Bortolini, D. G., Haminiuk, C. W., Pedro, A. C., Fernandes, I. D., & Maciel, G. M. (2021). Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview. *Food Chemistry: X*, *12*(5), 100160. doi:10.1016/j.fochx.2021.100160
- Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P., & Herndon, D. N. (2009). Emerging infections in burns. *Surgical infections*, *10*(5), 389-397. doi:10.1089/sur.2009.024
- Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D'Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., . . . de Barros, F. A. (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, *128*, 108782. doi:10.1016/j.foodres.2019.108782
- Cetojevic, D. D., Bogdanovic, G. M., Cvetkovic, D. D., & Velicanski, A. S. (2008). Antiproliferative and antimicrobial activity of traditional Kombucha and *Satureja montana* L. Kombucha. *J. BUON*, *13*(3), 395-401.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics.

*International journal of food microbiology*, 220, 63-72.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015

Chen, D., Ding, Y., Chen, G., Sun, Y., Zeng, X., & Ye, H. (2020). Components identification and nutritional value exploration of tea (*Camellia sinensis* L.) flower extract: Evidence for functional food. *Food Research International*, 132, 109100.

doi:10.1016/j.foodres.2020.109100

Chu, S. C., & Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*, 98(3), 502-507.

doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.080

Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. (2018a). *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*.

[https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhshykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/\\$FILE/M07Ed11E%20Methods%20for%20Dilution%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Tests%20for%20Bacteria%20That%20Grow%20Aerobica](https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhshykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/$FILE/M07Ed11E%20Methods%20for%20Dilution%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Tests%20for%20Bacteria%20That%20Grow%20Aerobica)

CLSI. (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition*.

[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwih95vmwLv0AhW4QzABHWaeC\\_YQFnoECA0QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D58139aa4615e27240754da03%26assetKey%3DAS%253A42223375670](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwih95vmwLv0AhW4QzABHWaeC_YQFnoECA0QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D58139aa4615e27240754da03%26assetKey%3DAS%253A42223375670)

CLSI. (2018b). *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*.

<https://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/CLSI-2018-M100-S28.pdf>

- Coelho, R. M., de Almeida, A. L., do Amaral, R. Q., da Mota, R. N., & de Sousa, P. H. (2020). Kombucha. *Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272.  
doi:10.1016/j.ijgfs.2020.100272
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., . . . Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5). doi:10.1093/femsec/fix048
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880. doi:10.1128/CMR.00022-13
- De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food microbiology*, 73, 11-16. doi:0.1016/j.fm.2018.01.008
- de Miranda, J. F., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G., . . . Lima, A. R. (2022). Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science*, 87, 503-527.  
doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Dutta, H., & Paul, S. K. (2019). Kombucha drink: production, quality, and safety aspects. *Production and management of beverages*, 259-288. doi:10.1016/B978-0-12-815260-7.00008-0
- Eckmann, C., & Dryden, M. (2010). Treatment of complicated skin and soft-tissue infections caused by resistant bacteria: value of linezolid, tigecycline, daptomycin and vancomycin. *European journal of medical research*, 15(12), 554-563. doi:10.1186/2047-783X-15-12-554

- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R., Castro-Mejía, J., . . . Di Gioia, D. (2019). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, *11*(1). doi:10.3390/nu11010001
- Gnanamani, A., Hariharan, P., & Paul-Satyaseela, M. (2017). Staphylococcus aureus: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus*, *4*, 28. doi:10.5772/67338
- Greenwalt, C. J., Ledford, R. A., & Steinkraus, K. H. (1998). Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented teakombucha. *LWT-Food Science and Technology*, *31*(3), 291-296. doi:10.1006/fstl.1997.0354
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of microbiological methods*, *44*(2), 121-129. doi:10.1016/s0167-7012(00)00241-4
- Ivanišová, E., Meňhartová, K., Terentjeva, M., Harangozo, L., Kántor, A., & Kačániová, M. (2020). The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *of food science and technology*, *57*(5), 1840-1846. doi:0.1007/s13197-019-04217-3
- Jakubczyk, K., Kałduńska, J., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, *9*(5), 447. doi:10.3390/antiox9050447
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, *123*(3), 570-581. doi:10.1111/jam.13468

- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. (2008). Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, *109*(1), 227-234. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.037
- Jeon, J., Kim, J. H., Lee, C. K., Oh, C. H., & Song, H. J. (2014). The antimicrobial activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate and green tea extracts against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolated from skin wounds. *Annals of dermatology*, *26*(5), 564-569. doi:10.5021/ad.2014.26.5.564
- Kaashyap, M., Cohen, M., & Mantri, N. (2021). Microbial Diversity and Characteristics of Kombucha as Revealed by Metagenomic and Physicochemical Analysis. *Nutrients*, *13*(12), 4446. doi:10.3390/nu13124446
- Kaewkod, T., Bovonsombut, S., & Tragoolpua, Y. (2019). Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line. *Microorganisms*, *7*(12), 700. doi:10.3390/microorganisms7120700
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, *49*(1), 226-232. doi:10.1016/j.foodres.2012.08.018
- Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of epidemiology*, *30*, 66-70. doi:10.1016/j.annepidem.2018.11.001
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2019). Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*, *11*(1), 39. doi:10.3390/nu11010039

- Krishna, S., & Miller, L. S. (2012). Host–pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in microbiology*, 15(1), 28-35.  
doi:10.1016/j.mib.2011.11.003
- Lemiech, E., Kiersnowska, Z. M., Michałkiewicz, M., Depta, A., & Marczak, M. (2021). Nosocomial infections as one of the most important problems of healthcare system. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(3), 361-366.  
doi:10.26444/aaem/122629
- Lindahl, L., Genheden, S., Faria-Oliveira, F., Allard, S., Eriksson, L. A., Olsson, L., & Bettiga, M. (2018). ). Alcohols enhance the rate of acetic acid diffusion in *S. cerevisiae*: biophysical mechanisms and implications for acetic acid tolerance. *Microbial Cell*, 5(1), 42-55.  
doi:10.15698/mic2018.01.609
- Liu, J. Y., & Dickter, J. K. (2020). Nosocomial Infections: A History of Hospital-Acquired Infections. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics*, 30(4), 637-652.  
doi:10.1016/j.giec.2020.06.001
- Mancini, E., Beglinger, C., Drewe, J., Zanchi, D., Lang, U. E., & Borgwardt, S. (2017). Green tea effects on cognition, mood and human brain function: A systematic review. *Phytomedicine*, 34, 26-37. doi:10.1016/j.phymed.2017.07.008
- Market Data Forecast. (abril de 2021). *Latin America Kombucha Market Analysis By Types (Bacteria, Yeast, Mould, Others), By Flavours (Herbs & Spices, Citrus, Berries, Apple, Coconut & Mangoes, Flowers, Others) And By Region Latin America (Brazil, Argentina, Mexico)*. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/la-kombucha-market>
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, 171. doi:10.1016/j.fm.2013.09.003

- Martínez, J., Valenzuela, L., Jayabalan, R., Huerta, J., & Escalante, A. (2018). ). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 390-399. doi:10.1080/19476337.2017.1410499
- Moet, G. J., Jones, R. N., Biedenbach, D. J., Stilwell, M. G., & Fritsche, T. R. (2007). Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–2004). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 57(1), 7-13. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.05.009
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., . . . Mazraedoost, S. (2020). Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2020/4397543
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2016). *Medical microbiology*. Elsevier.
- Musial, C., Kuban-Jankowska, A., & Gorska-Ponikowska, M. (2020). Beneficial properties of green tea catechins. *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1744. doi:10.3390/ijms21051744
- Naghili, H., Tajik, H., Mardani, K., Rouhani, S. M., Ehsani, A., & Zare, P. (2013). Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. *Veterinary research forum* , 4(3), 179.
- Nicolas, M. H., Bertrand, X., & Madec, J. Y. (2014). Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 543-574. doi:10.1128/CMR.00125-13

- Nijs, A., Cartuyvels, R., Mewis, A., Peeters, V., Rummens, J. L., & Magerman, K. (2003). Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of clinical microbiology*, 41(8), 3627-3630. doi:10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003
- Oli, A. N., Eze, D. E., Gugu, T. H., Ezeobi, I., Maduagwu, U. N., & Ihekwereme, C. P. (2017). Multi-antibiotic resistant extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria pose a challenge to the effective treatment of wound and skin infections. *The Pan African Medical Journal*, 27-66. doi:10.11604/pamj.2017.27.66.10226
- Pan, H., Gao, Y., & Tu, Y. (2016). Mechanisms of body weight reduction by black tea polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1659. doi:10.3390/molecules21121659
- Pasachova, J., Ramírez, S., & Muñoz, L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38. doi:10.22490/24629448.3631
- Paulsson, M., Su, Y. C., Ringwood, T., Uddén, F., & Riesbeck, K. (2019). Pseudomonas aeruginosa uses multiple receptors for adherence to laminin during infection of the respiratory tract and skin wounds. *Scientific reports*, 9(1), 1-10. doi:10.1038/s41598-019-54622-z
- Petkovšek, Z., Eleršič, K., Gubina, M., Zgur-Bertok, D., & Starčič Erjavec, M. (2009). Virulence potential of Escherichia coli isolates from skin and soft tissue infections. *Journal of clinical microbiology*, 47(6), 1811-1817. doi:10.1128/JCM.01421-08
- Power, D. A., & Johnson, J. A. (2009). *Difco™ & BBL™ manual*. Manual of Microbiological Culture Media.

- Ramírez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Ranjan, A., Shaik, S., Nandanwar, N., Hussain, A., Tiwari, S. K., Semmler, T., . . . Ahmed, N. (2017). Comparative Genomics of Escherichia coli Isolated from Skin and Soft Tissue and Other Extraintestinal Infections. *MBio*, 8(4). doi:10.1128/mBio.01070-17
- Renzetti, A., Betts, J. W., Fukumoto, K., & Rutherford, R. N. (2020). Antibacterial green tea catechins from a molecular perspective: Mechanisms of action and structure–activity relationships. *Food & Function*, 11(11), 9370-9396. doi:10.1039/d0fo02054k
- Reygaert, W. C. (2018). Green tea catechins: Their use in treating and preventing infectious diseases. *BioMed research international*, 9105261. doi:10.1155/2018/9105261
- Sangboonruang, S., Semakul, N., Obeid, M. A., Ruano, M., Kitidee, K., Anukool, U., . . . Tragoolpua, K. (2021). Potentiality of melittin-loaded niosomal vesicles against vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus and Staphylococcal skin infection. *International journal of nanomedicine*, 16, 7639-7661. doi:10.2147/IJN.S325901
- Shahbazi, H., Hashemi, H., Golmakani, M. T., Eskandari, M. H., & Movahedi, M. (2018). Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2568-2577. doi:10.1002/fsn3.873
- Srihari, T., Arunkumar, R., Arunakaran, J., & Satyanarayana, U. (2013). Downregulation of signalling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 3(1), 53-58. doi:10.1016/j.bionut.2012.08.001

- Sun, T. Y., Li, J. S., & Chen, C. (2015). Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage. *Journal of food and drug analysis*, 23(4), 709-718. doi:10.1016/j.jfda.2015.01.009
- Tanaka, T., & Matsuo, Y. (2020). Production mechanisms of black tea polyphenols. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 68(12), 1131-1142. doi:10.1248/cpb.c20-00295
- Trček, J., Mira, N. P., & Jarboe, L. R. (2015). Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6215-6229. doi:10.1007/s00253-015-6762-3
- Valiyan, F., Koohsari, H., & Fadavi, A. (2021). Use of Response surface methodology to investigate the effect of several fermentation conditions on the antibacterial activity of several kombucha beverages. *Journal of Food Science and Technology*, 58(5), 1877-1891. doi:10.1007/s13197-020-04699-6
- Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., Markov, S. L., Tumbas, V. T., & Vulić, J. J. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. *Technology and Biotechnology*, 52(4), 420-429. doi:10.17113/ftb.52.04.14.3611
- Villarreal, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of food science*, 83(3), 580-588. doi:10.1111/1750-3841.14068
- Villarreal, S. A., Bouajila, J., Pace, M., Leech, J., Cotter, P. D., Souchard, J. P., . . . Beaufort, S. (2020). Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108778. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778

- Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., & Deniņa, I. (2014). Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *Journal of medicinal food*, , 17(2), 179-188. doi:10.1089/jmf.2013.0031
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, 11. doi:10.1155/2015/591869
- Whitmire, J. M., & Merrell, D. S. (2012). Successful culture techniques for Helicobacter species: general culture techniques for Helicobacter pylori. *Helicobacter Species*, 921, 17-27. doi:10.1007/978-1-62703-005-2\_4
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(2), 446-455. doi:10.1007/s12010-008-8361-6
- Zhang, H., Qi, R., & Mine, Y. (2019). The impact of oolong and black tea polyphenols on human health. *Food Bioscience*, 29, 55-61. doi:10.1016/j.fbio.2019.03.009
- Zhong, D., & He, W. (2019). Detection of Pseudomonas aeruginosa in the skin by immunomagnetic isolation and real-time quantitative PCR. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 19(9), 5517-5521. doi:10.1166/jnn.2019.16595
- Zimmermann, B. F., & Gleichenhagen, M. (2011). The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: How to get most out of it. *Food chemistry*, 124(4), 1543-1548. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.009

## Apéndices