



**Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.**

Ruiz Basantes, Melany Amanda

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

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

M. Sc. Vargas Verdesoto, Rafael Eduardo

10 de marzo del 2022

# COPYLEAKS

Ruiz\_UIC Copyleaks.docx

Scanned on: 14:38 April 29, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	148
Words with Minor Changes	2
Paraphrased Words	85
Omitted Words	0



Financiado e desarrollado por:  
RAFAEL 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 de té negro y verde en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.**" fue realizado por la señorita **Ruiz Basantes, Melany Amanda**, 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, **Ruiz Basantes, Melany Amanda**, con cédula de ciudadanía n° 171713932-1, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium spp.* y *Aspergillus 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 del 2022

**Ruiz Basantes, Melany Amanda**

C.C.: 171713932-1



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

**Autorización de Publicación**

Yo **Ruiz Basantes, Melany Amanda**, con cédula de ciudadanía n° 171713932-1, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación del efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.*** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 10 de marzo del 2022

**Ruiz Basantes, Melany Amanda**

C.C.: 171713932-1

## Dedicatoria

“Incluso si caigo y me lastimo, correré sin cesar hacia mi sueño”

-Young Forever, BTS

*Dedicado a la Mel del pasado,  
que creía que no llegaría tan lejos.*

## Agradecimiento

A mi mami, una mujer extraordinaria que ha sido padre y madre para mí y que, aunque hemos pasado momentos difíciles ha sido incondicional; y mediante su cuidado, cariño, enseñanzas me ha forjado como mujer y ha guiado mi camino profesional.

A mis profesores, que me han forjado durante mi vida universitaria. Especialmente al Inge. Rafael Vargas y la Doc. Kary Ponce que mediante sus enseñanzas y anécdotas de sus vidas como estudiantes y profesionales me hicieron amar aún más la biotecnología y fijarme en los pequeños detalles, porque todo es ciencia. Agradezco también, a la Doc. Fernanda Loaiza que me ha sabido guiar académicamente para realizar de forma correcta los ensayos realizados en esta tesis.

A Andre y Mary, amigas incondicionales, con las cuales he compartido muchas experiencias y han estado para mí cuando más las necesitaba. También a mis compañeros de UIC con los cuales compartí presencialmente nuestro último semestre.

Y a mi perrito, Mochi, que me acompañaba y desvelaba conmigo mientras realizaba hacía deberes, estudiaba y escribía mi tesis.

*Gracias a todos por ser parte de mi vida,*

*Mel.*

## Índice de Contenido

<b>Revisión Copyleaks</b> .....	2
<b>Certificación</b> .....	3
<b>Responsabilidad de Autoría</b> .....	4
<b>Autorización de Publicación</b> .....	5
<b>Dedicatoria</b> .....	6
<b>Agradecimiento</b> .....	7
<b>Índice de Contenido</b> .....	8
<b>Índice de Tablas</b> .....	11
<b>Índice de Figuras</b> .....	12
<b>Abreviaturas</b> .....	14
<b>Resumen</b> .....	15
<b>Abstract</b> .....	16
<b>Capítulo I: Introducción</b> .....	17
Formulación de problema.....	17
Justificación de problema .....	18
Objetivos de investigación .....	19
<i>Objetivo General</i> .....	19
<i>Objetivos Específicos</i> .....	19
<b>Capítulo II: Marco Teórico</b> .....	20



Hongos patógenos .....	20
<i>Penicillium</i> spp. ....	20
<i>Aspergillus</i> spp. ....	24
Kombucha .....	28
Hipótesis de investigación .....	30
<b>Capítulo II: Materiales y métodos</b> .....	<b>31</b>
Identificación de los hongos .....	31
Preparación de la kombucha .....	31
Tiempo de fermentación .....	31
Determinación de pH y azúcares totales .....	31
Cultivo de los inóculos fúngicos .....	32
Preparación de las suspensiones fúngicas .....	32
Pruebas de susceptibilidad antifúngica .....	32
<i>Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF)</i> .....	32
<i>Método de difusión en disco</i> .....	34
Análisis estadístico .....	34
<b>Capítulo III: Resultados</b> .....	<b>35</b>
Identificación de las cepas fúngicas .....	35
Fermentación kombucha de té verde y negro .....	35
pH .....	36

Azúcares totales.....	38
Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) .....	40
Difusión en disco.....	43
<b>Capítulo IV: Discusión.....</b>	<b>47</b>
<b>Capítulo V: Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo VI: Recomendaciones .....</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo VII: Bibliografía .....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo VIII: Apéndices .....</b>	<b>62</b>

### Índice de Tablas

**Tabla 1.** Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (CMF) de la kombucha de té verde y negro a diferentes días de fermentación contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. 42

**Tabla 2.** Diámetros de la zona de inhibición de kombucha de té verde, kombucha de té negro, té negro, té verde y fluconazol en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. .... 46

**Tabla 3.** Diámetros de la zona de inhibición de SCOBY de kombucha de té verde, SCOBY de kombucha de té negro, té negro, té verde y fluconazol en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. .... 46

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Características macroscópicas de distintas especies de <i>Penicillium</i> .....	21
<b>Figura 2.</b> Estructura y tipo de ramificaciones del conidióforo de <i>Penicillium</i> .....	22
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida del <i>Penicillium</i> spp. ....	23
<b>Figura 4.</b> Micotoxinas relevantes producidas por <i>Penicillium</i> spp. ....	24
<b>Figura 5.</b> Características macroscópicas de distintas especies de <i>Aspergillus</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Estructura microscópica de <i>Aspergillus</i> spp. ....	26
<b>Figura 7.</b> Ciclo de vida de <i>Aspergillus</i> spp. ....	27
<b>Figura 8.</b> Aflatoxinas principales producidas por <i>Aspergillus</i> spp. ....	28
<b>Figura 9.</b> Componentes de la kombucha .....	29
<b>Figura 10.</b> Interacciones microbianas de la kombucha en el proceso de fermentación .....	30
<b>Figura 11.</b> Esquema gráfico de la macrodilución en caldo .....	33
<b>Figura 12.</b> Características macro y microscópicas de <i>Penicillium</i> spp. y <i>Aspergillus</i> spp. ....	35
<b>Figura 13.</b> Kombucha de té negro y verde en los diferentes días de fermentación.....	36
<b>Figura 14.</b> Variación del pH de la kombucha de té verde y negro en función de los días de fermentación .....	37
<b>Figura 15.</b> ANOVA y prueba de comparación de Duncan del pH de la kombucha de té verde y negro .....	38
<b>Figura 16.</b> Variación de los azúcares totales de la kombucha de té verde y negro en función de los días de fermentación.....	39
<b>Figura 17.</b> ANOVA y prueba de comparación de Duncan de los azúcares totales de la kombucha de té verde y negro .....	40
<b>Figura 18.</b> Concentración mínima inhibitoria de la kombucha de té verde y negro a diferentes días de fermentación y su relación con la cepa fúngica.....	41

- Figura 19.** Concentración mínima fungicida de la kombucha de té verde y negro a diferentes días de fermentación y su relación con la cepa fúngica..... 43
- Figura 20.** Difusión en agar con discos impregnadas con fluconazol (FL), kombucha de té verde (KV), kombucha de té negro (KN), té negro (TN) y té verde (TV) en cultivos de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. .... 44
- Figura 21.** Difusión en agar con discos impregnadas con fluconazol (FL), SCOBY de kombucha té verde (BV), SCOBY de kombucha té negro (BN), té negro (TN) y té verde (TV) en cultivos de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. .... 45

**Abreviaturas**

<b>SCOBY</b>	Consortio de bacterias y levaduras (siglas en inglés)
<b>OTA</b>	Ocratoxina A
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Fúngica
<b>CMF</b>	Concentración Mínima Fungicida
<b>PDA</b>	Agar Papa Dextrosa
<b>CFU</b>	Unidades Formadoras de Colonias (siglas en inglés)
<b>KTV</b>	Kombucha Té Verde
<b>KTN</b>	Kombucha Té Negro
<b>TV</b>	Té Verde
<b>TN</b>	Té Negro
<b>FL</b>	Fluconazol
<b>BV</b>	Biofilm de kombucha de té negro
<b>BN</b>	Biofilm de kombucha de té verde
<b>mm</b>	milímetros
<b>g</b>	gramos
<b>L</b>	Litros
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza

## Resumen

La kombucha es una bebida que resulta de la fermentación aerobia de té, azúcar, agua y un consorcio simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), y que al presentar características antifúngicas se recurre a evaluar su efecto inhibitorio contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. Se experimentó con dos bebidas de kombucha provenientes de té verde y negro con tiempo de fermentación de 0, 7, 14, 21 y 28 días, a las que se caracterizó pH y azúcares totales; y para determinar su actividad antifúngica se realizaron ensayos de macrodilución y difusión en disco. Con la prueba de macrodilución se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) más baja (0,0625 V/V) la obtuvo la kombucha de té verde al día 21 de fermentación, además de que el valor del CMI fue igual a la concentración mínima fungicida (CMF) en toda la experimentación; y en la difusión en disco se presentaron halos de inhibición solo de la kombucha de té negro y de su SCOBY a partir del día 21 de fermentación. Si bien es cierto, cada una de las pruebas determinan que un tipo de kombucha inhibe mayoritaria a los hongos, la prueba de difusión en disco mostró que no es propicia para evaluar la acción de las dos kombuchas; con esto se ratifica que es la kombucha de té verde la que tiene un efecto inhibitorio mayor que la kombucha de té negro, además de que su acción es mayor en *Aspergillus* spp. que en *Penicillium* spp.

*Palabras clave:* kombucha, actividad antifúngica, inhibición, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.

### Abstract

Kombucha is a beverage that results from the aerobic fermentation of tea, sugar, water and a symbiotic consortium of bacteria and yeasts (SCOBY), and that by presenting antifungal characteristics is resorted to evaluate its inhibitory effect against *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. Two kombucha beverages from green and black tea with fermentation time of 0, 7, 14, 21 and 28 days were tested and characterized for pH and total sugars; and to determine their antifungal activity, macrodilution and disc diffusion methods were performed. With the macrodilution test, it was determined that the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) (0.0625 V/V) was obtained by the green tea kombucha at day 21 of fermentation, in addition to the fact that the MIC value was equal to the minimum fungicidal concentration (MFC) throughout the experiment; and in the disk diffusion, inhibition halos were present only for the black tea kombucha and its SCOBY from day 21 of fermentation. Although, each of the tests determines that one type of kombucha inhibits the majority of fungi, the disc diffusion test showed that it is not favorable for evaluating the action of the two kombuchas; this confirms that it is the green tea kombucha that has a greater inhibitory effect than the black tea kombucha, in addition to the fact that its action is greater on *Aspergillus* spp. than on *Penicillium* spp.

*Key words:* kombucha, antifungal activity, inhibition, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.



## Capítulo I: Introducción

### Formulación de problema

Los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son hongos filamentosos, saprofiticos y ambientales que se encuentran distribuidos mundialmente; en particular estos dos géneros son considerados ubicuos encontrándose en el suelo, material en descomposición, aire, ambientes cerrados, semillas, etc. (Matrood & Rhouma, 2021). Su interés de estudio se ha centrado en el rol que desempeñan como patógenos en humanos y animales, consecuencia de las micotoxinas que generan, provocando problemas respiratorios y digestivos si se consumen (Pitt J. , 1994).

Aunque *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. afectan tanto a la salud de humana y animal, hay más incidencia de afectación por alimentos contaminados con micotoxinas en los animales (Mosquito *et al.*, 2021); de hecho, el estudio de Rosa *et al.* (2006) evaluó la microflora de los alimentos avícolas encontrando ocratoxina A (OTA), micotoxina producida tanto por *Aspergillus* y *Penicillium* (Fung & Clark, 2004).

Hay una importancia económica y de salud dirigida a los animales que son destinados a engorde, por tal motivo es que la afectación fúngica resulta en una de las preocupaciones por los ganaderos dadas las pérdidas económicas que se pueden llevar en la industria; es por ello que se debe llevar a cabo medidas de control, saneamiento y la utilización de agentes antifúngicos que mitiguen el problema (Kuldeep *et al.*, 2013). Una de las alternativas naturales para la inhibición de hongos se centra en la kombucha, bebida tradicional fermentada, a la que se le atribuye propiedades antifúngicas por los componentes que posee (Battik *et al.*, 2012).

## Justificación de problema

Las enfermedades fúngicas causadas por micotoxinas en humanos y animales han aumentado al pasar los años debido a la resistencia a los fármacos antifúngicos (azoles); sin embargo, cabe recalcar que a la micosis animal se le ha prestado menos atención (Álvarez *et al.*, 2021). No fue hasta 2010 donde se establece el Grupo de Trabajo de Micología Veterinaria de ISHAM, el cuál empezó investigaciones centradas en los hongos que afectan varias especies animales por micotoxinas y su importancia de combatirlos para mejorar la salud de los mismos (Seyedmousavi *et al.*, 2018).

*Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. son considerados hongos patógenos con incidencia mayoritaria en animales, afectando principalmente a aves de corral en un 18,4% y 15,6% respectivamente (Byrd *et al.*, 2017). En Ecuador hay varios estudios sobre la detección de hongos en las camadas avícolas, encontrándose con más frecuencia *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. en la cascarilla de arroz y en los pollos de engorde (Encalada, 2011).

Dada la importancia económica que genera la industria avícola, resulta crucial encontrar métodos de inhibición fúngica para mantener control sanitario y evitar pérdidas. Es así, que el uso de kombucha se presenta como una alternativa para mitigar hongos, dado que su composición asociada a la presencia de ácido acético, flavonoides y fenoles le otorga características antifúngicas (Mousavi *et al.*, 2020); lo que ha causado interés en evaluar su potencial antifúngico contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. en este estudio.

## **Objetivos de investigación**

### ***Objetivo General***

Evaluar el efecto inhibitorio de kombucha de té negro y verde en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.

### ***Objetivos Específicos***

- Elaborar kombucha de té negro y verde a partir de bibliografía.
- Caracterizar las propiedades físico-químicas de pH y azúcares totales en la kombucha a los 0, 7, 14, 21 y 28 días.
- Determinar el efecto de inhibición de la kombucha de té verde y negro en *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. mediante pruebas de susceptibilidad antifúngica.

## Capítulo II: Marco Teórico

### Hongos patógenos

A nivel mundial existen 100 000 especies de hongos descritas, de las cuales alrededor de 600 son considerados patógenos potenciales de humanos, animales y plantas; estas afectaciones han causado problemas en la salud y pérdidas económicas en el área agrícola y de cría de animales (American Society for Microbiology, 2017). Las especies de hongos que parasitan animales y plantas suelen ser en su mayoría de tipo saprofítico y/o mutualista, pertenecientes a la división ascomicetos o basidiomicetos, grupo en el que se encuentra *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Gladieux *et al.*, 2017).

### *Penicillium* spp.

*Penicillium* es un hongo filamentoso, considerado ubicuo por encontrarse distribuido en una diversidad de hábitats como suelos, vegetaciones, ambientes internos húmedos, aire y ciertos productos de comida (Visagie *et al.*, 2014). Está distribuido mundialmente, encontrándose desde la Antártida, pasado por los trópicos y llegando hasta Groenlandia (Pitt J. L., 2006), por tal motivo es que varias especies del género *Penicillium* crecen en ambientes extremos como a bajas y altas temperaturas, bajos niveles de oxígeno y acidez, altas concentraciones de azúcar y sales (Srinivasam *et al.*, 2020). Además, *Penicillium* spp. son saprofíticos ambientales, caracterizados por alimentarse de materia orgánica en descomposición (Houbraken *et al.*, 2014).

### **Taxonomía**

Link (1809) introduce el nombre *Penicillium*, significado de “cepillo”, y describe tres especies de este género; luego de ello se agregaron más, llegando a constatarse 354 especies aceptadas para este género (Visagie *et al.*, 2014). Como tal, el género *Penicillium* pertenece al reino Fungi, división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae (Srinivasam *et al.*, 2020).

### ***Caracterización Morfológica***

Macroscópicamente las colonias de *Penicillium* denotan un color blanco al inicio su crecimiento, pero ese color suele cambiar a verdoso, azul verdoso, grisáceo o mantenerse en blanco al madurar el hongo (Figura 1), el crecimiento de estas colonias es rápido (INSST, 2016). Microscópicamente, la estructura de *Penicillium* se conforma de conidióforos, metulas, filiales y conidios; los conidióforos se forman densamente y su ramificación es la que determina las especies de *Penicillium*, teniendo de tipo monoverticilada, biverticilada, terverticilada y cuaterverticilada, los conidios se disponen en sucesión basípeta (el conidio más viejo en la punta y el más joven en la base) y la filial se puede encontrarse ramificada o no y es la que le da la forma de cepillo (Figura 2) (Srinivasam *et al.*, 2020).

#### **Figura 1.**

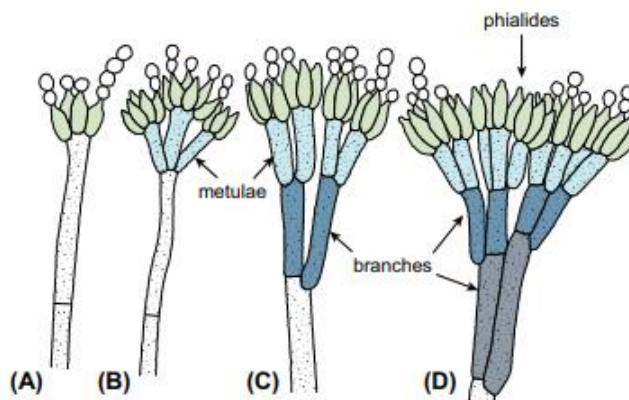
##### *Características macroscópicas de distintas especies de Penicillium*



*Nota:* Obtenido de *Identification and nomenclature of the genus Penicillium* (p. 351), por Visagie *et al.*, 2014, *Studies in Micology*.

**Figura 2.**

Estructura y tipo de ramificaciones del conidióforo de *Penicillium*



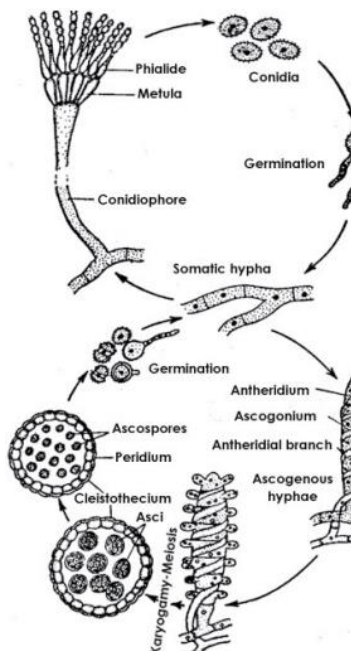
*Nota:* Tipos de ramificaciones de los conidióforos: A) monovérticilada, B) bivérticilada, C) terverticilada, y D) cuatervérticilada. Obtenido de *Penicillium* (p. 653), por Srinivasan *et al.*, 2020, Beneficial Microbes in Agro-Ecology.

### **Reproducción y Ciclo de Vida**

*Penicillium* se reproduce por tres métodos: vegetativo, asexual y sexual. La reproducción vegetativa se produce por la fragmentación de las hifas para dar lugar a los micelios; por otro lado, la reproducción asexual inicia en los conidios, que al madurar se desprenden de los conidióforos y son llevados por el viento hasta que llegan a un sustrato y que, al darse las condiciones de crecimiento, el núcleo de los conidios crece, se dividen mitóticamente y emerge el tubo germinativo que da lugar a un nuevo micelio (Chegg, 2021). En el caso de la reproducción sexual, se ven involucrados antheridium (parte femenina) y ascogonium (parte masculina), que al ponerse en contacto se disuelven las paredes para dar lugar a poros permitiendo la fusión de los núcleos femeninos y masculinos, los cuales se organizan en pares para dar lugar al núcleo diploide de la célula ascus, que por meiosis forma ocho ascosporas en el ascus y al liberarse germinan para producir el micelio (Abdel & Hosny, 2016).

**Figura 3.**

*Ciclo de vida del Penicillium spp.*



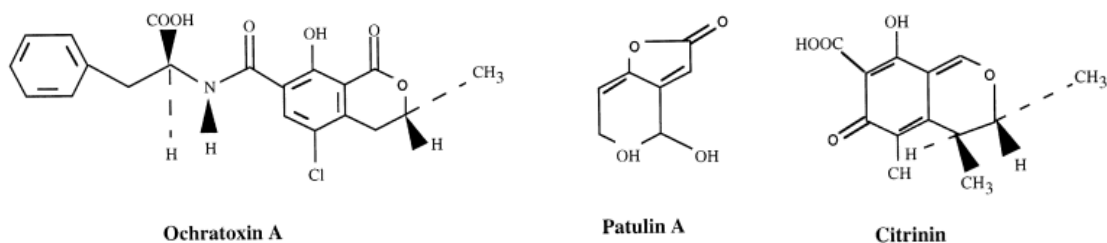
*Nota:* Obtenido de *Micology* (p- 56), por Abdel & Hosny (2016).

### ***Micotoxinas***

En el género *Penicillium* se han identificado 32 micotoxinas provenientes de comida (cereales, maíz, sorgo, maní, frutas, etc.) y piensos; de estas las más relevantes o importantes producidas por este género son ocratoxina A (OTA), patulina y citrinina (Otero *et al.*, 2020). La OTA es una nefrotoxina derivado de la isocumarina ligado con L-fenilalanina y se considera teratogénica, cancerígena, hepatotóxica e inmunotóxica; en el caso de la patulina, es un tipo de micotoxina genotóxica que se encuentra comúnmente en manzanas y productos derivados, y que causa daños de tipo teratogénico, mutagénico y carcinogénico; y la citrina estructuralmente es una metilo quinona con dos enlaces hidrogeno y es considerada una nefrotoxina que induce intoxicación renal en animales (Perrone & Susca, 2017).

Figura 4.

*Micotoxinas relevantes producidas por Penicillium spp.*



*Nota:* Obtenido de *Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species* (p.143), por Sweeney & Dobson, 1998.

### ***Aspergillus* spp.**

*Aspergillus* es un tipo de hongo filamentoso anamórfico (asexual), sin embargo, ciertas especies son teleomorfas (sexuales) (Richardson & Hope, 2009). Se considera uno de los hongos con más abundancia en el mundo, y presentan ciertas características como ser ubicuos, saprofiticos, crecer a diferentes temperaturas (6-55°C) y baja humedad, dispersión de esporas rápida y considerarse patógeno oportunista de animales y humanos (Krijgsheld *et al.*, 2013).

### ***Taxonomía***

El género *Aspergillus* fue descrito en 1729 por el biólogo italiano Pietro Micheli, dándole ese nombre porque la formación de las esporas era igual al rociador de agua bendita, denominado aspergilium; además se describieron un total de 339 especies para este género de hongo (Pimenta *et al.*, 2020). *Aspergillus* pertenece al reino Fungi, división Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales y familia Trichocomaceae (Klich & Pitt, 1988).

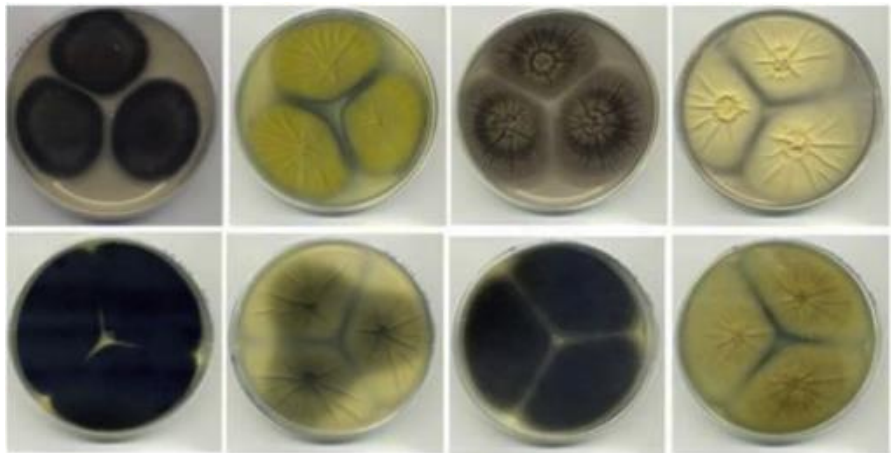


### ***Caracterización Morfológica***

Macroscópicamente *Aspergillus* el crecimiento de las colonias es rápido, mostrando una coloración gris, verde, pardo, negro, blanco y amarillo dependiendo de la especie (Figura 5) (Carrillo, 2003); y microscópicamente consta de una estructura formada por el conidióforo o estipe, vesícula, filiae, conidios, y en ocasiones metula; donde la presencia determina un conidióforo biseriado y la ausencia uniseriado, además la disposición de las cadenas de conidios pueden darse de forma radial o columnar (Figura 6) (Guarro *et al.*, 2010).

#### **Figura 5.**

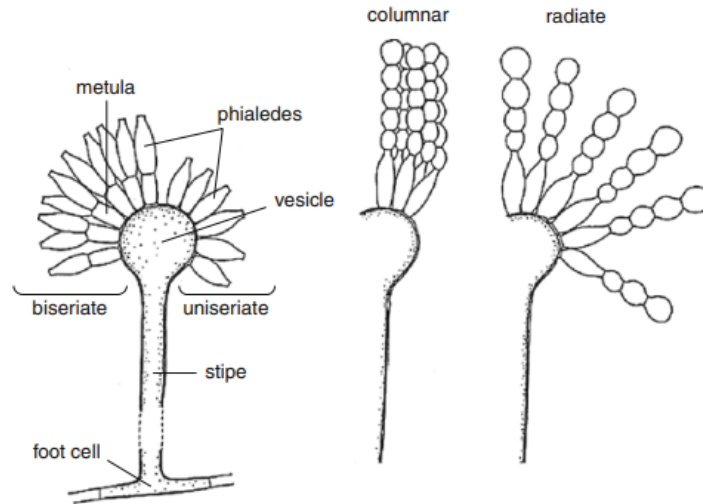
*Características macroscópicas de distintas especies de Aspergillus*



*Nota:* Obtenido de *Morphological and Molecular Diversity of Aspergillus from Corn Grain* (p. 4), por Zulkifli & Zakaria, 2017, Journal of Biosciences.

**Figura 6.**

*Estructura microscópica de Aspergillus spp.*



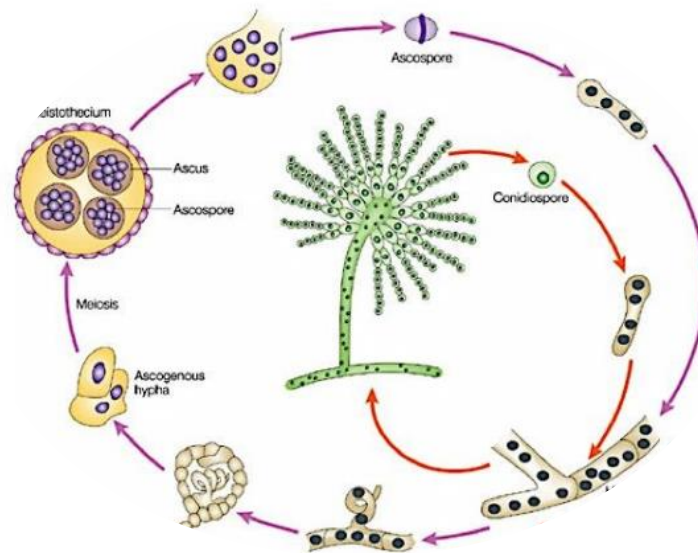
*Nota:* Obtenido de *Differences and Similarities Amongst Pathogenic Aspergillus Species* (p. 9), por Guarro *et al.*, 2017, *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*

### **Reproducción y Ciclo de Vida**

*Aspergillus* tiene tres tipos de reproducción: vegetativa, asexual y sexual, de estos tres tipos la asexual es la más común en el género (Krijgheld *et al.*, 2013). La reproducción vegetativa se da por fragmentación, donde la hifa se rompe para dar paso a otro cuerpo vegetativo; en el caso de la reproducción asexual, ya formada toda la estructura del hongo los conidios o esporas maduros se liberan de los filiales y al tener las condiciones óptimas de crecimiento se forma el tubo germinativo dando lugar a una nueva hifa; y para que se efectúe la reproducción sexual, el hongo debe presentar tanto hifas femeninas (ascogonium) y masculinas (antheridium), que al ponerse en contacto se fusionan dando lugar a una hifa fecundada que permite la formación de ascocarpo en donde se forman 8 ascosporas que al madurar se liberan, forman el tubo germinativo y dan lugar a nuevas hifas (Ashour, 2014).

**Figura 7.**

*Ciclo de vida de Aspergillus spp.*



*Nota:* Las flechas rojas representan la reproducción asexual y las moradas la sexual de *Aspergillus* spp.

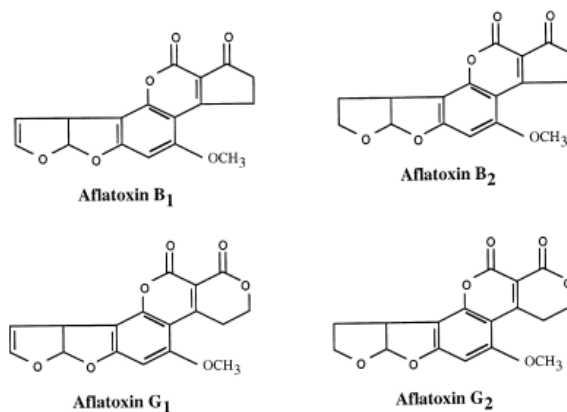
Obtenido de *Control of Sexual Reproduction in Aspergillus Species* (p. 4), por Ashour, 2014.

### ***Micotoxinas***

Son varias las micotoxinas generadas por *Aspergillus* spp., siendo las aflatoxinas las que produce mayoritariamente este género; este tipo de micotoxina son derivados de difuranocumarinas, se encuentran contaminando piensos y alimentos, y las principales son aflatoxina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Figura 8) (Sweeney & Dobson, 1998).

**Figura 8.**

*Aflatoxinas principales producidas por Aspergillus spp.*



*Nota:* Obtenido de *Mycotoxin production by Aspergillus, Fusarium and Penicillium species* (p. 143), por Sweeney & Dobson, 1998.

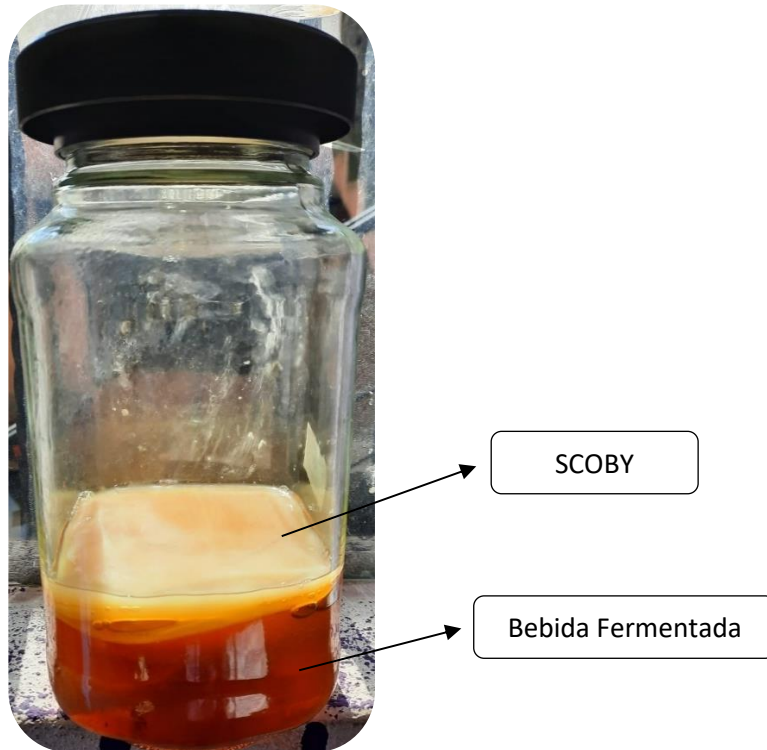
## Kombucha

La kombucha es una bebida fermentada de té endulzado y un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), que se compone de dos partes, una líquida y otra sólida que es el biofilm que se forma en la superficie (Figura 9) (Al-Mohammadi *et al.*, 2021).

El proceso de fermentación de la kombucha se lleva a cabo debido a los varios microorganismos que conforman el consorcio simbiótico del biofilm inicial que son bacterias ácido acéticas como *Komagateibacter spp.*, *Gluconobacter spp.*, *Acetobacter spp.*, bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Lactococcus*, y levaduras tales como *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*; permitiendo así, dar lugar al nuevo biofilm y una bebida con características ácidas (Coton *et al.*, 2017).

**Figura 9.**

*Componentes de la kombucha*



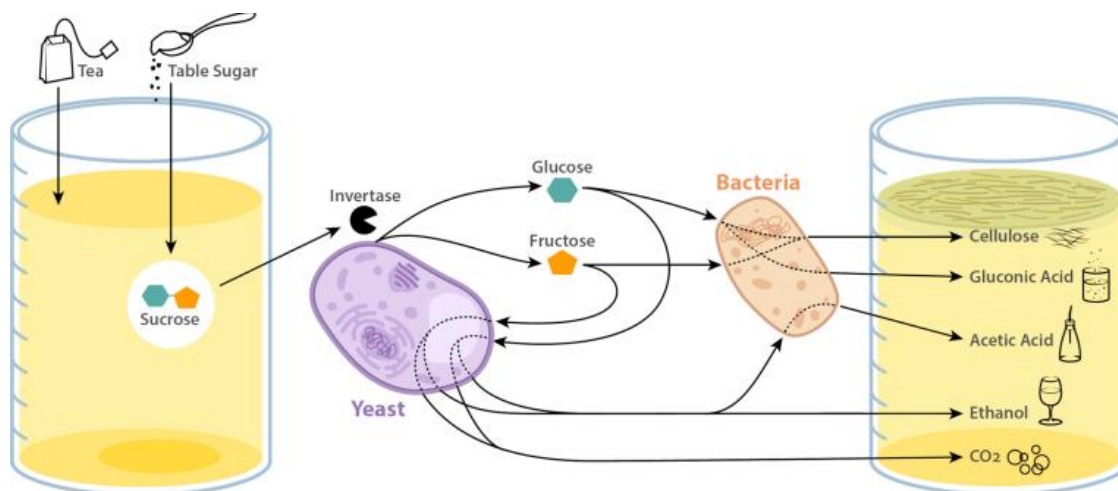
*Nota:* Imagen propiedad de autor

### **Reacciones Bioquímica en la kombucha**

Durante el proceso de fermentación de la kombucha ocurren reacciones enzimáticas que dan lugar a la formación del biofilm y componentes en el té fermentado; estas reacciones primero ocurren cuando las levaduras producen invertasa que actúa en la ruptura de la sacarosa en glucosa y fructosa, y luego convierte estos monómeros en dióxido de carbono y etanol; y después las enzimas de las bacterias oxidan el etanol produciendo ácido acético, y a su vez toman la fructosa y glucosa para formar celulosa y dar lugar a la formación del biofilm (Figura 10) (May *et al.*, 2019).

Figura 10.

*Interacciones microbianas de la kombucha en el proceso de fermentación*



*Nota:* Obtenido de *Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem* (p. 5), por May *et al.*, 2019, PeerJ.

### Composición química de la kombucha

La composición química de la kombucha no ha sido estable debido a que cambia dependiendo de la composición química del hongo y la región donde se lo prepare (Jayabalan *et al.*, *Kombucha Tea: Metabolites*, 2017); sin embargo, son los ácidos orgánicos (ácidos glucónico, acético, glucurónico, oxálico, láctico, pirúvico, malónico, tartárico, cítrico, málico, oxálico, pirúvico), azúcares (fructosa, glucosa), 14 aminoácidos, vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y C), lípidos, proteínas, enzimas hidrolíticas, minerales, aniones los componentes usuales de esta bebida fermentada (Jayabalan *et al.*, 2014).

### Hipótesis de investigación

La kombucha de té verde tiene un mayor efecto inhibitorio sobre *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.*, que la Kombucha de té negro.

## Capítulo II: Materiales y métodos

### Identificación de los hongos

La identificación de los cultivos de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. se realizó mediante una impronta y tinción con azul de lactofenol; para ello, en una placa portaobjetos se colocó 1 gota del colorante, a parte se cortó un segmento de cinta adhesiva transparente de aproximadamente 2 cm, se unieron sus extremos y una de sus superficies adhesivas se pegó al asa micológica, posteriormente se tocó la superficie del cultivo de hongo con el lado adhesivo de la cinta para luego colocarla sobre la gota del colorante, se aplicó un poco de presión y finalmente se observó en el microscopio (López *et al.*, 2014).

### Preparación de la kombucha

Los cultivos iniciales de Kombucha o SCOBY se obtuvieron de la marca comercial Con Amor. La elaboración de Kombucha se realizó a partir de una infusión con 3.2 g de té (dos bolsas) en un litro de agua hirviendo por 3 minutos, luego se retiraron las bolsas de té y se agregaron 50 g/L de azúcar, se dejó enfriar hasta que se alcanzó una temperatura ambiente. A continuación, se pesó 30 g/L del SCOBY y se lo colocó en la infusión de té, finalmente se le añadió 100 ml/L de un lote de Kombucha producido anteriormente (Rezende *et al.*, 2019).

### Tiempo de fermentación

Los lotes producidos de kombucha de té verde y negro experimentaron un tiempo de fermentación aerobia de 0, 7, 14, 21 y 28 días; tiempo considerado para su análisis contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.

### Determinación de pH y azúcares totales

El pH y los azúcares totales de la kombuchas de té verde y negro a los diferentes días de fermentación, se midieron con potenciómetro y refractómetro respectivamente.

### **Cultivo de los inóculos fúngicos**

*Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. se sembraron en medio PDA con un tiempo de incubación de 72 horas a 25°C.

### **Preparación de las suspensiones fúngicas**

Mediante un hisopado se toma la muestra cada uno de los hongos y se suspende en tubos con agua destilada estéril alcanzando una turbidez 0.5 McFarland correspondiente a  $1 \times 10^6$  CFU/mL (Khan *et al.*, 2006); en total se utilizaron 36 mL de cada una de las suspensiones fúngicas.

### **Pruebas de susceptibilidad antifúngica**

Antes de realizar los ensayos y después de efectuado el correspondiente tiempo de fermentación, la kombucha se filtra utilizando papel Whatman según la técnica determinada por Rezende *et al.*, (2019).

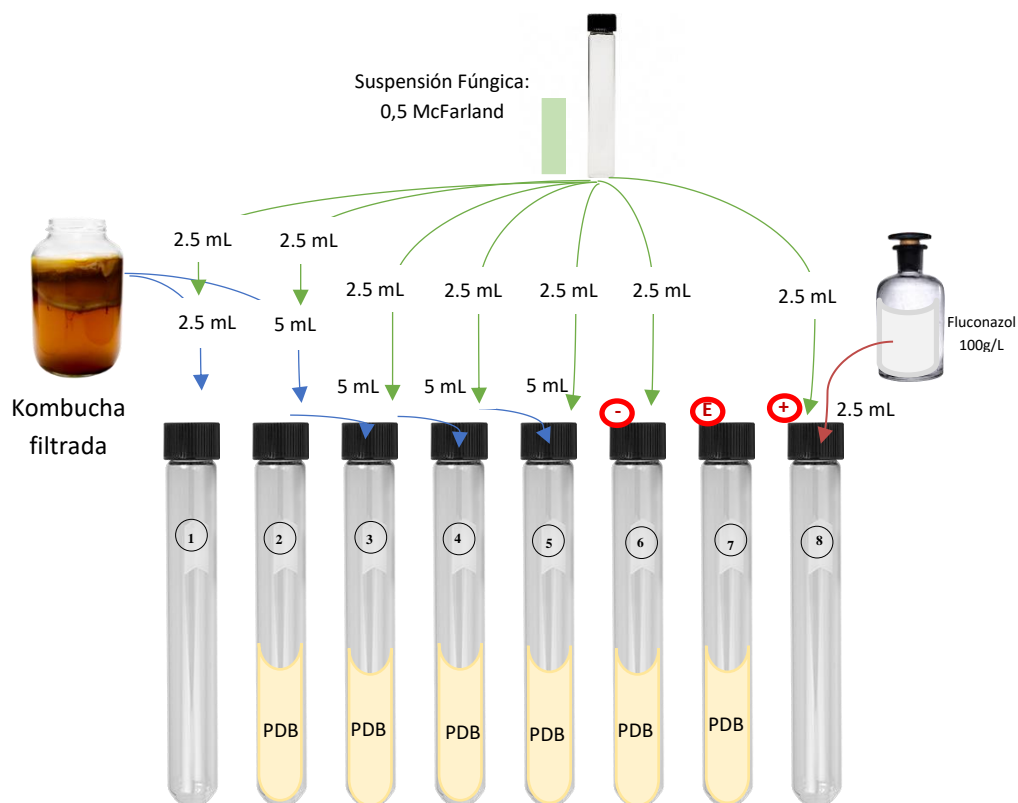
### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF)**

El método de macrodilución en caldo se propició para determinar CMI de la kombucha de té verde y negro a los diferentes días de fermentación contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. Se siguió la metodología planteada por CLSI (2018) con una adaptación a hongos, para lo cual se prepararon 32 tubos, de los cuales 24 contenían 2,5 ml de Caldo Papa Dextrosa (PDB) y los demás estaban estériles, luego se pasaron a realizar las diluciones seriadas con Kombucha, PDB y las suspensiones fúngicas; además se contó con un control negativo, positivo (fluconazol) y de esterilidad (Figura 11). Los volúmenes finales y el contenido de cada tubo se describen en el Apéndice 1. La variable de respuesta considerada para la determinación del CMI es la presencia-ausencia del hongo.



Figura 11.

Esquema gráfico de la macrodilución en caldo



*Nota: el esquema representa los volúmenes de kombucha, PDB y solución fúngica utilizadas para diluciones seriadas con factor de dilución 1:2 (tubo 1 al 5), y los controles: negativo (tubo 6), de esterilidad (tubo 7) y positivo (tubo 8).*

Para la CMF se tomó 100  $\mu$ L del tubo considerado CMI, y dicha muestra se sembró en medio PDA mediante extensión en placa y se dejó incubar por 72 horas a 25°C. Se realizó una tinción Gram de los cultivos obtenidos.

### **Método de difusión en disco**

Para determinar la actividad antifúngica de la Kombucha de té verde y negro contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. se empleó el método de difusión en disco. El método consiste en que con un hisopo se toma la muestra ajustada a una escala apropiada de McFarland, luego se inocula el medio realizando movimientos seguidos de lado a lado con el hisopo y finalmente se colocan discos de papel de 6 mm de diámetro (Battik *et al.*, 2012); en este caso en cada caja Petri inoculada con el respectivo hongo, se le colocaron 5 discos impregnados con 200  $\mu$ L de kombucha de té negro, kombucha de té verde, infusiones de té negro y verde como controles negativos y fluconazol comercial de 200 y 300 mg como control positivo respectivamente. Por otro lado, también se colocaron 3 discos de papel impregnados con 200  $\mu$ L de infusiones de té negro y verde y de fluconazol comercial respectivamente, y el SCOBY de té verde y negro. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 72 horas.

### **Análisis estadístico**

Se lleva a cabo un diseño experimental comparativo simple en el tiempo, considerando tres repeticiones. El análisis de los resultados se realizó en el programa estadístico InfoStat, donde se efectuó análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación Duncan manteniendo un valor- $p < 0,05$ . Los gráficos fueron generados por el mismo software estadístico.

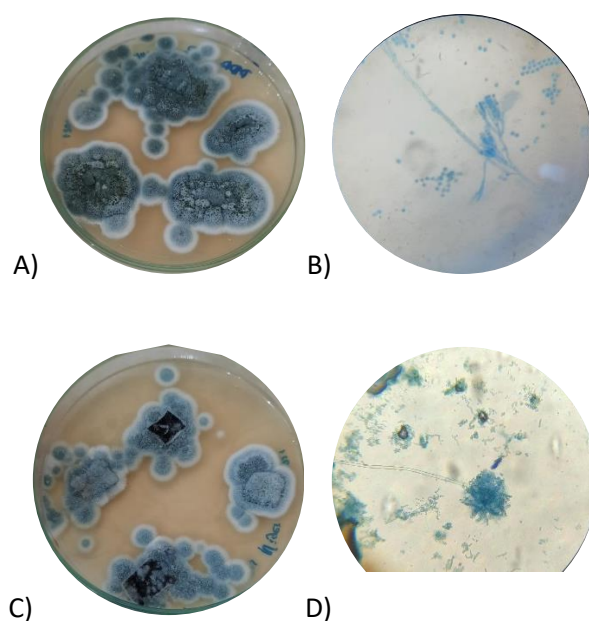
### Capítulo III: Resultados

#### Identificación de las cepas fúngicas

Los aislados obtenidos de cepas fúngicas, se corroboraron que por características macro y microscópica pertenecen a los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* respectivamente (Figura 12).

#### Figura 12.

*Características macro y microscópicas de Penicillium spp. y Aspergillus spp.*



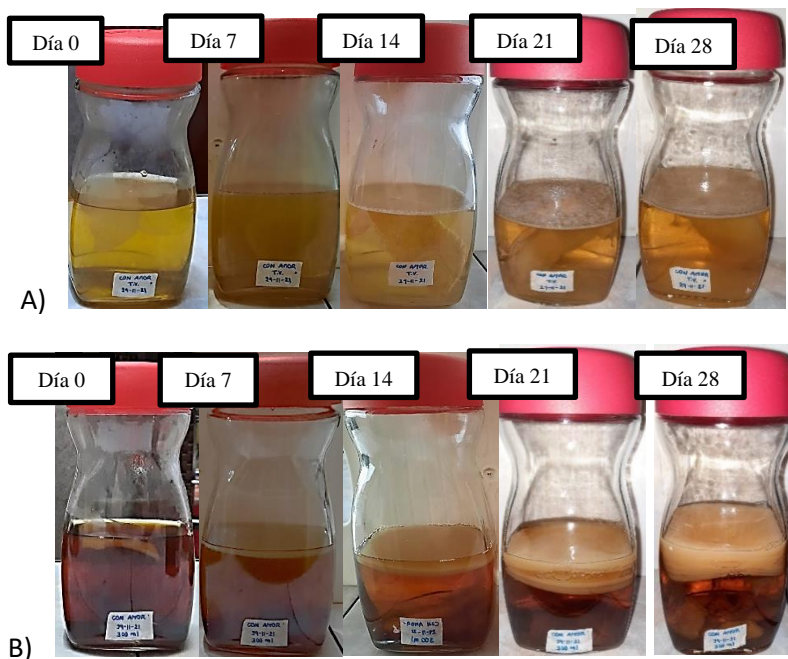
*Nota: Vista macroscópica y microscópica de A) y B) Penicillium spp., y de C) y D) Aspergillus spp.*

#### Fermentación kombucha de té verde y negro

Durante los días 0, 7, 14, 21 y 28 de fermentación aerobia de la kombucha hay un notable crecimiento gradual del SCOBY y carbonatación en la bebida; sin embargo, la kombucha de té negro presenta un SCOBY de mayor tamaño comparado a la de té verde (Figura 13).

**Figura 13.**

*Kombucha de té negro y verde en los diferentes días de fermentación*



*Nota.* El gráfico representa las características macroscópicas de la Kombucha de A) té verde y B) té negro a los 0, 7, 14, 21 y 28 días de fermentación.

## pH

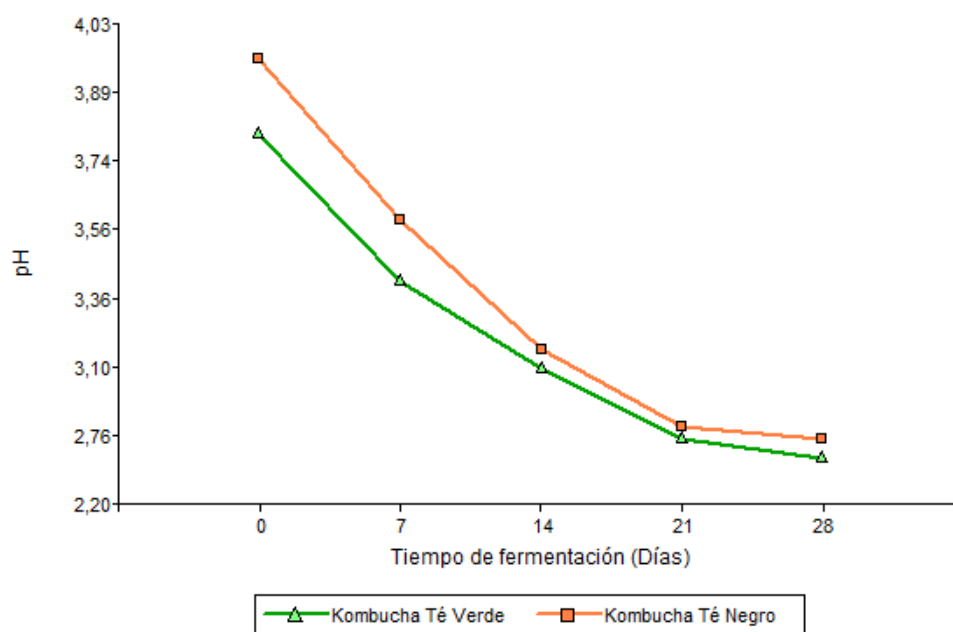
Se realizaron mediciones del pH de la kombucha de té verde y negro por triplicado los diferentes días de fermentación, de las cuáles se sacó un promedio (Apéndice 2) que fue el utilizado para el análisis de resultados.

El pH de las kombuchas disminuyó a medida que el tiempo de fermentación aumentaba, pasando de 3,80 en el día 0 a 2,61 en el día 28 para el caso de a kombucha de té verde; y de 3,97 en el día 0 a 2,74 en el día 28 para la kombucha de té negro (Figura 14); por lo que la kombucha de té verde resulta ser más más ácida desde su primer día de fermentación en comparación con la kombucha proveniente del té negro.

Con el ANOVA se estable que los días de fermentación, el tipo de kombucha y su interacción son significativas dado a que exponen un valor- $p < 0,0001$ ; y en la prueba de comparación de Duncan los días de fermentación con el tipo de kombucha muestran diferencias significativas en relación al pH, a excepción de los días 21 con KTV y 28 con KTN que tiene un pH igual de 2,74 (Figura 15). De todas las interacciones, el día 28 de fermentación y la kombucha de té verde muestran el pH más bajo (2,61).

**Figura 14.**

*Variación del pH de la kombucha de té verde y negro en función de los días de fermentación*



*Nota:* Gráfica creada en InfoStat

Figura 15.

ANOVA y prueba de comparación de Duncan del pH de la kombucha de té verde y negro

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
pH	40	1,00	1,00	0,26

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

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	8,35	9	0,93	13572,46	<0,0001
Días	8,17	4	2,04	29908,12	<0,0001
Kombucha	0,15	1	0,15	2250,15	<0,0001
Días*Kombucha	0,02	4	4,6E-03	67,37	<0,0001
Error	2,0E-03	30	6,8E-05		
Total	8,35	39			

#### Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,0001 gl: 30

Días	Kombucha	Medias	n	E.E.	
28	KTV	2,61	4	4,1E-03	A
21	KTV	2,74	4	4,1E-03	B
28	KTN	2,74	4	4,1E-03	B
21	KTN	2,81	4	4,1E-03	C
14	KTV	3,09	4	4,1E-03	D
14	KTN	3,17	4	4,1E-03	E
7	KTV	3,41	4	4,1E-03	F
7	KTN	3,59	4	4,1E-03	G
0	KTV	3,80	4	4,1E-03	H
0	KTN	3,97	4	4,1E-03	I

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

*Nota:* La gráfica determinada en InfoStat muestra la significancia estadística de datos de los días de fermentación, el tipo de té de kombucha (KTV: kombucha de té verde y KTN: kombucha de té negro) y su interacción en relación a las medidas de pH.

#### Azúcares totales

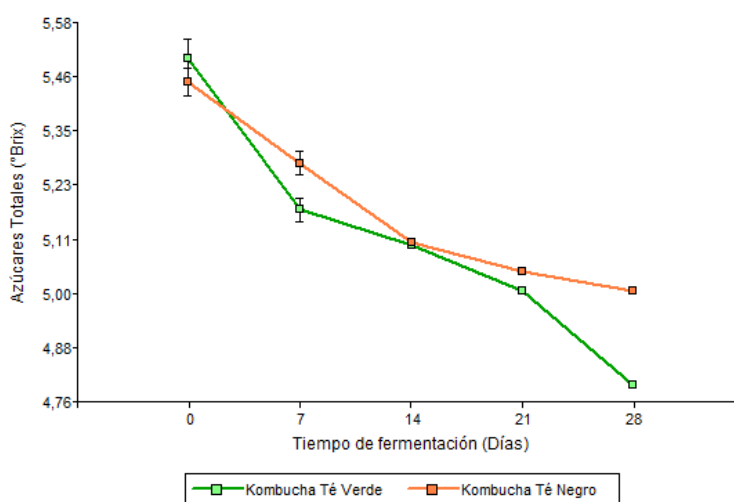
Se realizaron mediciones por triplicado de los azúcares totales (°Brix) de la kombucha de té verde y negro a los diferentes días de fermentación; y de estas mediciones se sacó un promedio (Apéndice 3) que fue el utilizado para el análisis de resultados.

Los azúcares totales, medidos en °Brix, de la kombucha de té verde y negro mostraron el mismo comportamiento que el pH en los diferentes días de fermentación, es decir que a más días de fermentación menos cantidad de azúcares. Siendo así que, en el caso de la kombucha de té verde pasó de 5,50 °Brix en el día 0 a 4,80 °Brix en el día 28, y en el de la kombucha de té negro de 5,45 °Brix en el día 0 a 5 °Brix en el día 28 (Figura 16); por lo que, la kombucha de té verde presenta una mayor disminución de azúcares totales en el tiempo en comparación con la kombucha de té negro.

Con el ANOVA se estable que los días de fermentación, el tipo de kombucha y su interacción son significativas dado a que exponen un valor-p < 0,0001 en relación a los azúcares totales; y en la prueba de comparación de Duncan los días de fermentación 7 de dos tipos de kombucha (KTV y KTN) y el día 28 de la kombucha de té verde (KTV) son significativas ya que se agrupan en letras únicas (valor-p < 0,05); de estas es la KTV a los 28 días de fermentación que tiene los °Brix más bajo (Figura 17).

**Figura 16.**

*Variación de los azúcares totales de la kombucha de té verde y negro en función de los días de fermentación*



*Nota:* Gráfica creada en InfoStat

Figura 17.

ANOVA y prueba de comparación de Duncan de los azúcares totales de la kombucha de té verde y negro

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
°Brix	40	0,97	0,97	0,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,65	9	0,18	121,08	<0,0001
Días	1,54	4	0,38	254,47	<0,0001
Kombucha	0,04	1	0,04	23,41	<0,0001
Días*Kombucha	0,07	4	0,02	12,11	<0,0001
Error	0,05	30	1,5E-03		
Total	1,69	39			

Test:Duncan Alfa=0,05  
 Error: 0,0015 gl: 30

Días	Kombucha	Medias	n	E.E.	
28	KTV	4,80	4	0,02	A
21	KTV	5,00	4	0,02	B
28	KTN	5,00	4	0,02	B
21	KTN	5,04	4	0,02	B
14	KTV	5,10	4	0,02	C
14	KTN	5,11	4	0,02	C
7	KTV	5,18	4	0,02	D
7	KTN	5,28	4	0,02	E
0	KTN	5,45	4	0,02	F
0	KTV	5,50	4	0,02	F

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

Nota: La gráfica determinada en InfoStat muestra la significancia estadística de datos de los días de fermentación, el tipo de té de kombucha (KTV: kombucha de té verde y KTN: kombucha de té negro) y su interacción en relación a las medidas de °Brix.

### Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF)

La variable de respuesta a la concentración mínima inhibitoria de la kombucha de té verde y negro a los diferentes días de fermentación contra *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. se denota mediante el último tubo con la dilución que no mostraba crecimiento del hongo. En base a ello, macroscópicamente se visualiza que el crecimiento de hongo desaparece paulatinamente en las diluciones a medida que el tiempo de fermentación de la kombucha es mayor (Apéndice 4), por tanto, la CMI disminuye en relación a que aumenta los días de fermentación para los dos hongos, y es mayor en *Aspergillus* spp. que en *Penicillium* spp. (Figura 18).

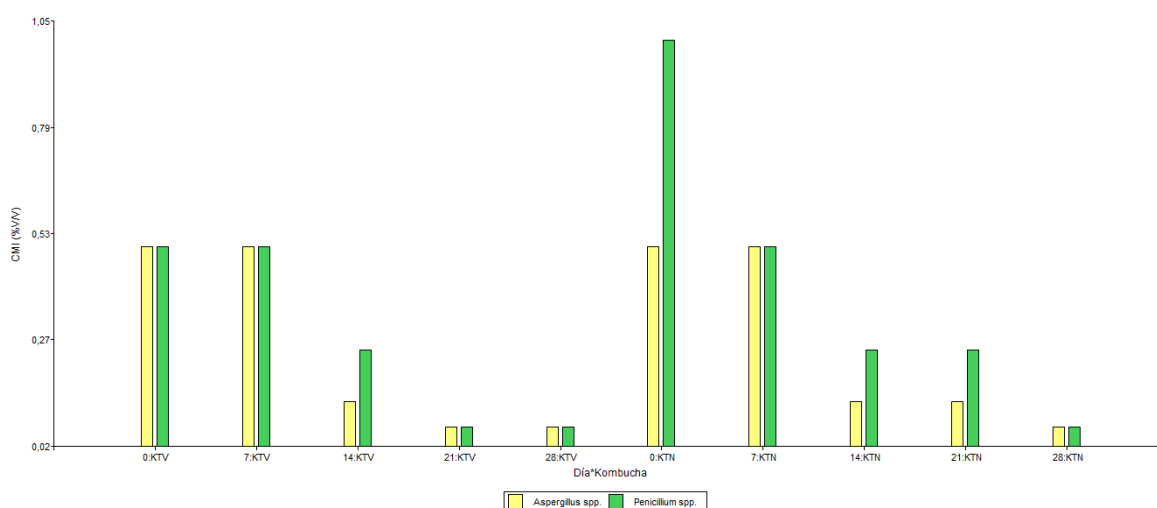


Según los resultados se determinan que la kombucha de té verde desde el día 21 de fermentación presenta el CMI más bajo (0,0625 V/V) contra los dos hongos, y lo mismo se experimenta para el día 28 de fermentación; en cambio para la kombucha de té negro el CMI más bajo (0,0625 V/V) contra los dos hongos es cuando su tiempo de fermentación es 28 días (Tabla 1).

La concentración mínima fungicida (CMF) disminuye mientras el tiempo de fermentación de la kombucha aumenta y gráficamente se determina que esta es mayor en *Aspergillus spp.* que en *Penicillium spp.* (Figura 19); además que valores de CMF resultan ser los mismos que la CMI (Tabla 1) dado a que los cultivos por extensión en placa resultaron ser levaduras, a excepción del cultivo de CMI de kombucha de té negro con 0 días de fermentación contra *Aspergillus spp.* donde creció el hongo (Apéndice 5).

**Figura 18.**

*Concentración mínima inhibitoria de la kombucha de té verde y negro a diferentes días de fermentación y su relación con la cepa fúngica.*



*Nota:* Gráfica creada en InfoStat

**Tabla 1.**

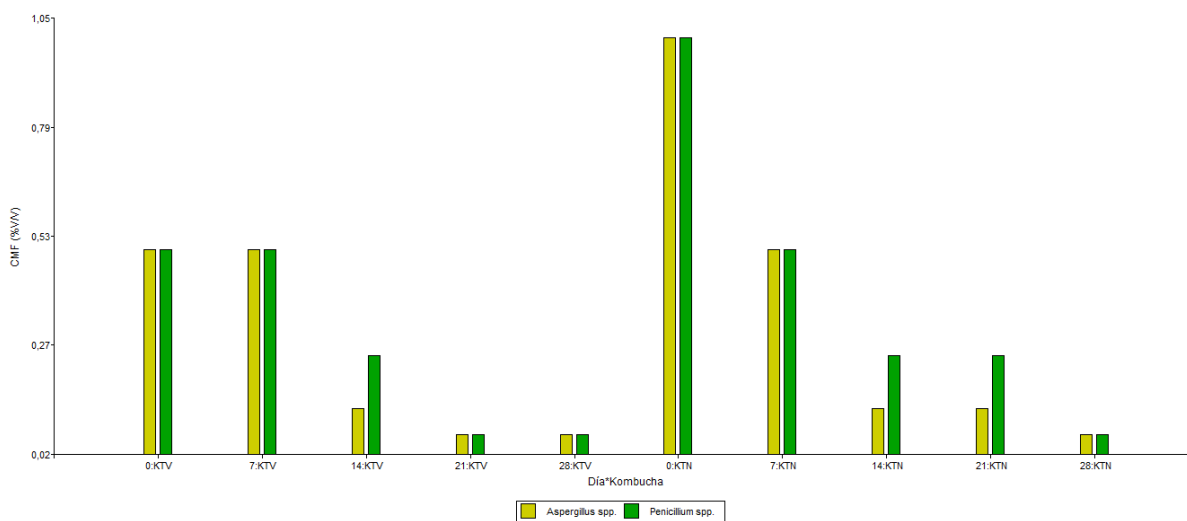
*Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (CMF) de la kombucha de té verde y negro a diferentes días de fermentación contra Penicillium spp. y Aspergillus spp.*

<b>Kombucha Té Verde</b>										
<b>Cepas Fúngicas</b>	<b>Día 0</b>		<b>Día 7</b>		<b>Día 14</b>		<b>Día 21</b>		<b>Día 28</b>	
	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>
<b><i>Penicillium spp.</i></b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<b><i>Aspergillus spp.</i></b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
<b>Kombucha Té Negro</b>										
	<b>Día 0</b>		<b>Día 7</b>		<b>Día 14</b>		<b>Día 21</b>		<b>Día 28</b>	
	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>	<b>CMI</b>	<b>CMF</b>
<b><i>Penicillium spp.</i></b>	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0625	0,0625
<b><i>Aspergillus spp.</i></b>	0,5	1	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,0625	0,0625

*Nota:* Los valores de CMI y CMF están representados en V/V

**Figura 19.**

*Concentración mínima fungicida de la kombucha de té verde y negro a diferentes días de fermentación y su relación con la cepa fúngica.*



*Nota:* Gráfica creada en InfoStat

### Difusión en disco

Se realizaron mediciones por triplicado de los halos de inhibición (mm) a los diferentes días de fermentación (Apéndice 6 y 7); y de estas mediciones se sacó un promedio que fue el utilizado para el análisis de resultados.

El método de difusión en disco evidenció que la kombucha de té negro al día 28 de fermentación tiene un efecto antifúngico leve contra *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.*, comparado al control positivo fluconazol (Figura 20). La actividad antifúngica de la kombucha de té negro es mayor sobre *Aspergillus spp.* denotando un halo de inhibición de 6,75 mm que en *Penicillium spp.* con un halo de inhibición de 6,5 mm (Tabla 2). En el caso de la kombucha de té verde al no presentar ningún halo de inhibición no tiene efecto antifúngico en ninguno de los dos hongos.

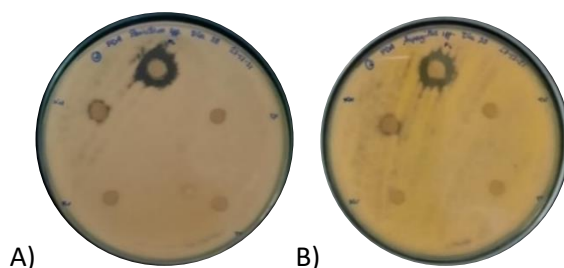
La actividad antifúngica del SCOBY se evidencia para el biofilm de kombucha de té negro el día 21 y 28 de fermentación (Figura 21); siendo el día 28 el que presenta halos de inhibición de mayor tamaño. La actividad antifúngica del SCOBY de té negro es mayor en *Aspergillus* spp. con un halo de zona de inhibición de 7,30 mm, en comparación a *Penicillium* spp. que presenta una zona de inhibición de 7,25 mm (Tabla 3). En el caso del SCOBY de té verde no tiene un efecto antifúngico frente a los dos hongos ya que no presentó halos de inhibición en ningún día de fermentación.

Las infusiones de té negro y verde, utilizadas como control negativo, como se esperaba no presentaron ningún halo de inhibición; en cuanto al control positivo (fluconazol), se obtuvo halos de inhibición un tanto distintos debido a que para el día 0 y 28 se utilizó fluconazol comercial de 300 mg y para los demás días se utilizó fluconazol comercial de 200 mg (Tabla 2 y 3), entonces como tal se obtuvo un halo promedio de 9,76 mm para *Penicillium* spp. y 11,12 mm para *Aspergillus* spp.

Los resultados gráficos de la difusión en agar de todos los días de fermentación se encuentran en el Apéndice 8.

### Figura 20.

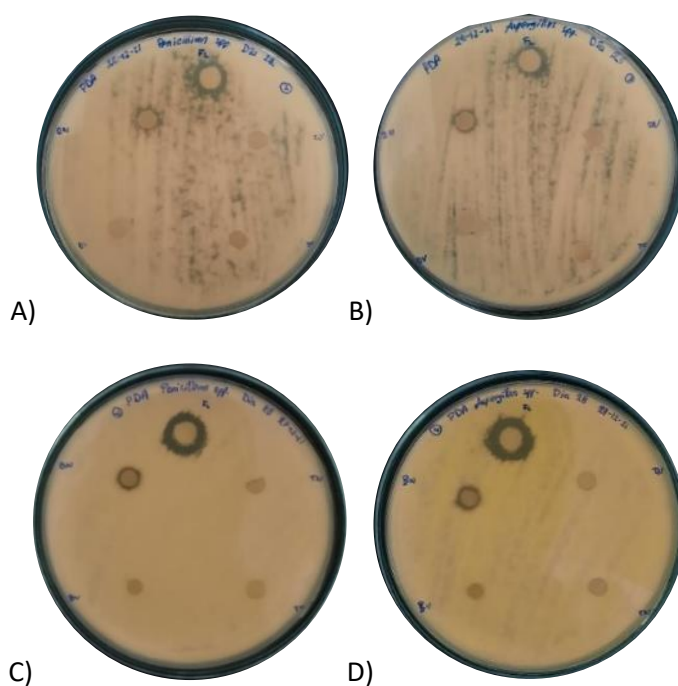
Difusión en agar con discos impregnados con fluconazol (FL), kombucha de té verde (KV), kombucha de té negro (KN), té negro (TN) y té verde (TV) en cultivos de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp.



Nota: Medio PDA inoculado con A) *Penicillium* spp. y B) *Aspergillus* spp. con discos impregnados de KV y KN de 28 días de fermentación.

**Figura 21.**

*Difusión en agar con discos impregnados con fluconazol (FL), SCOBY de kombucha té verde (BV), SCOBY de kombucha té negro (BN), té negro (TN) y té verde (TV) en cultivos de Penicillium spp. y Aspergillus spp.*



*Nota: Medio PDA inoculado con A) Penicillium spp. y B) Aspergillus spp. con discos de BV y BN de 21 días de fermentación. Medio PDA inoculado con C) Penicillium spp. y D) Aspergillus spp. con discos de BV y BN de 28 días de fermentación.*

Tabla 2.

*Diámetros de la zona de inhibición de kombucha de té verde, kombucha de té negro, té negro, té verde y fluconazol en Penicillium y Aspergillus spp.*

Días	Cepas Fúngicas	Diámetro de Inhibición (mm)				
		Kombucha Té Verde	Kombucha Té Negro	Té Verde	Té Negro	Fluconazol
0	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	13
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	13
7	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	8
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	11,25
14	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	7,75
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	9,25
21	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	8
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	8,5
28	<i>Penicillium</i> spp.	0	7,25	0	0	13
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	7,38	0	0	14

Tabla 3.

*Diámetros de la zona de inhibición de SCOBY de kombucha de té verde, SCOBY de kombucha de té negro, té negro, té verde y fluconazol en Penicillium y Aspergillus spp.*

Días	Cepas Fúngicas	Diámetro de Inhibición (mm)				
		SCOBY KTV	SCOBY KTN	Té Verde	Té Negro	Fluconazol
7	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	8,5
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	9,25
14	<i>Penicillium</i> spp.	0	0	0	0	7,5
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	0	0	0	8,75
21	<i>Penicillium</i> spp.	0	6,75	0	0	9,25
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	6,5	0	0	8,75
28	<i>Penicillium</i> spp.	0	7,25	0	0	12,75
	<i>Aspergillus</i> spp.	0	7,25	0	0	13,88

#### Capítulo IV: Discusión

Durante el tiempo de fermentación de la kombucha de té negro y verde se experimentaron cambios macroscópicos; siendo que desde el día 0 al 28, el color de ambas bebidas fermentadas se intensificó y su SCOBY mostró un engrosamiento (Figura 13). Si bien el engrosamiento del SCOBY fue mayor en la kombucha de té negro, Primiani *et al.* (2018) determina que el grosor del biofilm se debe al contenido de polifenoles en la kombucha y ratifica que es la kombucha de té verde la que contiene la mayor cantidad de estos compuestos debido a que este tipo de té no experimenta proceso de oxidación a comparación de otros; con ello se determinó que el no engrosamiento del SCOBY de kombucha de té verde se debió a que se utilizó un SCOBY adaptado a té negro en el proceso de elaboración de la kombucha de té verde, y según Antolak *et al.* (2021) el SCOBY necesita de un tiempo de adaptación a un nuevo ambiente (tipo de té).

La kombucha es una bebida que resulta de la fermentación de té, azúcar (sacarosa) y el SCOBY (bacterias ácido acéticas, ácido lácticas y levaduras); y es durante este proceso que ocurren varias reacciones bioquímicas, como la efectuada por las levaduras donde hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa para producir etanol, y la que es llevada a cabo por las bacterias que transforman la glucosa en ácido glucónico y etanol para producir ácido acético (Jayabalan *et al.*, 2014). Dada la producción de ácidos orgánicos y la ruptura de la sacarosa en sus monómeros es que el valor del pH y los azúcares totales disminuyen a medida que aumenta el tiempo de fermentación de la kombucha (May *et al.*, 2019), que es lo ocurrido en la kombucha de té verde y negro usadas para el estudio.

La kombucha de té verde exhibe mayor acidez con un valor de pH de 3,80 en el día 0 de fermentación, comparado con la kombucha de té negro con un pH de 3.97; y el mismo patrón se observa cuando la fermentación es de 28 días. Esta diferencia de valores de pH por el tipo de kombucha utilizada se debe a que según Coton *et al.* (2017) dependiendo el tipo de té (verde o negro) que se use en la preparación de la bebida fermentada, la composición química y microbiológica es diferente; y esto se evidencia ya que determinaron que en la kombucha de té negro hay una mayor diversidad de bacterias ácidos acéticas y lácticas que en la kombucha de té verde. El pH obtenido a los 28 días de fermentación de la kombucha de té verde y negro fue de 2,61 y 2,74 respectivamente, valores de pH según Nummer (2013) se encuentran en el rango seguro de consumo humano, que va en el intervalo de 4,2 a 2,5.

Los grados Brix (°Brix) correspondientes a los azúcares totales, fueron al inicio de la fermentación fue mayor en la kombucha de té verde que en la de té negro, pero al final de la fermentación (28 días) la kombucha de té verde evidenció un menor valor de °Brix que la kombucha de té negro; esta diferencia en los valores de °Brix de una kombucha y otra también se evidenció en el estudio de Rezende *et al.* (2019), y que es donde determinan que la kombucha de té verde presenta concentraciones bajas de azúcar y mayor producción de ácido glucurónico a medida que el tiempo de fermentación aumenta comparada con la kombucha de té negro. Entonces, si hay más producción de ácidos en la kombucha de té verde, quiere decir que la hidrolisis de la sacarosa es mayor por tanto se presenta valores menores de °Brix.

Villareal *et al.* (2018) menciona que mientras más bajo es el pH de la kombucha mayor actividad biológica contra microorganismo y hongos tiene; por lo que la kombucha de té verde a los 28 días de fermentación al presentar el pH más bajo se determina que es la que tiene mayor actividad de reprimir el crecimiento de *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.*



Esta actividad inhibitoria de la kombucha de té verde sobre la kombucha de té negro, de hecho, se evidencia en la macrodilución; donde en el ensayo realizado el día 21 de fermentación de la kombucha de té verde se presenta el CMI más bajo (0,0625 V/V), y no es hasta el día 28 de fermentación de la kombucha de té negro que se evidencia el CMI de 0,0625 V/V (Figura 18). Según Nidhi *et al.* (2018) mientras más bajo es el CMI más alta es la capacidad de inhibición; por tal motivo es que la kombucha de té verde tiene un mayor efecto inhibitorio que la kombucha de té negro contra los dos hongos, siendo de mayor incidencia en *Aspergillus* spp. que en *Penicillium* spp. Además, la CMF fue equivalente a la CMI, lo que según Vazquez (2013) determina que la sustancia, es decir la kombucha, a más de inhibir el crecimiento de los hongos, los elimina por completo sin dejar esporas.

Si bien se expone que la kombucha de té verde tiene un mayor efecto inhibitorio contra los hongos, esto no se evidencia en la prueba de difusión de discos, ya que únicamente la bebida de kombucha de té negro en el día 28 formó halos de inhibición para *Penicillium* spp. de 7,25 mm y para *Aspergillus* spp. de 7,38 mm (Tabla 2); y lo mismo pasó con su SCOBY que presentó halos de inhibición de 6,75 mm y 6,5 mm en *Penicillium* spp, y *Aspergillus* spp. respectivamente el día 21 y 7,25 mm para *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. el día 28 (Tabla 3). La no presencia de halos de inhibición de los componentes de la kombucha de té verde pudieron generarse debido a que según Bubonja *et al.* (2020) la prueba de difusión en disco es cualitativa y no cuantifica la cantidad del compuesto a difundirse en el medio, y especialmente presenta problemas con compuestos no polares; y de hecho los fenoles son los compuestos no polares que le otorgan a la kombucha propiedades antifúngicas (Mousavi *et al.*, 2020), y por lo que pudieron tener problemas para difundirse y consecuencia de ello no se mostraron halos de inhibición en la kombucha de té verde. Y en el caso del SCOBY, los halos de inhibición se presentan solo en el biofilm de la kombucha de té negro dado a que al presentar mayor grosor indica que hay crecimiento microbiano (Primiani *et al.*, 2018), lo que determina una acción inhibitoria potencial hacia los hongos en estudio.

De los ensayos realizados se determinó que ambas kombuchas tiene una mayor inhibición sobre *Aspergillus* spp. que en *Penicillium* spp., esto dado a en la membrana celular de estos hongos se encuentra el ergosterol que es considerado un target para la acción de los fármacos antifúngicos, dado a que al inhibir la 14-alfa-dimetilasa se producen esteroides tóxicos que se acumulan en la membrana celular conduciendo a la muerte celular (Perelta, 2012); y es en este caso que según Pasanen *et al.* (1999) *Aspergillus* spp. contiene  $11 \pm 15 \mu\text{g}/\text{mg}$  de ergosterol y *Penicillium* spp.  $5,8 \pm 13 \mu\text{g}/\text{mg}$ , haciendo que en cierta manera *Aspergillus* spp. sea más susceptible a inhibición.

## Capítulo V: Conclusiones

La kombucha de té negro y verde elaborada a partir de bibliografía presentó una disminución del pH y azúcares totales debido a la producción de ácidos orgánicos e hidrólisis de la sacarosa en el proceso de fermentación.

La prueba de susceptibilidad antifúngica, macrodilución, determinó que la kombucha de té verde tiene un efecto inhibitorio mayor que la kombucha de té negro al presentar la CMI más baja (0,0625 V/V) el día 21 de fermentación, y tener los valores de CMI iguales a los de CMF.

La prueba de difusión de disco no fue propicia para evaluar la actividad antifúngica de la kombucha de té verde.

El efecto inhibitorio de la kombucha de té verde y negro fue mayor en *Aspergillus* spp. que en *Penicillium* spp. debido a las probables diferencias en las cantidades de ergosterol en la membrana celular del hongo.

## Capítulo VI: Recomendaciones

Es recomendable que al preparar la kombucha se debe de utilizar el SCOBY iniciador adaptado a l tipo de té a utilizar. Además, se deben de realizar cromatografías líquidas de alta resolución (HPLC) a los diferentes días de fermentación para determinar con exactitud los componentes y la cantidad de estos que se encuentran en kombucha, junto con un análisis microbiológico.

Empezar los ensayos desde el día 21 de fermentación para evidenciar si la inhibición aumenta, y así se permita determinar a qué rango alcanza ser igual de potente que el antifúngico comercial.

Emplear una prueba de susceptibilidad antifúngica diferente a la difusión en disco que permita evaluar la actividad antifúngica de los dos tipos de kombucha.

## Capítulo VII: Bibliografía

- Abdel, T., & Hosny, H. (2016). *Mycology*. Foster City, USA: OMICS eBooks Group.
- Allevato, M. Á., Negroni, R., & Galimberti, R. (2007). Antifúngicos ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*, 30-38.
- Al-Mohammadi, A., Ismaiel, A., Ibrahim, R., Moustafa, A., Zeid, A., & Enan, G. (2021). Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules26165026>.
- Álvarez, S., García, M., Anega, B., & Blanco, J. (2021). Antifungal Resistance in Animal Medicine: Current State and Future Challenges. *Funga Diseases in Animals*, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-69507-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-69507-1_10).
- American Society for Microbiology. (2017). One Health: Fungal Pathogens of Humans, Animals and Plants. *Colloquium Report*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549988/> doi: 10.1128/AAMCol.18Oct.2017.
- 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*, <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>.
- Armiñana, E., Sánchez, T., Reig, J., & Vicente, E. (2019). *Estudio de la sensibilidad de diversas especies fúngicas frente a metabolitos naturales*. [https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/823/1/AB1%20\(1984\)%20p%201-9.pdf](https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/823/1/AB1%20(1984)%20p%201-9.pdf)
- Ashour, A. (Febrero de 2014). *Control of Sexual Reproduction in Aspergillus Species*. The University of Nottingham: [http://eprints.nottingham.ac.uk/13987/1/ADEL\\_THESIS\\_\(FINAL\\_VERSION\).pdf](http://eprints.nottingham.ac.uk/13987/1/ADEL_THESIS_(FINAL_VERSION).pdf)
- Battik, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombuchas teas. *Journal of food Biochemistry*, 37(2). 231-236, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00629.x>.
- Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of kombucha analogues. *Food Science and Technology*, 47(1), 71-77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033> .
- Bubonja, M., Knezevic, S., & Abram, M. (2020). Challenges to Antimicrobial Susceptibility Testing of Plant-derived Polyphenolic Compounds. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 71(4), 300-311, <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>.
- Byrd, J., Caldwell, D., & Nisbet, D. (2017). The identification of fungi collected from the ceca of commercial poultry. *Poultry Science*, 96(7), 2360-2365, <https://doi.org/10.3382/ps/pew486>.
- Carrillo, L. (2003). *Aspergillus*. En L. Carrillo, *Los hongos de los alimentos y forrajes* (págs. 44-60). Universidad de Salta.

- Chegg. (2021). *Penicillium*. <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/penicillium-in-introduction-to-biology>
- CLSI. (2018). *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%20Aerobically](https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhshykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/$FILE/M07Ed11E%20Methods%20for%20Dilution%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Tests%20for%20Bacteria%20That%20Grow%20Aerobically)
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume, L., . . . Coton, E. (2017). Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture based methods. *FEMS Microbiology Ecology*,  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>.
- Encalada, M. (2011). Detección de hongos en la cama avícola, causantes de micosis en los pollos de ceba. *REDVET-Revista Electrónica de Veterinaria*, *12*(6),  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622160003>.
- Fung, F., & Clark, R. (2004). Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology*, *42*(2), 217-234, <https://doi.org/10.1081/clt-120030947>.
- Gladieux, P., Byrnes, E., Aguilera, G., Fisher, M., Billmyre, R., Heitman, J., & Giraud, T. (2017). Epidemiology and Evolution of Fungal Pathogens in Plants and Animals. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, 71-98, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00004-4>.
- Guarro, J., Orzechowski, M., & Severo, L. (2010). Differences and Similarities Amongst Pathogenic *Aspergillus* Species. *Aspergillois: From Diagnosis to Prevention*, 7-32,  
[https://doi.org/10.1007/978-90-481-2408-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2408-4_2).
- Houbraken, J., de Vries, R., & Samson, R. (2014). Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. *Advances in Applied Microbiology*, Volume 86, 199-249,  
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>.
- INSST. (2016). *Penicillium spp.* Ficha de agentes biológicos:  
<https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>
- Jayabalan, R., Malbaša, R., & Sathishkumar, M. (2017). Kombucha Tea: Metabolites. *Fungal Metabolites*, 965-978. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_12](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_12)
- Jayabalan, R., Malbasa, R., Loncar, E., Vitas, J., & Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, doi: 10.1111/1541-4337.12073.

- Khan, S., Singhal, S., Mathur, T., Upadhyay, D., & Rattan, A. (2006). Antifungal Susceptibility Testing Method For Resource Constrained Laboratories. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(3), 171-176.
- Klich, M. A., & Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization*, 116.
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G., Wang, F., Müller, W., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycoogy*, 74(1), 1-29, <https://doi.org/10.3114/sim0006>.
- Kuldeep, D., Sandip, C., Amit, K., Ruchi, T., Rajamani, B., Amit, K., & Shambhu, D. (2013). Fungal/Mycotic Diseases of Poultry-diagnosis, Treatment and Control: A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, <https://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2013.1626.1640>.
- Link, H. F. (1809). *Mag. Gesell. Naturf. Freunde Berlin*, 3(1), 3-42.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, vo.3, núm. 1, 10-18.
- Malcolm, D. (2009). *Aspergillus*. *Clinical Mycology*, volume 2, 271-296, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.00011-6>.
- Matrood, A., & Rhouma, A. (2021). Penicillium and Aspergillus Species Characterization: Adaptation to Environmental Factors and Sensitivity to Aqueous Medicinal Plants Extracts. *Peview of Pants Studies*, 8(1), 1-11, <https://doi.org/10.18488/journal.69.2021.81.1.11>.
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>.
- Mosquito, S., Lagowski, D., Nowakiewicz, A., & Dylag, M. (2021). A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2095-2113, <https://doi.org/10.1111/jam.15032>.
- Mousavi, S., Hashemi, S., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C., Chiang, W., . . . 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*, 1-14, <https://dx.doi.org/10.1155%2F2020%2F4397543>.
- Nidhi, P., Kumari, R., Thakur, S., Devi, R., Sharma, R., Kashyap, S., . . . Sourirajan, A. (2018). Role of Essential oils of medicinal plants (*Eucalyptus globulus*, *Thuja occidentalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*) to treat broad spectrum bacterial and fungal pathogens and as antioxidants in food and Health. *SSRN Electronic Journal*, <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3299291>.

- Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: Risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76 (4), 8-11, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24341155>.
- Otero, C., Arredondo, C., Echeverría, A., & Gordillo, F. (2020). Penicillium spp. mycotoxins found in food and feed and their health effects. *World Mycotoxin Journal*, 13(3), 323-343, doi:10.3920/WMJ2019.2556.
- Pasanen, A., Yli-Pietilä, K., Pasanen, P., Kalliokoski, P., & Tarhanen, J. (1999). Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, <https://dx.doi.org/10.1128%2Faem.65.1.138-142.1999>.
- Perelta, A. N. (3 de Mayo de 2012). *Identifying the Molecular Mechanism of Indole-3-Acetic Acid Detection in the Fungi Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans*. Semantic Scholar: <https://www.semanticscholar.org/paper/Identifying-the-Molecular-Mechanism-of-Acid-in-the-Perelta/0cf75de16e6791447882a133826b382cbde75ebe#paper-header>
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0\_5.
- Pimenta, R., Monteiro, D., & Moreira da Silva, J. (2020). Aspergillus. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 611-624, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00030-7>.
- Pitt, J. (1994). The current role of Aspergillus and Penicillium in human and animal health. *Medical Mycology*, 32(s1), 17-32, <https://doi.org/10.1080/02681219480000701>.
- Pitt, J. L. (2006). Penicillium and related genera. *Food Spoilage Microorganisms*, 437-450, <https://doi.org/10.1533/9781845691417.4.437>.
- Primiani, C., Pujiati, Mumtahanah, M., & Ardhi, W. (2018). Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/doi:10.1088/1742-6596/1025/1/012073>
- Rezende, R., Oliveira, R., Thomaz dos Santos, C., Pimenta do Nascimento, T., Giroto, C., Azevedo, L., . . . Ribeiro de Barros, F. (2019). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>.
- Richardson, M., & Hope, W. (2009). Aspergillus. *Clinical Mycology*, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.00011-6>.
- Syedmousavi, S., Bosco, S., de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R., . . . Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical Mycology*, 56(suppl\_1), S165-S187, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>.



- Srinivasam, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). *Penicillium. Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 651-667, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0>.
- Sweeney, M., & Dobson, A. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 141-158, [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00112-3).
- Vazquez, R. (2013). *Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno Candida albicans*. CICESE: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/613/1/233221.pdf>
- Villarreal, S., Sandra, B., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83 (3), 580-588 , <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.
- Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S.-B., Klaassen, C., Perrone, G., . . . Samson, R. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Micology*, 78(1), 343-371, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.simyco.2014.09.001>.
- Yuniarto, A., Anggadiredja, K., & Annisa Nur Aqidah, R. (2016). Antifunga activity of kombucha tea against human pathogenic fungi. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(5), 253-255, <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9i5.13432>.
- Abdel, T., & Hosny, H. (2016). *Mycology*. Foster City, USA: OMICS eBooks Group.
- Allevato, M. Á., Negroni, R., & Galimberti, R. (2007). Antifúngicos ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*, 30-38.
- Al-Mohammadi, A., Ismaiel, A., Ibrahim, R., Moustafa, A., Zeid, A., & Enan, G. (2021). Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules26165026>.
- Álvarez, S., García, M., Anega, B., & Blanco, J. (2021). Antifungal Resistance in Animal Medicine: Current State and Future Challenges. *Funga Diseases in Animals*, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-69507-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-69507-1_10).
- American Society for Microbiology. (2017). One Health: Fungal Pathogens of Humans, Animals and Plants. *Colloquium Report*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549988/> doi: 10.1128/AAMCol.18Oct.2017.
- 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*, <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>.

- Armiñana, E., Sánchez, T., Reig, J., & Vicente, E. (2019). *Estudio de la sensibilidad de diversas especies fúngicas frente a metabolitos naturales*.  
[https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/823/1/AB1%20\(1984\)%20p%201-9.pdf](https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/823/1/AB1%20(1984)%20p%201-9.pdf)
- Ashour, A. (Febrero de 2014). *Control of Sexual Reproduction in Aspergillus Species*. The University of Nottingham: [http://eprints.nottingham.ac.uk/13987/1/ADEL\\_THESIS\\_\(FINAL\\_VERSION\).pdf](http://eprints.nottingham.ac.uk/13987/1/ADEL_THESIS_(FINAL_VERSION).pdf)
- Battik, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombuchas teas. *Journal of food Biochemistry*, 37(2). 231-236,  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.2011.00629.x>.
- Battikh, H., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2012). Antimicrobial effect of kombucha analogues. *Food Science and Technology*, 47(1), 71-77, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.033> .
- Bubonja, M., Knezevic, S., & Abram, M. (2020). Challenges to Antimicrobial Susceptibility Testing of Plant-derived Polyphenolic Compounds. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 71(4), 300-311, <https://doi.org/10.2478/aiht-2020-71-3396>.
- Byrd, J., Caldwell, D., & Nisbet, D. (2017). The identification of fungi collected from the ceca of commercial poultry. *Poultry Science*, 96(7), 2360-2365, <https://doi.org/10.3382/ps/pew486>.
- Carrillo, L. (2003). *Aspergillus*. En L. Carrilo, *Los hongos de los alimentos y forrajes* (págs. 44-60). Universidad de Salta.
- Chegg. (2021). *Penicillium*. <https://www.chegg.com/learn/biology/introduction-to-biology/penicillium-in-introduction-to-biology>
- CLSI. (2018). *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*.  
[https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhsykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/\\$FILE/M07Ed11E%20Methods%20for%20Dilution%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Tests%20for%20Bacteria%20That%20Grow%20Aerobically](https://kaldur.landspitali.is/focal/gaedahandbaekur/gnhsykla.nsf/5e27f2e5a88c898e00256500003c98c2/4c17737f339875620025756e003852bb/$FILE/M07Ed11E%20Methods%20for%20Dilution%20Antimicrobial%20Susceptibility%20Tests%20for%20Bacteria%20That%20Grow%20Aerobically)
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume, L., . . . Coton, E. (2017). Unravelling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture based methods. *FEMS Microbiology Ecology*,  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>.
- Encalada, M. (2011). Detección de hongos en la cama avícola, causantes de micosis en los pollos de ceba. *REDVET-Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(6),  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63622160003>.
- Fung, F., & Clark, R. (2004). Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology*, 42(2), 217-234, <https://doi.org/10.1081/clt-120030947> .

- Gladieux, P., Byrnes, E., Aguilera, G., Fisher, M., Billmyre, R., Heitman, J., & Giraud, T. (2017). Epidemiology and Evolution of Fungal Pathogens in Plants and Animals. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, 71-98, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00004-4>.
- Guarro, J., Orzechowski, M., & Severo, L. (2010). Differences and Similarities Amongst Pathogenic Aspergillus Species. *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*, 7-32, [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2408-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2408-4_2).
- Houbraken, J., de Vries, R., & Samson, R. (2014). Modern Taxonomy of Biotechnologically Important Aspergillus and Penicillium Species. *Advances in Applied Microbiology, Volume 86*, 199-249, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>.
- INSST. (2016). *Penicillium spp.* Ficha de agentes biológicos: <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>
- Jayabalan, R., Malbaša, R., & Sathishkumar, M. (2017). Kombucha Tea: Metabolites. *Fungal Metabolites*, 965-978. [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_12](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_12)
- Jayabalan, R., Malbasa, R., Loncar, E., Vitas, J., & Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea— Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, doi: 10.1111/1541-4337.12073.
- Khan, S., Singhal, S., Mathur, T., Upadhyay, D., & Rattan, A. (2006). Antifungal Susceptibility Testing Method For Resource Constrained Laboratories. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24(3), 171-176.
- Klich, M. A., & Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to common Aspergillus species and their teleomorphs. *Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization*, 116.
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G., Wang, F., Müller, W., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. (2013). Development in Aspergillus. *Studies in Mycoogy*, 74(1), 1-29, <https://doi.org/10.3114/sim0006>.
- Kuldeep, D., Sandip, C., Amit, K., Ruchi, T., Rajamani, B., Amit, K., & Shambhu, D. (2013). Fungal/Mycotic Diseases of Poultry-diagnosis, Treatment and Control: A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, <https://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2013.1626.1640>.
- Link, H. F. (1809). *Mag. Gesell. Naturf. Freunde Berlin*, 3(1), 3-42.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, vo.3, núm. 1, 10-18.
- Malcolm, D. (2009). Aspergillus. *Clinical Mycology*, volume 2, 271-296, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.00011-6>.

- Matrood, A., & Rhouma, A. (2021). Penicillium and Aspergillus Species Characterization: Adaptation to Environmental Factors and Sensitivity to Aqueous Medicinal Plants Extracts. *Peview of Plants Studies*, 8(1), 1-11, <https://doi.org/10.18488/journal.69.2021.81.1.11>.
- May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, <https://doi.org/10.7717/peerj.7565>.
- Mosquito, S., Lagowski, D., Nowakiewicz, A., & Dylag, M. (2021). A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2095-2113, <https://doi.org/10.1111/jam.15032>.
- Mousavi, S., Hashemi, S., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C., Chiang, W., . . . 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*, 1-14, <https://dx.doi.org/10.1155%2F2020%2F4397543>.
- Nidhi, P., Kumari, R., Thakur, S., Devi, R., Sharma, R., Kashyap, S., . . . Sourirajan, A. (2018). Role of Essential oils of medicinal plants (*Eucalyptus globulus*, *Thuja occidentalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*) to treat broad spectrum bacterial and fungal pathogens and as antioxidants in food and Health. *SSRN Electronic Journal*, <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3299291>.
- Nummer, B. A. (2013). Kombucha brewing under the Food and Drug Administration model Food Code: Risk analysis and processing guidance. *Journal of Environmental Health*, 76 (4), 8-11, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24341155>.
- Otero, C., Arredondo, C., Echeverría, A., & Gordillo, F. (2020). Penicillium spp. mycotoxins found in food and feed and their health effects. *World Mycotoxin Journal*, 13(3), 323-343, doi:10.3920/WMJ2019.2556.
- Pasanen, A., Yli-Pietilä, K., Pasanen, P., Kallioikoski, P., & Tarhanen, J. (1999). Ergosterol Content in Various Fungal Species and Biocontaminated Building Materials. *Applied and Environmental Microbiology*, <https://dx.doi.org/10.1128%2Faem.65.1.138-142.1999>.
- Perelta, A. N. (3 de Mayo de 2012). *Identifying the Molecular Mechanism of Indole-3-Acetic Acid Detection in the Fungi Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans*. Semantic Scholar: <https://www.semanticscholar.org/paper/Identifying-the-Molecular-Mechanism-of-Acid-in-the-Perelta/0cf75de16e6791447882a133826b382cbde75ebe#paper-header>
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins. *Mycotoxigenic Fungi*, doi: 10.1007/978-1-4939-6707-0\_5.
- Pimenta, R., Monteiro, D., & Moreira da Silva, J. (2020). Aspergillus. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 611-624, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00030-7>.

- Pitt, J. (1994). The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Medica Mycology*, 32(s1), 17-32, <https://doi.org/10.1080/02681219480000701>.
- Pitt, J. L. (2006). *Penicillium* and related genera. *Food Spoilage Microorganisms*, 437-450, <https://doi.org/10.1533/9781845691417.4.437>.
- Primiani, C., Pujiati, Mumtahanah, M., & Ardhi, W. (2018). Kombucha fermentation test used for various types of herbal teas. *Journal of Physics: Conference Series*. <https://doi.org/doi:10.1088/1742-6596/1025/1/012073>
- Rezende, R., Oliveira, R., Thomaz dos Santos, C., Pimenta do Nascimento, T., Giroto, C., Azevedo, L., . . . Ribeiro de Barros, F. (2019). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108782>.
- Richardson, M., & Hope, W. (2009). *Aspergillus*. *Clinical Mycology*, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.00011-6>.
- Seyedmousavi, S., Bosco, S., de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R., . . . Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medica Mycology*, 56(suppl\_1), S165-S187, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>.
- Srinivasam, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). *Penicillium*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 651-667, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0>.
- Sweeney, M., & Dobson, A. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 141-158, [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00112-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00112-3).
- Vazquez, R. (2013). *Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno Candida albicans*. CICESE: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/613/1/233221.pdf>
- Villarreal, S., Sandra, B., Bouajila, J., Souchard, J.-P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, 83 (3), 580-588, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.
- Visagie, C., Houbraken, J., Frisvad, J., Hong, S.-B., Klaassen, C., Perrone, G., . . . Samson, R. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78(1), 343-371, <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.simyco.2014.09.001>.
- Yuniarto, A., Anggadiredja, K., & Annisa Nur Aqidah, R. (2016). Antifungal activity of kombucha tea against human pathogenic fungi. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(5), 253-255, <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2016.v9i5.13432>.

## Capítulo VIII: Apéndices