

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN BEBIDAS PROBIÓTICAS: EL CASO DE LA KOMBUCHA

### *Isolation and Identification of Microorganisms from Probiotic Beverages: The Case of Kombucha*

Oana María MACIUCA<sup>1,2</sup>; Fernando SÁNCHEZ-JUANES<sup>2\*</sup>; Esther MENÉNDEZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad Farmacia/CIALE. Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental Lab. 209. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Pl. Doctores de la Reina, s/n. 37007 Salamanca, España

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Departamental Lab. 109. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Pl. Doctores de la Reina, s/n. 37007 Salamanca, España

\*autores de correspondencia

Correo-e: [esthermenendez@usal.es](mailto:esthermenendez@usal.es)/[fsjuanes@usal.es](mailto:fsjuanes@usal.es)

**RESUMEN:** La kombucha es una bebida que ha ganado popularidad en los últimos años por sus aparentes propiedades probióticas. En este estudio se aislaron e identificaron microorganismos presentes en una muestra de cultivo *starter* de elaboración casera y en tres marcas comerciales de kombucha para determinar y comparar sus composiciones microbianas. Para la identificación de bacterias y levaduras se emplearon tanto la espectrometría de masas *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* como secuenciación Sanger, analizándose tanto sus espectros como las secuencias derivadas de los genes marcadores taxonómicos de hongos (ITS) y bacterias (16S rRNA). Los resultados demostraron una amplia variabilidad de géneros microbianos entre muestras y una alta presencia de posibles contaminaciones. Además, la presencia de especies con potencial probiótico fue menor a la esperada. Mediante este estudio se concluyó que la kombucha es susceptible de presentar tanto microorganismos beneficiosos

como perjudiciales para la salud, poniendo de manifiesto la necesidad de endurecer las medidas higiénicas y la legislación en torno a la producción de kombucha y otras bebidas probióticas.

*Palabras clave:* kombucha; probióticos; contaminaciones; MALDI-TOF; secuenciación.

**ABSTRACT:** Kombucha is a very popular beverage, which is rising interest in recent years for its apparent probiotic properties. Here, we isolated and identified microorganisms present in a homemade kombucha starter culture and three commercial brands of kombucha to determine and compare their microbial composition. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Sanger sequencing were used to identify bacteria and yeasts. We analyzed the MALDI-TOF MS spectra and the nucleotide sequences derived from the taxonomic marker genes for fungi (ITS) and bacteria (16S rRNA). The results showed a wide biodiversity of microbial genera among the samples and a high presence of putative contaminations. The presence of species with probiotic potential was lower than expected. Overall, we concluded that kombucha could harbor both potentially beneficial and putative harmful microorganisms, revealing and highlighting the necessity to harden and improve the hygienic measures and legislation around the production of kombucha and other probiotic beverages.

*Keywords:* kombucha; probiotics; contaminations; MALDI-TOF; sequencing.

## 1. INTRODUCCIÓN

La kombucha es un té negro o verde azucarado y fermentado por una simbiosis entre bacterias y levaduras que se encuentran incrustadas en una capa de celulosa microbiana, lo que recibe el nombre de SCOBY (del inglés *Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) (Marsh *et al.*, 2014; Arikan *et al.*, 2020; May *et al.*, 2019).

La kombucha comenzó siendo una bebida casera tradicional que con el tiempo se ha industrializado y se ha convertido en una bebida altamente consumida (Arikan *et al.*, 2020). El creciente interés por los productos fermentados y probióticos impulsó el consumo de esta bebida, a la que se le atribuyen propiedades probióticas beneficiosas para la salud. Sin embargo, su composición y efectos

no están del todo investigados y las propiedades probióticas no se han asociado directamente con los microorganismos presentes en la kombucha (Marsh *et al.*, 2014; Vargas *et al.*, 2021).

Durante la fermentación de la kombucha existen dos componentes diferenciados: la capa de celulosa microbiana y el caldo de debajo de esta. Algunos estudios se basan en la caracterización de microorganismos tanto de la película celulósica como del caldo, mientras que existen otros estudios que investigan la composición microbiana en distintos días de fermentación (Marsh *et al.*, 2014; Arikan *et al.*, 2020).

Generalmente, la simbiosis está conformada por bacterias ácido-acéticas (BAA), bacterias lácticas (BAL) y levaduras, todas ellas consideradas con potencial probiótico (Marsh *et al.*, 2014; Arikan *et al.*, 2020). Además, es muy probable encontrar microorganismos contaminantes e incluso patógenos oportunistas, ya que generalmente la kombucha casera se elabora en ambientes no asépticos y a partir de un cultivo iniciador que no está del todo caracterizado en cuanto a los microorganismos que contiene (Nguyen *et al.*, 2015).

## 2. OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos tres objetivos: i) aislamiento de microorganismos de una muestra de SCOBY y tres muestras de diferentes marcas comerciales de kombucha, ii) identificación de los microorganismos aislados mediante una combinación de espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) y secuenciación Sanger y iii) comparación de las distintas microbiotas asociadas a los cultivos *starter* y kombuchas comerciales.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Muestras y medios de cultivo

Se seleccionaron 4 muestras: SCOBY (vendedor particular) y MC1, 2 y 3 (Marca Comercial 1, 2 y 3). Se seleccionaron y prepararon los medios de cultivo enumerados en la Tabla 1.

TABLA 1. Medios de cultivo utilizados en este trabajo

Medio de cultivo	Composición	Microorganismo diana
MYP	D-manitol 25 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 gL <sup>-1</sup> , peptona bacteriológica 3 gL <sup>-1</sup> , CaCO <sub>3</sub> 20 gL <sup>-1</sup> y vinagre de vino filtrado 10 mL L <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Bacterias ácidoacéticas (AAB)
TJA (Sigma-Aldrich)	Hidrolizado enzimático de caseína 10 gL <sup>-1</sup> , leche peptonizada 10 gL <sup>-1</sup> , jugo de tomate 20 gL <sup>-1</sup> + agar 11 gL <sup>-1</sup>	Bacterias ácido-lácticas (LAB) y levaduras
MRS (Sigma-Aldrich)	Citrato de hidrógeno diamónico 2 gL <sup>-1</sup> , fosfato de hidrógeno dipotásico 2 gL <sup>-1</sup> , D (+)-glucosa 20 gL <sup>-1</sup> , sulfato de magnesio 0,1 gL <sup>-1</sup> , sulfato de manganeso 0,05 gL <sup>-1</sup> , extracto de carne 5 gL <sup>-1</sup> , acetato sódico 5 gL <sup>-1</sup> , peptona universal 10 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 gL <sup>-1</sup> + agar 12 gL <sup>-1</sup>	Bacterias ácido-lácticas (LAB)
PCA (Sigma-Aldrich)	Dextrosa 1 gL <sup>-1</sup> , triptona 5 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 2,5 gL <sup>-1</sup> + agar 9 gL <sup>-1</sup>	Bacterias
PDA (Difco)	Fécula de patata 4 gL <sup>-1</sup> , dextrosa 20 gL <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Hongos
YGC	Extracto de levadura 5 gL <sup>-1</sup> , glucosa 20 gL <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Levaduras
M2Lev	Extracto de malta 20 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 3 gL <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Hongos filamentosos

### 3.2. Tratamiento de las muestras

Se llevaron a cabo diluciones seriadas de las muestras. Para el SCOBY, se fragmentó un trozo de película junto con caldo con ayuda del vórtex hasta obtener una muestra homogénea. Se sembraron las placas con las distintas diluciones y se incubaron a 28-30 °C durante 24-72 horas.

Una vez observado crecimiento, se llevaron a cabo recuentos de colonias en las placas de la dilución que presentasen entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC) y se calculó la carga microbiana (UFC/mL). A continuación, se aislaron las colonias por el método de agotamiento en estría.

### 3.3. EM MALDI-TOF

Se sembraron las cepas aisladas en placas de agar divididas en varias secciones. Una vez incubadas y crecidas, se inició el proceso de extracción de proteínas (Ferreira *et al.*, 2011).

La EM MALDI-TOF permite identificar microorganismos mediante el análisis de proteínas ribosómicas de cada uno (Maldonado *et al.*, 2018; Relloso *et al.*, 2015). Mediante EM MALDI-TOF se obtiene un espectro de masas que muestra la relación masa/carga frente a intensidad absoluta, representado en forma de picos. Cada uno de esos picos es una proteína diferente.

El perfil de proteínas ribosómicas del microorganismo es único para cada especie. Independientemente de las condiciones a las que esté expuesto un microorganismo, hay determinadas proteínas constantes que se mantienen (Maldonado *et al.*, 2018). De esta forma, el espectro de masas de las proteínas del microorganismo problema es comparado frente a una base de datos de espectros de referencia y, según las similitudes que presenten, el programa emite un resultado y un valor de puntuación o *score* (Maldonado *et al.*, 2018; Relloso *et al.*, 2015). En este estudio se compararon las cepas problema frente a dos bases de datos: una primera, previa a la secuenciación (Maldi Biotyper 3, base de datos con 4111 referencias [MSPs], Bruker Daltonics), y una segunda, posterior a la secuenciación (Maldi Biotyper 3, base de datos con 9997 referencias [MSPs], Bruker Daltonics).

### 3.4. Secuenciación Sanger

Se procedió a identificar por secuenciación aquellas cepas que no habían sido identificadas por el método EM MALDI-TOF. Se extrajo su ADN y se amplificó el gen del ARNr 16S en el caso de bacterias y la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el caso de hongos por PCR convencional. Se comprobó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Una vez obtenidos los amplicones, se procedió a purificar el ADN con el *kit* “DNA Clean & Concentrator®-5” (ZYMO RESEARCH). Las muestras se secuenciaron en Macrogen, Inc. y se editaron con el programa informático BioEdit (SAS Institute Inc.). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante Nucleotide BLAST® de NCBI (National Center for Biotechnology Information), que compara una secuencia problema frente a secuencias de referencia de una base de datos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Recuento de colonias

Se llevó a cabo el recuento de colonias de cada muestra para conocer la carga microbiana de estas. Se observó una mayor concentración de microorganismos en la muestra de SCOBY ( $10^6$ ) que en cualquiera de las muestras comerciales ( $10^4$ ) de kombucha.

### 4.2. Aislamiento e identificación de microorganismos

Se aislaron cepas morfológicamente diferentes de cada muestra, obteniéndose un total de 54 cepas aisladas.

Por el método de EM MALDI-TOF se identificaron 29 cepas de las 54 cepas aisladas. Las cepas que no se consiguieron identificar por EM MALDI-TOF se secuenciaron por Sanger, identificándose 12 cepas, de las cuales solamente 5 fueron identificaciones nuevas adicionales al EM MALDI-TOF.

En definitiva, respecto a las 54 cepas de las que se partió, un 53.7 % de estas fue identificado por EM MALDI-TOF y un 9.3 % fue identificado por secuenciación. Por lo tanto, se identificó un 63 % de las cepas aisladas (Tabla 2).

TABLA 2. Cepas identificadas por EM MALDI-TOF y Sanger.  
 Clo: cloranfenicol, Chx: cicloheximida

Muestra	M. aislam.	Dilución	Nombre cepa	ID	ID más cercana	Score	Secuenc.
SCOBY	MRS + Chx	-4	SMRS4.1	MALDI	ID poco fiable	1.485	-
SCOBY	MRS + Chx	-4	SMRS4.2	MALDI	ID poco fiable	1.365	-
SCOBY	PCA + Chx	-4	SPCA4.3	MALDI	ID poco fiable	1.499	-
SCOBY	PDA + Clo	-4	SPDA4.4	MALDI	ID poco fiable	1.547	-
SCOBY	PDA + Clo	-4	SPDA4.5	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.279	-
SCOBY	YGC + Clo	-4	SYGC4.6	MALDI	ID poco fiable	1.556	-
SCOBY	YGC + Clo	-4	SYGC4.7	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.369	-
SCOBY	M2Lev + Clo	-4	SM2Lev4.8	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.141	-
SCOBY	M2Lev + Clo	-4	SM2Lev4.9	MALDI	ID poco fiable	1.385	-
SCOBY	TJA	-4	STJA4.10	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.291	-
SCOBY	TJA	-4	STJA4.11	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.359	-
SCOBY	TJA	-4	STJA4.12	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.396	-
SCOBY	TJA	-4	STJA3.13 A	MALDI	<i>Zygoascus meyeriae</i>	2.040	Sí
SCOBY	TJA	-4	STJA4.13 B	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.316	-
SCOBY	M2Lev + Clo	-4	SM2Lev4.14	MALDI	<i>Zygoascus meyeriae</i>	1.800	-
SCOBY	PDA + Clo	-4	SPDA4.15	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.517	-
SCOBY	PCA + Chx	-4	SPCA4.16	MALDI	<i>Hanseniaspora apuntiae</i>	1.760	-

OANA MARÍA MACIUCA; FERNANDO SÁNCHEZ-JUANES; ESTHER MENÉNDEZ  
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN BEBIDAS PROBIÓTICAS:  
EL CASO DE LA KOMBUCHA

MC1	M2Lev + Clo	-3	M1M2Lev3.17	MALDI	<i>Candida robusta</i> [ana] ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [teleo])	2.304	-		
MC1	M2Lev + Clo	-3	M1M2Lev3.18	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.781	-		
MC1	YGC + Clo	-3	M1YGC3.19	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.877	-		
MC1	YGC + Clo	-3	M1YGC3.20	MALDI	ID poco fiable	1.489	-		
MC1	PDA + Clo	-3	M1PDA3.21	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.880	-		
MC1	PDA + Clo	-3	M1PDA3.22	MALDI	ID poco fiable	1.402	Sí		
MC1	TJA	-3	M1TJA3.23 A	MALDI	ID poco fiable	1.623	Sí		
MC1	TJA	-3	M1TJA3.23 B	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.280	-		
MC1	TJA	-3	M1TJA3.24	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.819	-		
MC1	MRS	-3	M1MRS3.25	MALDI	ID poco fiable	1.342	-		
MC2	MRS	-3	M2MRS3.26	MALDI	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	2.060	-		
MC2	PDA	-3	M2PDA3.27	MALDI	ID poco fiable	1.416	Sí		
MC2	M2Lev	-3	M2M2Lev3.28	MALDI	ID poco fiable	1.419	Sí		
MC2	YGC	-3	M2YGC3.29	MALDI	ID poco fiable	1.380	-		
MC2	PCA	-3	M2PCA3.30	MALDI	ID poco fiable	1.359	-		
MC2	PCA	-3	M2PCA3.31	MALDI	ID poco fiable	1.271	-		
MC2	PCA	-3	M2PCA3.32	MALDI	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	1.902	Sí		
MC2	PCA	-3	M2PCA3.33	MALDI	ID poco fiable	1.435	Sí		
MC3	TJA	-3	M3TJA3.35	MALDI	ID poco fiable	1.495	-		
MC3	TJA	-3	M3TJA3.36	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.700	-		
MC3	YGC	-3	M3YGC3.37	MALDI	ID poco fiable	1.354	-		
MC3	YGC	-3	M3YGC3.38	MALDI	ID poco fiable	1.409	-		
MC3	PDA	-3	M3PDA3.39	MALDI	ID poco fiable	1.267	-		
MC3	PDA	-3	M3PDA3.40	MALDI	ID poco fiable	1.451	-		
MC3	PDA	-3	M3PDA3.41	MALDI	ID poco fiable	1.437	-		
MC3	M2Lev	-3	M3M2Lev3.42	MALDI	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1.920	Sí		
MC3	M2Lev	-3	M3M2Lev3.43	MALDI	ID poco fiable	1.354	-		
MC3	MRS	-2	M3MRS2.46	MALDI	ID poco fiable	1.426	-		
MC3	MRS	-2	M3MRS2.47	MALDI	<i>Oenococcus oeni</i>	2.170	-		
MC3	PCA	D	M3PCAD.48	MALDI	<i>Bacillus cereus</i>	1.915	Sí		
MC3	PCA	D	M3PCAD.49	MALDI	<i>Bacillus simplex</i>	2.194	Sí		
MC3	M2Lev	D	M3M2LevD.50	MALDI	ID poco fiable	1.457	-		
MC3	M2Lev	D	M3M2LevD.51	MALDI	<i>Bacillus subtilis</i>	2.539	-		
MC3	PDA	D	M3PCAD.52	MALDI	<i>Bacillus cereus</i>	2.165	-		
MC3	TJA	-3	M3TJA3.53	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.766	Sí		
MC3	M2Lev	-3	M3M2Lev3.54	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.844	-		
MC3	PCA	D	M3PCAD.55	MALDI	<i>Bacillus megaterium</i>	1.867	Sí		
<b>Nombre cepa</b>		<b>Especie más cercana tipo</b>		<b>% Ident.</b>	<b>Nº Acceso</b>	<b>Especie más cercana no tipo</b>		<b>% Ident.</b>	<b>Nº Acceso</b>
STJA3.13 A	<i>Cutibacterium acnes</i> DSM 1897 <sup>1</sup>		93.27%	CP025934.1	Uncultured bacterium clone Ce.so-M-DM-HN-2-179		93.61%	HQ639500.1	
M1PDA3.22	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>		99.48%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72		99.48%	NR_165974.1	
M1TJA3.23 A	<i>Moraxella osloensis</i> strain NCTC 10465 <sup>1</sup>		98.82%	KT989843.1	<i>Moraxella osloensis</i> strain 15a42		98.98%	M2452133.1	
M2PDA3.27	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>		99.48%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72		99.48%	NR_165974.1	
M2M2Lev3.28	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>		98.70%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> culture CBS:2547		99.21%	KY103311.1	
M2PCA3.32	<i>Corynebacterium mucifaciens</i> CIP 105129 strain DMMZ 2278 <sup>1</sup>		99.32%	NR_026396.1	Uncultured bacterium clone ncm02h02c1		99.55%	KF075917.1	
M2PCA3.33	<i>Bacillus australimaris</i> strain MCCC 1A05787 <sup>1</sup>		98.86%	MN077148.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain E97C55		98.96%	MK474954.1	
M3M2Lev3.42	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>		99.21%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72		99.21%	NR_165974.1	
M3PCAD.48	<i>Bacillus paranthracis</i> strain MCCC 1A00395 <sup>1</sup>		97.46%	MK508861.1	Uncultured bacterium clone 5_Am_80		97.69%	KM464182.1	
M3PCAD.49	[ <i>Brevibacterium</i> ] <i>frigoritolens</i> strain DSM 8801 <sup>1</sup>		94.93%	MK424281.1	Bacterium S27		95.05%	JX293312.1	
M3TJA3.53	<i>Oenococcus oeni</i> strain JCM 6125 <sup>1</sup>		99.40%	LC071842.1	<i>Oenococcus oeni</i> strain OE37		99.40%	CP053280.1	
M3PCAD.55	<i>Paenibacillus zeae</i> strain 6R2 <sup>1</sup>		95.14%	NR_145868.1	<i>Paenibacillus lautus</i> strain Q1.1.2.M17		95.14%	MTS15771.1	

### 4.3. Diferencias entre muestras

Las muestras presentaron diferencias significativas en su composición microbiana. De las especies identificadas, ninguna fue identificada en todas las 4 muestras y solamente una especie aparece en 3 de las muestras (MC1, MC2 y MC3) (Figura 1).

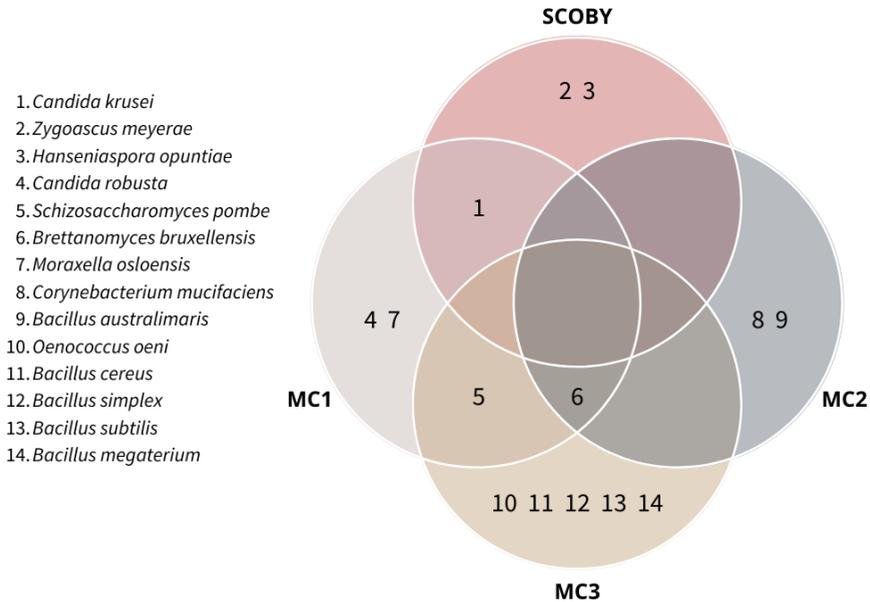


Figura 1. Diagrama de Venn en el que se observan aquellas especies que comparten o no entre las distintas muestras.

En el SCOBY, se identificaron 3 especies, destacando el elevado porcentaje de cepas pertenecientes a *Candida krusei*. En la cepa STJA3.13 A existe una incongruencia, puesto que la especie identificada por EM MALDI-TOF (*Zygoascus meyerae*) no coincide con la identificada por secuenciación (*Cutibacterium acnes*) (Tabla 2). En la Marca Comercial 1 (MC1), se identificaron 5 especies, siendo *Schizosaccharomyces pombe* la presente en mayor porcentaje, seguida por especies del género *Candida*. En la Marca Comercial 2 (MC2), se identificaron 3 especies, destacando *Brettanomyces bruxellensis*. La cepa M2PCA3.32 se identificó tanto por EM MALDI-TOF como por secuenciación, obteniéndose por ambos métodos la especie *Corynebacterium mucifaciens* (Tabla 2). En la Marca Comercial 3 (MC3), se identificaron 7 especies, destacando *Schizosaccharomyces pombe* y *Bacillus cereus*. Se observaron incongruencias en las identificaciones por EM MALDI-TOF y secuenciación de 4 cepas (Tabla 2).

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la composición de 4 muestras de kombucha (el cultivo *starter* o SCOBY y tres de distintas marcas comerciales). La probabilidad de encontrar contaminaciones era mayor en el caso del SCOBY al provenir de un

vendedor particular. Por el contrario, no se esperaba encontrar ninguna contaminación en las marcas comerciales, puesto que son productos regularizados a disposición del consumidor.

En el caso del SCOBY destaca la presencia de un alto porcentaje de *Candida krusei*, una especie patógena causante de infecciones. Esto podría indicar que en la elaboración de kombucha casera no se cumplan las medidas higiénicas necesarias, produciéndose así contaminaciones (Nguyen *et al.*, 2015). También se identificó la especie *Hanseniaspora opuntiae*, una levadura detectada en la fermentación de granos de cacao (Papalexandratou *et al.*, 2013) y en el biofilm de una muestra de kombucha de un estudio previo (Mas *et al.*, 2022). Además de esta especie, *Hanseniaspora valbyensis* ha sido identificada en muestras de kombucha de otros estudios (Mas *et al.*, 2022).

La MC1 presenta un alto porcentaje de levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe*, identificada previamente en muestras de kombucha (May *et al.*, 2019). Se identificó también la especie *Candida robusta*, que es el anamorfio de *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura detectada en muestras de kombucha y demás bebidas probióticas y cuyo potencial probiótico ha sido comprobado en estudios previos. En la MC1 vuelve a aparecer *Candida krusei*, lo cual indica que esta muestra también sufrió contaminaciones. Los géneros *Saccharomyces* y *Candida* han sido identificados en otros productos probióticos, tales como la masa madre y el kéfir (May *et al.*, 2019).

Por secuenciación se identificó *Brettanomyces bruxellensis*, una de las levaduras mayoritarias en muestras de kombucha de estudios previos (Marsh *et al.*, 2014; May *et al.*, 2019; Angela *et al.*, 2020), junto con la única especie bacteriana de la muestra, *Moraxella osloensis*, que ha sido aislada en otras ocasiones de la piel humana y de ropa húmeda, de manera que no es habitual encontrarla asociada a alimentos.

En la MC2 la única levadura identificada fue *Brettanomyces bruxellensis*, de forma que es la muestra que menor variedad de levaduras presenta (Angela *et al.*, 2020). Esta es la responsable del sabor característico de la kombucha (Marsh *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015) y de favorecer la producción de ácido glucurónico, una sustancia con propiedades desintoxicantes, por parte de las BAA (Nguyen *et al.*, 2015). También aparece el género *Bacillus*, presente en el etiquetado de marcas comerciales de kombucha de otros estudios.

La MC3 presenta un mayor porcentaje de bacterias que de levaduras, al contrario que el resto. Destaca la presencia de la especie *B. cereus*, una especie de bacterias en la que se han descrito numerosas cepas productoras de toxinas causantes de intoxicaciones alimentarias. No es habitual encontrar esta especie en bebidas probióticas. Sin embargo, la especie *Bacillus subtilis* presente en la MC3 ha sido reportada como un probiótico incluido en kombucha comercial.

También se identificó la especie *Oenococcus oeni*, una bacteria láctica presente en vino, vinagre y kombucha (Lorentzen *et al.*, 2019). Las BAL han demostrado ser potentes probióticos beneficiosos para la salud, de forma que la identificación de una única BAL en las distintas muestras no es un buen indicio, sino que debería haber una mayor presencia de este tipo de bacterias.

Respecto a las incongruencias detectadas en la Tabla 2, podrían deberse a la presencia de más de una cepa en la muestra o a errores en la identificación, ya que en alguna ocasión por un método se detecta un hongo y por el otro una bacteria, de forma que no se puede asegurar ninguna identificación como correcta.

## 6. CONCLUSIONES

Como conclusiones directas de este trabajo podemos decir que las levaduras mayoritarias de las distintas muestras han sido *Candida krusei*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Brettanomyces bruxellensis*. En el caso de las bacterias se ha observado una mayor variabilidad entre muestras.

Esta bebida puede presentar tanto microorganismos beneficiosos como perjudiciales para la salud, sobre todo en cultivos *starter* de origen poco fiable. Las medidas higiénicas y la legislación para la producción de kombucha y otras bebidas probióticas deben endurecerse para evitar contaminaciones y adulteraciones del producto.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Angela C, Young J, Kordayanti S, Devanthi PVP, Katherine. Isolation and screening of microbial isolates from kombucha culture for bacterial cellulose production in sugarcane molasses genoma. *KnE Life Sci.* 2020; 5:111-127.
- Arikan M, Mitchell AL, Finn RD, Gürel F. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Food Sci.* 2020; 85:455-464.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, García-Fraile P, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Velázquez E. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. *PLOS ONE.* 2011; 6(5):e20223.
- Lorentzen, MP, Campbell-Sills, H, Jorgensen, TS et al. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC Genomics.* 2019; 20:330.
- Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio.* 2018; 22:35-45.
- Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* 2014; 38:171-178.

- Mas P et al. Evolution in composition of kombucha consortia over three consecutive years in production context. *Foods*. 2022; 11:1-13.
- May A, Narayanan S, Alcock J, Varsani A, Maley C, Aktipis A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*. 2019; 7:1-22.
- Nguyen NK, Nguyen PB, Nguyen HT, Le PH. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *Food Sci. Technol*. 2015; 64:1149-1155.
- Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiol*. 2013; 35:73-85.
- Relloso MS et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Rev Argent Microbiol*. 2015; 47:103-107.
- Vargas BK, Fabricio MF, Ayub MAZ. Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: A bibliometric and systematic review. *Food Biosci*. 2021; 44:1-12.

