

Crecimiento de *Salmonella* y *Escherichia coli* en fermentación de té verde y piloncillo con *Thauera*

Amezola Cortes, S.E.¹, Cabrera Diaz E.¹, Segura García L.E.¹

¹ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Salud Pública. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100, Zapopan, 45200, Jalisco, México. Tel: +52 3337771150 ext 33287. Correo: luis.segura@academicos.udg.mx

Palabras clave: Kombucha, tepache, inocuidad.

Introducción

La elaboración de kombucha se realiza mediante la fermentación de té verde, enriquecido con azúcar estándar. A la bebida kombucha se le han atribuido diversas propiedades, entre las que se encuentra se capacidad antimicrobiana al igual que todas las bebidas fermentadas, además de propiedades anticancerígenas y para el control de la diabetes [1].

La fermentación se lleva a cabo de manera habitual con el SCOBY (del inglés: Symbiotic Colony Of Bacteria and Yeast) el cual es un consorcio de bacterias y levaduras, dentro de las cuales se han identificado bacterias ácido acéticas (*Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides* y *Bacterium gluconicum*) y levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida* spp. y *Pichia* spp.). Durante la fermentación se generan ácidos orgánicos siendo el acético el principal ácido, además de etanol con una concentración máxima de 5.5 g/L [2].

El tepache es una bebida fermentada tradicional mexicana, elaborada con cascara piña y piloncillo básicamente, pudiendo tener canela o clavo dependiendo la receta y tradición. La cascara de piña le confiere los microorganismos que va a realizar la fermentación alcohólica y acética en la cual actúan diferentes microorganismos como lo son bacterias (lácticas: *Lactobacillus lactis* ssp; Acéticas: *Acetobacter* y *Enterobacteriaceae*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) por lo que le confiere un interés biotecnológico. Un buen tepache debe tener un pH de 4-6, con un grado bajo en alcohol (menor al 1%), un olor dulce y además de un color café oscuro. El piloncillo es la principal fuente de nutrientes en el medio, la canela y el clavo le confieren un sabor específico además de sustancias antimicrobianas que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados durante la fermentación.

Durante la fermentación de bebidas fermentadas no destiladas se generan una diversidad de compuestos antimicrobianos dentro de los cuales están los ácidos orgánicos y el etanol. Por eso las bebidas fermentadas se consideran inocuas y aptas para su consumo, además de ser utilizadas para preservar los alimentos por un largo periodo de tiempo. Las bacterias patógenas han evolucionado y la multirresistencia es uno de los principales problemas que se tiene actualmente, además el no aplicar las buenas prácticas de elaboración al momento de preparar las bebidas de manera casera aumentan el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos.

El presente trabajo tiene como objetivo el estudio del crecimiento de *Salmonella* y *E. coli* en un medio de cultivo a base de té verde y un medio a base de piloncillo en presencia de *Thauera* aislada del SCOBY de kombucha artesanal.

Metodología

Aislamiento de bacterias del SCOBY

Se realizó una siembra por estría en medio WL nutrient agar, para el aislamiento de colonias. Se dejó incubar a 30°C durante 24h y se procedió a realizar una purificación de las diferentes colonias en base a la morfología observada. Una vez purificadas las diferentes cepas, se realizó una observación al microscopio para realizar clasificación de los aislados como levaduras y bacterias. De las bacterias

obtenidas se sembraron medio de té verde para observar su crecimiento y evaluar su capacidad para generar una membrana (similar al SCOBY), seleccionando la cepa

Identificación de la bacteria aislada

La identificación se realizó por medio de Maldi-TOF [3].

Preparación de los medios de cultivo

Para la preparación del medio de fermentación de Té verde se utilizó el te verde comercial marca “La Pastora”. Se ponen a hervir 375 mL de agua potable y después se colocan 31.25 g de azúcar, y una bolsa de té, posteriormente se deja reposar 20 min y se retira la bolsa de té verde. Se sirve en matraces y se esteriliza a 121°C por 15min en autoclave.

Para la preparación del medio de piloncillo se formuló a una concentración de 100g/L de piloncillo en agua potable. Se esterilizó a 121°C por 15 min en autoclave.

El medio WL nutrient agar, Agar Mac Conkey, Agar Verde Brillante, se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante, se esterilizaron y se colocaron en cajas Petri para su posterior utilización. Así mismo el caldo soya se preparó de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Preparación de los inóculos

Se utilizarón *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium ATCC14028™ y *Eschecichia coli* ATCC 25922™. Los inóculos de *Salmonella* y *E. coli* se realizaron en caldo soya, inoculando las cepas correspondientes y se incubaron por 24 h a 37°C. Para el inóculo de la cepa CP3 se prepararon en medio de té verde inoculando la bacteria en etracez Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio y dejado en incubadora estática durante 48h para la formación de la membrana.

Condiciones de fermentación

Los medios de Té verde y medio de piloncillo se inocularon con una membrana de la cepa CP3, los medios que llevan *Salmonella* y *E. coli* fueron inoculados con 10 µL del inóculo preparado en caldo soya. Una vez inoculados los medios se colocaron en una incubadora estática a 30°C durante 48h.

Se inocularon los medios de Té verde y medio de piloncillo de la siguiente manera (Tabla 1) teniendo cada una de las baterías en cultivo puro y el crecimiento en conjunto de la cepa CP3 en presencia de un patógeno:

Tabla 1. Relación de cepas para la inoculación de los medios de fermentación

Medio	Cepa CP3	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>
	X		
Té verde		X	
	X	X	X
	X	X	
Medio de piloncillo		X	
	X	X	X
	X	X	

X. Bacteria inoculada en el medio.

Conteo de *Salmonella* y *E. coli* en placa

El conteo de las bacterias patógenas se realizó mediante conteo en placa por extensión en superficie realizando una serie de diluciones. Esta metodología se aplicó tanto a los inóculos como a los medios una vez fermentados.

Medición de acidez titulable

Para la medición de la acidez titulable se realizó mediante la titulación con hidróxido de sodio 0.1N con fenolftaleína, y el porcentaje de acidez se determinó en base al ácido acético.

Resultados y discusión

Se realizó la selección de la cepa identificada como CP3, la cual tiene la capacidad de generar una membrana en cultivo puro similar al SCOBY. Después de realizar la identificación por Maldi-TOF se logró identificar a nivel de género como una bacteria del género *Thauera*, el cual esta reportado como bacteria con capacidad de generar exopolisacáridos, lo que permite generar agregados y formar la membrana correspondiente.

Después de realizar las fermentaciones se observa que tanto *Salmonella* (figura 1) como *E. coli* (figura 2) pueden desarrollarse muy bien en medio de Té verde como en medio de piloncillo.

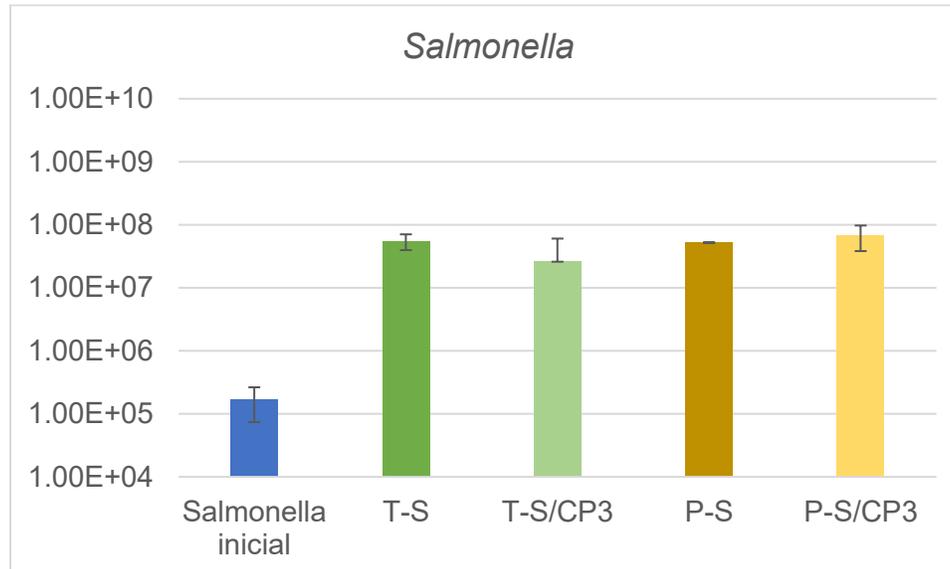


Figura 1. Concentración de *Salmonella* (UFC/mL) al inicio de la fermentación y conteo final de cada uno de los medios de fermentación [T(Te verde), P(Piloncillo), S(*Salmonella*), CP3(*Thauera*)]

El co-cultivo de *Thauera* en presencia de *Salmonella* y *E. coli* no representa una inhibición del crecimiento, observando que tanto en medio de Té verde como en medio de piloncillo el desarrollo de la bacteria patógena es similar al observado cuando están de manera pura.

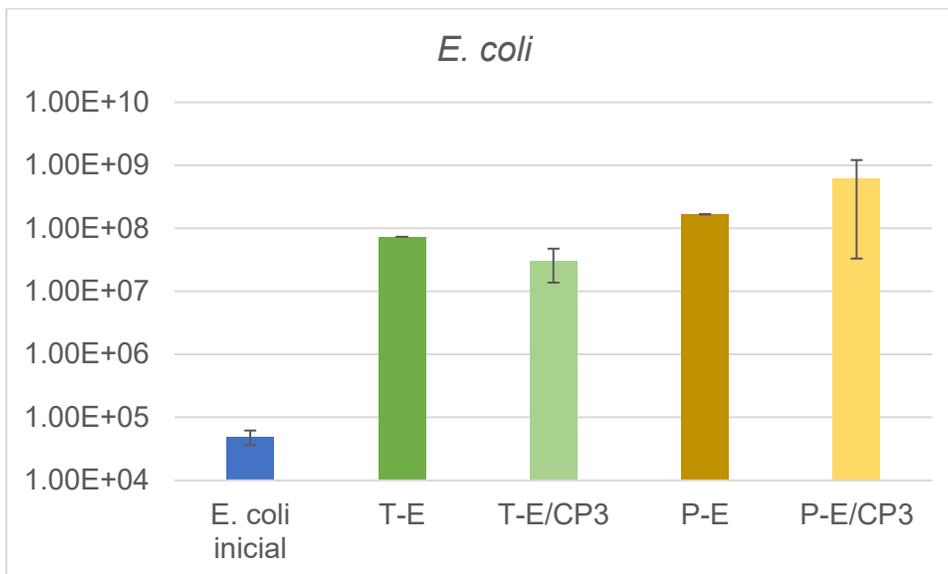


Figura 2. Concentración de *E. coli* (UFC/mL) al inicio de la fermentación y conteo final de cada uno de los medios de fermentación [T(Te verde), P(Piloncillo), E(*E. coli*), CP3(*Thauera*)]

Si bien el desarrollo de los patógenos se llevó a cabo sin cambios en los medios de fermentación, la producción de ácido si presento diferencias (figura 3), encontrando que en los medios inoculados con la cepa CP3 y *E. coli* presentaron la mayor producción de ácido. La cepa CP3 genera una concentración similar de ácido al que generan los patógenos estudiados en cultivo puro en los diferentes medios. Los cultivos donde se inoculo la *Salmonella* sola en los diferentes medios genero la menor concentración de ácido. La cepa CP3 en cultivo puro generó menos acido que cuando se encuentra en presencia de alguno de los patógenos a los que se enfrentó.

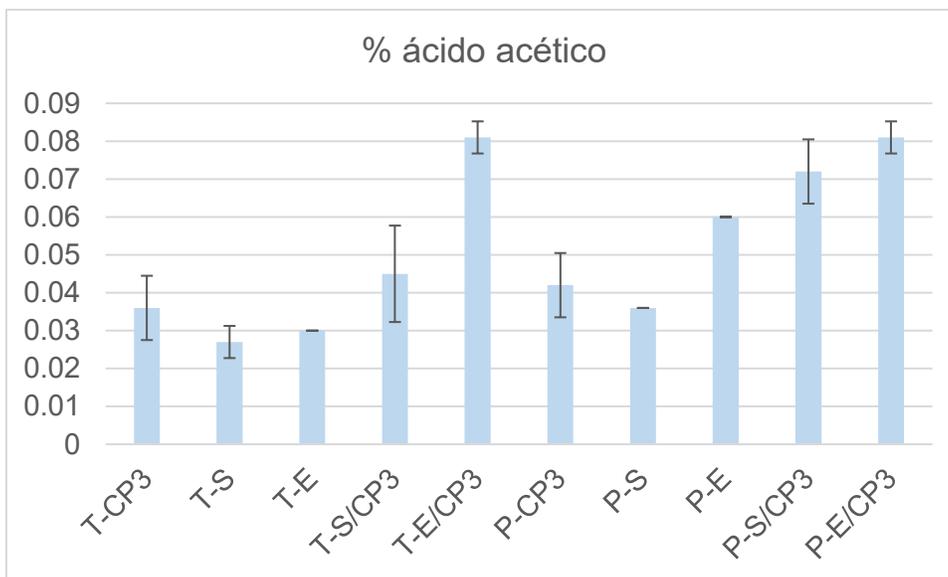


Figura 3. Porcentaje de acidez titulable en base a ácido acético a final de la fermentación en cada uno de los medios utilizados [T(Te verde), P(Piloncillo), S (*Salmonella*), E(*E. coli*), CP3(*Thauera*)]

Se observa que el co-cultivo de la cepa CP3 con conjunto con alguno de los patógenos en los diferentes medios aumenta la producción de ácidos, sin embargo no es suficiente para generar una inhibición del crecimiento del patógeno, lo que pone de manifiesto que los patógenos tiene la capacidad de poder crecer en bebidas fermentadas y que la concentración de ácido acético producido por *Thauera* no es

suficiente para generar un efecto de inhibición de los patógenos. Si bien la kombucha es fermentada con todo un consorcio de bacterias y levaduras [4] obteniendo una bebida con diversos beneficios reportados. La fermentación con solo una de las bacterias presentes en el consorcio no es capaz de generar un efecto antimicrobiano sobre los patógenos a los que se enfrentó en este trabajo.

Los efectos benéficos para la salud que posee la kombucha se han atribuido a la presencia de las bacterias presentes en el SCOBY que se utiliza para su elaboración, siendo bacterias de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, a su vez, las levaduras del género *Saccharomyces* son quienes contribuyen, junto con el ácido glucurónico, a la protección de la salud [1]. En contraste con este estudio donde se estudia por primera vez el efecto de *Thauera* en medio de Té verde y medio de piloncillo, se observa que esta bacteria por sí sola no tiene la capacidad de fermentar el té y tampoco de inhibir el crecimiento de los patógenos estudiados.

Tanto el tepache como la kombucha se realizan de manera casera y artesanal, teniendo la formación de madres o SCOBY respectivamente que constan de un consorcio, a la mayoría de las bebidas fermentadas se les atribuyen diversas propiedades, y son los microorganismos los encargados de realizar la transformación de los nutrientes que les proporciona el medio de cultivo para la generación de metabolitos activos con actividad antimicrobiana, antioxidante, entre otras. Se continuará con el estudio de otras cepas de bacterias aisladas del SCOBY para determinar por separado la participación de cada una de ellas en la fermentación y encontrar la bacteria responsable de la producción de metabolitos con capacidad inhibitoria.

Se han detectado contaminaciones en kombucha por bacterias del género *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* y varios patógenos más especialmente peligrosos, es decir, que más que una bebida milagrosa, la kombucha elaborada artesanalmente sin experiencia es una bebida peligrosa de la que los médicos recomiendan que se abstengan personas con el sistema inmunitario deprimido. Existe a este respecto literatura clínica que relata problemas agudos intestinales y hepáticos en enfermos de VIH y hepatitis que consumieron repetidamente kombucha [5]. En este estudio se pone de manifiesto que no todas las bacterias presentes en el SCOBY tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos durante la fermentación, por lo que las bebidas fermentadas no destiladas elaboradas de manera artesanal se deben de tener todos los cuidados higiénicos para su preparación.

El estudio de las bebidas tradiciones mexicanas no destiladas como el colonche, pulque, tepache, tejuino y tuba, tiene una tradición que se hereda de generación en generación para su proceso de elaboración, a la mayoría de estas bebidas se les atribuyen propiedades benéficas por el contenido de polifenoles presentes en cada uno y la participación de bacterias ácido lácticas y/o ácido acéticas presentes para la realización de la fermentación [6]. Si bien la kombucha no es una bebida tradicional mexicana, ha comenzado a ganar mercado e importancia aumentado su elaboración casera y consumo en México, por lo que el estudio de las bacterias presentes en esta bebida contribuye a garantizar la inocuidad de esta. Se requieren de más estudios para establecer y garantizar una inocuidad no solamente de la kombucha si no de todas bebidas tradicionales no destiladas que se producen de manera casera, para el establecimiento de buenas prácticas higiénicas en la preparación de cada una de ellas y disminuir el riesgo de enfermedades gastrointestinales por el consumo de las mismas.

Conclusiones

Las bebidas fermentadas se consideran como inocuas, en este estudio se demuestra la capacidad que tiene tanto *Salmonella* como *E. coli* para crecer en los medios de té verde y medio a base de piloncillo que se utilizan para la producción casera de kombucha y tepache.

La bacteria *Thauera* aislada del SCOBY de kombucha casera, no logra realizar una inhibición del crecimiento de *Salmonella* y *E. coli* en fermentación del mismo té y tampoco en medio de piloncillo, si

bien se logra un aumento de la producción de ácido este no es suficiente para generar una inhibición del crecimiento de los patógenos estudiados.

Este es el primer estudio que reporta la presencia de una bacteria del genero *Thauera* en el SCOBY para la producción de kombucha.

Referencias

- [1] Leal, J. M., Suarez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H., Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CyTA - Journal of Food*, **16**(1): 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- [2] Shahbazi, H., Hashemi Gahrue, H., Golmakani, M. T., Eskandari, M. H., Movahedi, M. (2018). Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food science & nutrition*, **6**(8): 2568–2577. <https://doi.org/10.1002/fsn3.873>
- [3] De la Torre-González, F., Avendaño, D., Gschaedler, A., Kirchmayr, M. (2018). Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for differentiation of *Pichia kluyveri* strains isolated from traditional fermentation processes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **32**:1514-1520. <https://doi.org/10.1002/rcm.8192>
- [4] Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., Sathishkumar, M. (2014). A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, **13**(4): 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- [5] Sabate, J. (1 marzo 2018). Kombucha: ¿una bebida peligrosa?. *www.Eldiario.es*. [onLine] <https://www.eldiario.es/consumoclaro/por_derecho/kombucha-bebida-peligrosa_1_1157902.html>
- [6] Rubio-Castillo A.E., Santiago-López L., Vallejo-Cordoba B., Hernández-Mendoza A., Sáyago-Ayerdi S.G., González-Córdova A.F. (2021). Traditional non-distilled fermented beverages from Mexico to based on maize: An approach to Tejuino beverage. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. **23**(100283):1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100283>.