



Universidad
Rey Juan Carlos

GRADO EN BIOLOGÍA
Curso Académico 2024/25
Trabajo de Fin de Grado

**ESTUDIO DEL BIOFILM DE KOMBUCHA COMO
TEJIDO Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA
TEXTIL**

Autora: Adriana Martínez Arroyo

Directoras: María del Pilar Martínez Hidalgo

María Mercedes Uscola Fernández

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
Cultivo de kombucha.....	6
Cuantificación de las características físicas de los <i>biofilms</i>	7
Cálculo de unidades formadoras de colonia y aislamiento de microorganismos de la kombucha.....	9
Estudio microscópico	10
Estudio de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono	10
Conservación de cepas.....	11
Análisis estadísticos.....	11
3. RESULTADOS	11
Parámetros físicos del biofilm de kombucha	11
Unidades formadoras de colonias (UFC).....	15
Características morfológicas y fenotípicas de las cepas aisladas.....	17
4. DISCUSIÓN	18
5. CONCLUSIÓN	22
6. LÍNEAS FUTURAS	22
7. AGRADECIMIENTOS	23
8. BIBLIOGRAFÍA	23
9. ANEXO	29

1. INTRODUCCIÓN

La kombucha es una bebida producida a raíz de la fermentación de un consorcio de microorganismos, compuesto por levaduras y bacterias, sobre una infusión de té con azúcar, que resulta en una bebida ligeramente dulce y con un toque de acidez (Illiana, 2007).

Es originaria de Asia Oriental, su primer uso registrado fue durante el imperio chino de la dinastía Tsin, en el 221 AC. (Delgado, 2015), donde era conocido como el Divino Tsche, debido a sus “propiedades mágicas” (Illiana, 2007). Más adelante se introdujo en Corea y Japón para tratar los problemas gastrointestinales del emperador, y a través de distintos viajeros, se expandió por el este de Asia llegando a Rusia, y después, a Alemania (*Kombucha - Unabhängige Infoseite*, s. f.). Actualmente, esta bebida cada vez está alcanzando mayor popularidad debido a los beneficios que posee (Illiana, 2007).

El libro “Kombucha, bebida saludable y remedio natural del lejano oriente”, del autor Alemán Günter Frank, es uno de los más significativos dedicados únicamente a la kombucha. En él, además de explicar todo lo necesario para fabricarla, Frank habla sobre los beneficios para la salud al beberla, ya que, además de conservar las características del té en el que crece, que posee polifenoles y una alta capacidad antioxidante (De la Montaña Durán-Barrantes, 2022). La kombucha tiene efectos tanto probióticos, relacionados con una mejora digestiva, favoreciendo la absorción y metabolismo de nutrientes ya que contienen bacterias beneficiosas para la salud intestinal, como prebióticos, que sirven de alimento para estas bacterias beneficiosas (De la Montaña Durán-Barrantes, 2022). Otros beneficios relacionados con el consumo de kombucha incluirían propiedades anticancerígenas (Jayabalan *et al.*, 2011), efectos beneficiosos en la gestión de la diabetes (Aloulou *et al.*, 2012), o contribución a la reducción de la inflamación y mejora del sistema inmunológico (Leal *et al.*, 2018).

La kombucha tiene una composición microbiana con diversidad de géneros, entre los que se pueden encontrar: *Gluconobacter*, *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Lactobacillus* (Jayabalan *et al.*, 2014). Las especies de microorganismos presentes en la kombucha varían dependiendo de factores como la fuente de carbono que se emplee y su cantidad, el tipo de té, los metabolitos producidos durante la fermentación o la temperatura ambiental (Laavanya *et al.*, 2021).

Dentro de este ecosistema microbiano, hay unos géneros que son capaces de producir celulosa, un biopolímero que se forma durante el proceso de fermentación. Los géneros que se encargan de la producción de celulosa microbiana en la kombucha son *Gluconobacter*, *Acetobacter*, y *Gluconoacetobacter* (Salazar-Manzanares *et al.*, 2023). Estas bacterias, Gram-negativas, aeróbicas y catalasa positivas, convierten la glucosa en ácido glucónico y los alcoholes producidos por las levaduras en ácido acético y luego sintetizan la celulosa (Gullo *et al.*, 2018). La celulosa microbiana se produce fuera de la

célula en forma de fibrillas que se unen a la célula bacteriana formando una biopelícula o *biofilm* que flota sobre la superficie del líquido, protegiendo a los microorganismos de la kombucha, y es denominada SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast) (Podolich *et al.*, 2017). Esta forma de producir celulosa tiene la ventaja de que el *biofilm* crece rápidamente bajo condiciones controladas. Además, la estructura de las fibrillas de celulosa formada, ensambladas en estructuras tridimensionales, puede retener mucha agua, lo que confiere al *biofilm* gran conformabilidad y elasticidad cuando está húmedo (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

Los *biofilms*, además de ser materiales ecológicos y renovables debido a que son biodegradables, presentan diferentes características, como una buena elasticidad, resistencia mecánica y gran capacidad de absorción de líquidos, que los hacen muy atractivos en el ámbito industrial (Avcioglu *et al.*, 2021). De hecho, han sido empleados en ámbitos como la electrónica, la industria alimentaria, en medicina y dispositivos biomédicos, empaquetado de comida, o la industria textil (Laavanya *et al.*, 2021). Optimizar la producción de estos *biofilms* utilizando medios de bajo costo podría suponer un cambio en la dinámica de la industria.

La industria de la moda es considerada la segunda más contaminante del mundo, solo superada por la industria petrolera (Cuetara & García, 2021). En la conferencia de las naciones unidas para el comercio y desarrollo (UNCTAD), se afirma que el rubro del vestido produce más emisiones de carbono que todos los vuelos y envíos marítimos internacionales juntos, cada año utiliza 93.000 millones de metros cúbicos de agua y tiran al mar medio millón de toneladas de microfibras, lo que equivale a 3 millones de barriles de petróleo (Cuetara & García, 2021). Además, en Europa, las etapas correspondientes a la producción textil son las principales responsables del impacto ambiental de esta industria, siendo mucho menos significativos los impactos ambientales producidos durante otras etapas como la distribución o su fin de vida (Gallissà, 2017).

La utilización del SCOBY en la industria textil, como “biotejido”, podría suponer una manera de abogar por la sostenibilidad en este sector tan contaminante, y dependería, principalmente, de la automatización del proceso de producción del *biofilm*. Diseñar un proceso universal para la fabricación de este material es un objetivo que ha experimentado una considerable evolución en los últimos años, no solo para lograr eficiencia, sino también para asegurar una calidad constante, estandarización, y optimización de costos en la producción (Redondi, 2023). Para el correcto diseño de este proceso automatizado, se deben tener en cuenta las diferentes características que afectan al SCOBY, tanto de manera física como a la comunidad microbiana que lo compone.

Uno de los parámetros que mayor impacto tiene sobre las características del *biofilm* sería el inóculo empleado en la elaboración de la kombucha. Diferentes inóculos afectan no solo a la fermentación, sino también a la textura, el grosor y la estabilidad del SCOBY. Por ejemplo, el uso de inóculos con una alta concentración de microorganismos puede favorecer un crecimiento más robusto del *biofilm*, lo que supondría una mayor producción de biomasa y una estructura más densa (Fernandes *et al.*, 2024). Como otro ejemplo, el

tipo de inóculo puede afectar a la viabilidad de las bacterias ácido-acéticas, que son fundamentales para la producción de ácido acético, que a su vez impacta en la formación y estabilidad del SCOBY durante el proceso de fermentación (Maciuca *et al.*, 2022).

Por otro lado, la relación entre el inóculo y el sustrato también es fundamental. El tipo de té utilizado en la elaboración de la kombucha tiene un impacto significativo en las características del *biofilm*, cada tipo de té aporta diferentes nutrientes y compuestos bioactivos, lo que puede resultar en variaciones en los microorganismos y, por ende, en las características físicas del *biofilm* (Zailani & Adnan, 2022). Por ejemplo, el uso de té negro ha mostrado generar un ambiente que favorece la proliferación de bacterias ácido-acéticas que participan en la formación de la película de celulosa (Njieukam, 2024).

Otra cosa a tener en cuenta para la utilización del *biofilm* de kombucha como “biotejido” sería la optimización del precio de su producción, pues sería importante contar con un modelo que fuese lo más económico posible para que su utilización en la industria fuera viable.

En la estandarización de la producción de un tejido en la industria textil, algunas de las características físicas más valoradas incluyen su resistencia, que determina la capacidad del tejido para soportar deformaciones sin romperse, la flexibilidad o elasticidad, que influye en cómo se adapta el tejido al cuerpo, la textura, que no solo afecta a la estética del producto, sino que también puede influir en la percepción de calidad por parte del consumidor, por ejemplo, tejidos más rugosos son generalmente menos valorados en la moda (Castro & Salas, 2022) o la presencia de agujeros, que puede hacer que el tejido sea menos reproducible (Chávez *et al.*, 2023).

Otro parámetro interesante para estudiar en los tejidos es la capacidad de retención de agua o WHC (*Water Holding Capacity*), en especial en los tejidos fabricados con celulosa microbiana, ya que este parámetro está relacionado con su elasticidad y resistencia. Una mayor capacidad de retención de agua supone una estructura de nanofibras más sueltas o separadas, que retienen mejor el agua (Avcioglu *et al.*, 2021), esto implicaría una mayor flexibilidad en el material de celulosa, ya que, al estar las nanofibras menos compactas, la celulosa podría ser más elástica. Sin embargo, esto también podría implicar una menor dureza en el material, ya que, al presentar una estructura más suelta, el material tendría menor densidad (Kramar & González-Benito, 2022). Sin embargo, cuando estos materiales de celulosa están secos, la dinámica cambia, pues un *biofilm* con un WHC alto, se verá más afectado por la pérdida de agua, sufriendo un mayor cambio en su estructura que un material con un WHC más bajo. Esto se debe a que los materiales con alta WHC tienden a contener más agua en su estructura, por lo que sus propiedades físicas y características mecánicas dependen en gran medida de la presencia de agua (Samyn, 2013).

El objetivo de este trabajo es la comparación de los *biofilms* de kombucha cultivada a partir de diferentes inóculos y tipos de té. Para ello, se estudiarán las comunidades microbianas presentes en las kombuchas, así como las características físicas del *biofilm* que pueden afectar a su viabilidad como tejido. Esperamos encontrar diferencias en las

características del *biofilm* dependiendo del tipo de inóculo empleado, siendo un inóculo adquirido especializado para el cultivo de kombucha el que mejor reproducibilidad, textura y grosor ofrezca a los *biofilms*, debido a que ya procede de un proceso industrial y contará con una concentración de microorganismos favorable para el crecimiento del *biofilm*. Además, se anticipa que el tipo de té también causará que se formen biofilms con diferentes características: el uso de un té con un precio más elevado como sustrato aportará una mejor concentración de nutrientes para el crecimiento de una comunidad microbiana con una buena proporción de bacterias acéticas, que mejorarán la formación del *biofilm*, debido a que el sustrato será de mejor calidad.

De esta manera, conociendo la importancia de utilizar inóculos más o menos accesibles y té más caros o económicos en las características del *biofilm*, y como esto afecta a su calidad como tejido, estaremos contribuyendo a la estandarización del proceso de fabricación de un tejido sostenible y su posible utilización en una industria tan contaminante como la industria textil.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de kombucha

Se realizó un experimento factorial completo con dos factores: En primer lugar, el inóculo empleado en la kombucha, con dos tipos de inóculos diferentes y, en segundo lugar, el sustrato de té, con dos tipos de té. El estudio se dividió en 4 tratamientos con 8 repeticiones.

Para obtener la kombucha, primero se prepararon dos inóculos iniciales. Estos se realizaron en 800mL de agua destilada y esterilizada y, siguiendo las instrucciones de Aedo (2011), se añadieron 6g de té negro y 85g de azúcar blanco. Luego se dejaron enfriar hasta que la mezcla de té estuvo atemperada. Para cada tratamiento se emplearon diferentes inóculos. Mientras que en el primero se adquirió un disco de SCOBY de un productor de kombucha, el segundo inóculo provino de los posos de una kombucha de la marca *Komvida*, que, tras descartar la parte superior de líquido de la botella, se centrifugó a 2500 revoluciones durante 7 minutos y medio para concentrar el inóculo. Una vez descartado el sobrenadante, se utilizó el precipitado obtenido como inóculo depositándolo en el vaso de té. Estos medios se taparon con un paño esterilizado en autoclave y se dejaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 25 días, para que crecieran los *biofilms*. Tras esto, se prepararon los recipientes utilizados para el estudio, 32 vasos de vidrio esterilizados en autoclave donde se dispusieron 100mL de medio de cultivo de té antes descrito.

El primer tratamiento (1C), contenía el inóculo de la kombucha comprada al proveedor y un té negro de la marca *twinings*, con un precio más elevado (estimado en unos 0,105€/g), mientras que en el segundo (1B), con el mismo inóculo, se empleó té negro de la marca

ship, una marca más económica (precio estimado en unos 0,033€/g). El tercer tratamiento (2C) y el cuarto (2B) fueron inoculados a partir del *biofilm* obtenido de la kombucha de *komvida*, y se emplearon el té más caro y el más barato respectivamente. En la preparación de los tés se utilizó el mismo procedimiento anteriormente descrito, con las mismas cantidades de té y azúcar. Estas preparaciones se taparon con paños esterilizados y se incubaron en una estufa a 27 grados durante 10 días.

Una vez que los *biofilms* hubieron crecido, se analizaron distintos parámetros. Por un lado, se hizo una cuantificación de algunas características físicas de los *biofilms*, incluyendo la capacidad de retención de agua, la rugosidad de las muestras, el número de agujeros que pudieran presentar y por último la resistencia a la rotura de los *biofilms*. Por otro lado, se hizo un estudio microscópico de las kombuchas, incluyendo el conteo de las unidades formadoras de colonias, aislamiento de cepas, tinción Gram y observación al microscopio y pruebas enzimáticas, así como se estudió el crecimiento de las cepas en un medio con carboximetilcelulosa como única fuente de carbono.

Cuantificación de las características físicas de los *biofilms*

Water Holding Capacity

El *Water Holding Capacity* (WHC) o la capacidad de retención de agua equivale al peso del agua retenida por el peso seco del *biofilm* (Watanabe *et al.*, 1998). Se utiliza esta medida ya que está relacionada con la porosidad y la superficie de la matriz de fibras de celulosa que forma el *biofilm* (Ul-Islam *et al.*, 2012).

Para calcular el WHC se empleó el método descrito por Schrecker y Gotomski (2005), en el que cada *biofilm* fue agarrado por pinzas, colocado en un tamiz y sacudido rápidamente un par de veces. Tras esto se anotaron sus pesos utilizando una báscula (ABJ220-4NM, Kern & Shon, Alemania). Después, se dejaron secar a temperatura ambiente y, tras 7 días, se volvieron a pesar en la misma balanza.

Para calcular el WHC se utilizó la siguiente fórmula (Schrecker & Gotomski, 2005), en la que la masa de agua eliminada durante el secado supone la diferencia entre el peso inicial y el final:

$$WHC = \frac{\text{masa de agua eliminada durante el secado (g)}}{\text{peso seco del biofilm (g)}}$$

Rugosidad y homogeneidad

Para poder medir las diferencias en la textura y homogeneidad de los *biofilms*, se utilizó una escala de rugosidad de creación propia, con valores del 1 al 3, siendo 1 una superficie muy lisa y plana y 3 una superficie muy rugosa y con protuberancias (figura 1).



Fig. 1: *Biofilm* de Kombucha. Ejemplo escala de rugosidad niveles 1, 2 y 3 de izquierda a derecha.

Número de agujeros

Además, se hizo un conteo del número de agujeros que presentaban algunos *biofilms* de las diferentes kombuchas (figura 2).



Fig. 2: *Biofilm* de Kombucha. Ejemplos sin agujeros, con 2 y 3 agujeros, respectivamente.

Resistencia a la rotura

Para medir la resistencia a la rotura, se utilizó un sistema que consistió en doblar cada uno de los *biofilms* por la mitad -plegado- y en posición plegada aplastarlos sobre una superficie plana y lisa. Finalmente, desdoblar cada *biofilm* observando si había aparecido algún tipo de fisura, o si, por otro lado, recuperaban su forma original sin problema y no se veían afectados tras desdoblarlos. Por lo que esta variable tomaba dos posibles resultados, (1) representando la rotura y (0) la recuperación de su forma original.



Fig. 3: *Biofilms* de Kombucha. El de la izquierda presentó roturas al doblarse, mientras que el de la derecha, no presentó ninguna fisura tras doblarse.

Cálculo de unidades formadoras de colonia y aislamiento de microorganismos de la kombucha

Se realizó un estudio de las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) y un posterior aislamiento de las cepas morfológicamente diferentes provenientes de las kombuchas donde se generaron los *biofilms*. Para ello, a la par que se pusieron a secar los *biofilms*, se extrajo 1 mL de cada una de las kombuchas. Con cada una de estas muestras se realizaron diluciones decimales seriadas en PBS hasta 10^{-2} , ya que, tras una primera prueba, se concluyó que esas concentraciones serían las adecuadas para el posterior conteo.

Una vez hecho esto, se sembraron $100\mu\text{L}$ de las diluciones en placas con dos medios diferentes. Uno de los medios, que denominamos medio de té, contenía la misma mezcla de té y azúcar indicada previamente siguiendo las instrucciones de Aedo (2011), 6g de té negro y 85g de azúcar blanco, mezclado con agar a una concentración de 16g/L. Este medio se creó con el propósito de simular las condiciones de crecimiento que tienen los microorganismos en la kombucha. El otro medio, denominado TJA (Maciuca *et al.*, 2022), contenía hidrolizado enzimático de caseína (10g/L), jugo de tomate (20g/L), leche peptonizada (10g/L) y agar (11g/L). Este medio se empleó adicionalmente al de té ya que favorece el crecimiento de bacterias ácido-lácticas y levaduras para conseguir el mayor número de aislados diferentes posible.

Cuando se pudo observar el crecimiento en las placas de ambos medios, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas de los medios de té y TJA, a concentraciones de 10^{-1} y 10^{-2} . Para ello se tuvieron en cuenta las placas en las que crecieron entre 30 y 300 colonias y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{mL de la muestra}}$$

Para el aislamiento de las cepas se realizó una resiembra en placas con ambos medios (té y TJA), eligiendo las colonias que presentaban diferentes morfologías.

Estudio microscópico

Para la observación al microscopio de los microorganismos de las colonias aisladas, se realizó una tinción diferencial Gram y se observaron analizando la forma de la célula y el Gram de los microorganismos (Javier, 2018).

Además, se realizó otra resiembra de estas cepas para hacer una caracterización de la actividad enzimática con las pruebas de oxidasa y catalasa. Con la prueba de la catalasa, utilizada para detectar la enzima catalasa, podemos diferenciar entre bacterias de ácido láctico con catalasa negativa (encargadas de la acidificación del medio, convirtiendo los azúcares en ácido láctico y creando buenas condiciones para las demás bacterias) y bacterias acéticas con catalasa positiva (encargadas de la producción de la celulosa que forma el *biofilm*, convirtiendo los alcoholes producidos por las levaduras en ácido acético y secretando celulosa). Por otro lado, con la prueba de la oxidasa, utilizada para detectar la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, podemos distinguir bacterias aeróbicas, con oxidasa negativa, presentes en la kombucha como *Acetobacter* y *Gluconobacter*, de las anaerobias, con oxidasa positiva, no deseadas en la kombucha, que podrían indicar algún tipo de contaminación (Brooks *et al.*, 2013).

En la prueba de la catalasa se aplica peróxido de hidrógeno en las muestras de cada cepa sobre un portaobjetos, observando si hay reacción, la formación de burbujas indica la presencia de catalasa. En la prueba de la oxidasa el procedimiento es similar, en lugar del peróxido de hidrógeno se añade reactivo de oxidasa, que provoca un cambio de color en la muestra si la bacteria es oxidasa positiva. Ambas pruebas son rápidas de preparar y se obtienen resultados inmediatos (Ruiz-Toquica *et al.*, 2020).

Estudio de carboximetilcelulosa como única fuente de carbono

Por último, se realizó una última resiembra de las cepas aisladas en un medio con carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono. El medio se realiza mezclando tres soluciones preparadas por separado y esterilizadas de diferentes maneras: La primera contiene la fuente de carbono en concentración % y tuvo que ser tinalizada a 100 °C durante 20 minutos una vez al día durante 3 días consecutivos. Para la segunda, se utilizó un medio comercial denominado Yeast Nitrogen Base 10X, que se esterilizó por filtración. La última contenía una concentración de 50 mg por 100mL de KH_2PO_4 y MgSO_4 y agar a una concentración de 1,8% (Martínez-Hidalgo, 2013). 10µL de cada cepa fueron inoculados en este medio, y se incubaron a 27 °C durante 20 días y se marcaron como positivas aquellas cepas en las que se observó crecimiento.

Conservación de cepas

Para la conservación de las cepas aisladas, se utilizó el método de congelación, con el que las cepas se congelan en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se almacenan a muy baja temperatura, (Arencibia, 2008). En muchos casos, se utiliza el glicerol como agente crioprotector (Prakash *et al.*, 2012). Una vez se aislaron las cepas, se suspendieron en una solución de glicerol al 20%, para luego almacenarse en un congelador a -80 grados centígrados.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos de las características físicas de los biofilms se empleó el programa RStudio (R Core Team, 2020). Las respuestas de las diferentes características estudiadas se analizaron respecto a las variables explicativas: tipo de inóculo, representados con números (siendo 1 el inóculo adquirido y 2 el fabricado de la kombucha *komvida*), el tipo de té, representados con las letras b y c (siendo té barato y caro respectivamente) y la interacción entre ambos.

La respuesta de WHC se analizó con un modelo lineal usando la función *lm*. Para el efecto de la resistencia a la rotura se empleó un modelo generalizado de la familia binomial con la función *glm* del paquete “lme4” (Bates *et al.*, 2015). El número de agujeros que presentaban los *biofilms* se analizó con un modelo generalizado de la familia *poisson*, con la función de *glm*. Para la rugosidad se empleó un análisis de tipo multinomial ordinal con la función de *polr* del paquete “MASS” (Venables & Ripley, 2002). El efecto del tipo de té e inóculo en UFC se analizó utilizando un modelo generalizado de la familia *poisson* para cada medio de cultivo de forma independiente con la función *glm*.

Una vez se realizaron los análisis, en las características que presentaban efectos sobre los resultados, se realizaron comparaciones múltiples de medidas (*poshoc*), con la función *glht* del paquete “multcomp” (Hothorn *et al.*, 2008).

3. RESULTADOS

Parámetros físicos del biofilm de kombucha

Capacidad de retención de agua (WHC)

Para el WHC (fig. 4), el efecto del inóculo ($F_{1,28}=17.16$, $p<0.001$) dio lugar a diferencias significativas en la capacidad de retención de agua de los *biofilms*. Los tratamientos inoculados con la kombucha adquirida (1) presentaron mayor capacidad de retención de agua que los inoculados con la kombucha de *komvida*. Sin embargo, ni el tipo de té ($F_{1,28}=0.33$, $p=0.57$) ni la interacción entre té e inóculo ($F_{1,28}=1.69$, $p=0.20$) afectaron a la capacidad de retención de agua de los *biofilms*.

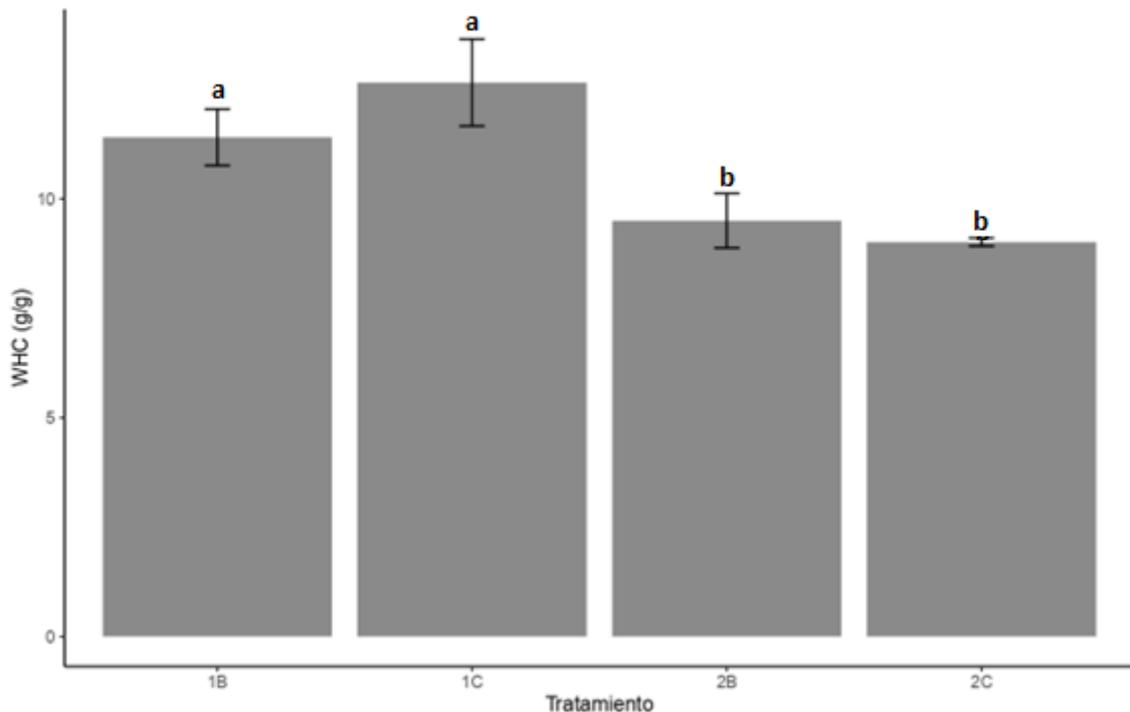


Fig.4: Gráfico de barras (medias \pm error estándar) de la capacidad de retención de agua (WHC) de los *biofilms* de kombucha, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas según la comparación múltiple de medias.

Resistencia a la rotura

El efecto del inóculo ($F_{1,28}=35$, $p<0.001$), el de tipo de té ($F_{1,28}=5,17$, $p=0.030$) y la interacción entre ambos ($F_{1,28}=36$, $p<0.001$) generaron diferencias significativas en la resistencia a la rotura entre los diferentes *biofilms*. Los tratamientos inoculados con la kombucha adquirida (1) presentaron roturas al doblarlos, pero el efecto fue distinto según el tipo de té (figura 5). En los *biofilms* preparados con el té caro (1C), todos presentaron roturas, mientras que en el tratamiento 1B, preparado con el té económico, solo se rompió un 25% de los *biofilms*. Por el contrario, ningún *biofilm* proveniente de la kombucha inoculada con *komvida* presentó ninguna rotura tras su doblez.

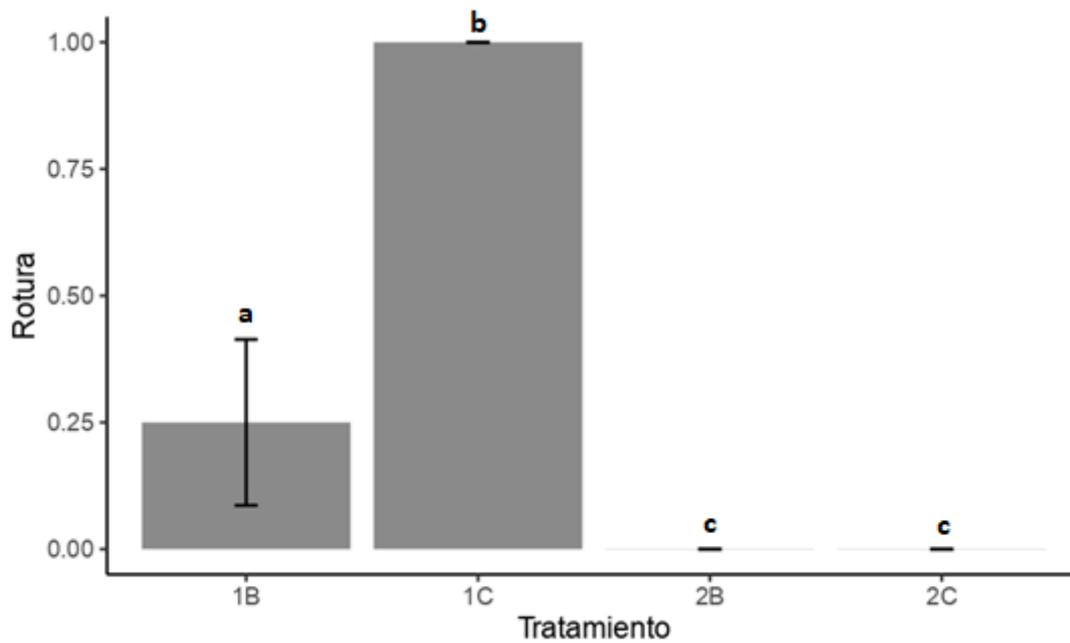


Fig.5: Gráfico de barras (medias \pm error estándar) de la rotura de los *biofilms* de kombucha, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas según la comparación múltiple de medias.

Número de agujeros

La interacción entre té e inóculo ($F_{1,28}=135$, $p<0.001$) generó diferencias significativas en el número de agujeros que presentaron los *biofilms* (figura 6), así como el tipo de té ($F_{1,28}=30$, $p<0.001$) y el tipo de inóculo ($F_{1,28}=30$, $p<0.001$), ya que solo presentó agujeros el tratamiento 1B, con el inóculo adquirido y el té barato. Ningún otro tratamiento presentó agujeros en ningún *biofilm*.

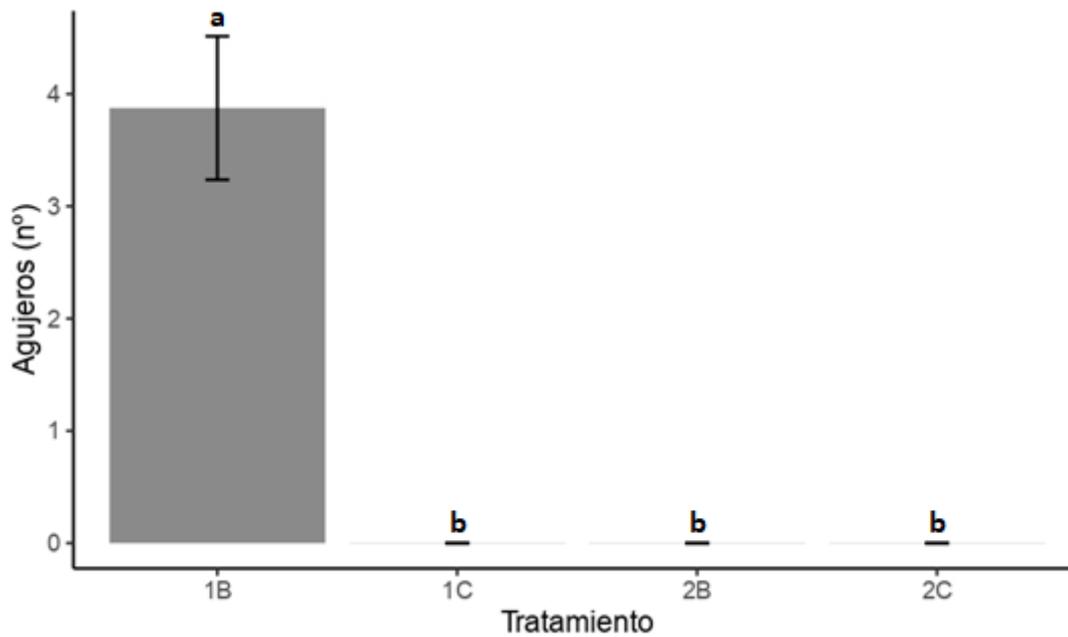


Fig.6: Gráfico de barras (medias \pm error estándar) del número de agujeros de los *biofilms* de kombucha, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas según la comparación múltiple de medias.

Rugosidad

Tanto el efecto del inóculo ($\chi^2_{1,28}=4,95$, $p=0.026$), como el tipo de té ($\chi^2_{1,28}=4,53$, $p=0.033$) y la interacción entre ambos ($\chi^2_{1,28}=4,53$, $p=0.033$) generaron diferencias significativas sobre el nivel de rugosidad de los *biofilms* (figura 7). Los *biofilms* del tratamiento 1C, con el inóculo adquirido y el té caro, fueron los que presentaron mayor probabilidad de tener un mayor grado de rugosidad que los demás tratamientos.

Además, los *biofilms* inoculados con la kombucha de *komvida* (2) fueron los que presentaron menor probabilidad de ser más rugosos, siendo los *biofilms* del tratamiento 2C, con el té caro, los que tuvieron mayor probabilidad de presentar una textura lisa. Además, el tratamiento 1B, con el té barato y el inóculo adquirido, presentó menor probabilidad de ser muy rugoso que el 1C.

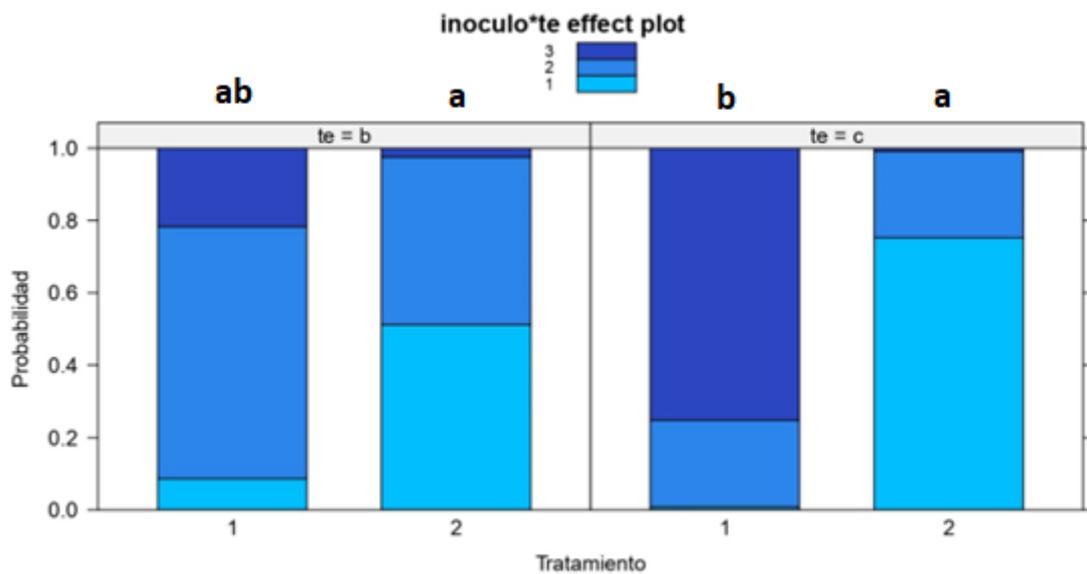


Fig.7: Gráfico de barras con las medias de la probabilidad de los *biofilms* de presentar diferentes niveles de rugosidad atendiendo a la escala de rugosidad establecida: 1, 2 o 3, siendo 1 un *biofilm* poco rugoso y 3 un *biofilm* muy rugoso, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas según la comparación múltiple de medias.

Unidades formadoras de colonias (UFC)

- Medio de té (Figura 8):

En el medio de té, el efecto del tipo de té ($F_{1,51}=1292$, $p<0,001$), el del inóculo ($F_{1,51}=1446597$, $p<0,001$) y el de la interacción entre ambos ($F_{1,51}=26743$, $p<0,001$) generaron diferencias significativas sobre el número de unidades formadoras de colonias de los cultivos de kombucha. La influencia del inóculo fue más notable que la del tipo de té. En general, los *biofilms* formados con el inóculo adquirido (1) dieron lugar a un mayor número de UFC que los inoculados con la kombucha de *komvida* (inóculo 2). Además, en el inóculo 1, los *biofilms* cultivados con te caro (C) presentaron ligera pero significativamente mayor UFC que con el te barato (B), mientras que con el inóculo 2 el resultado fue inverso.

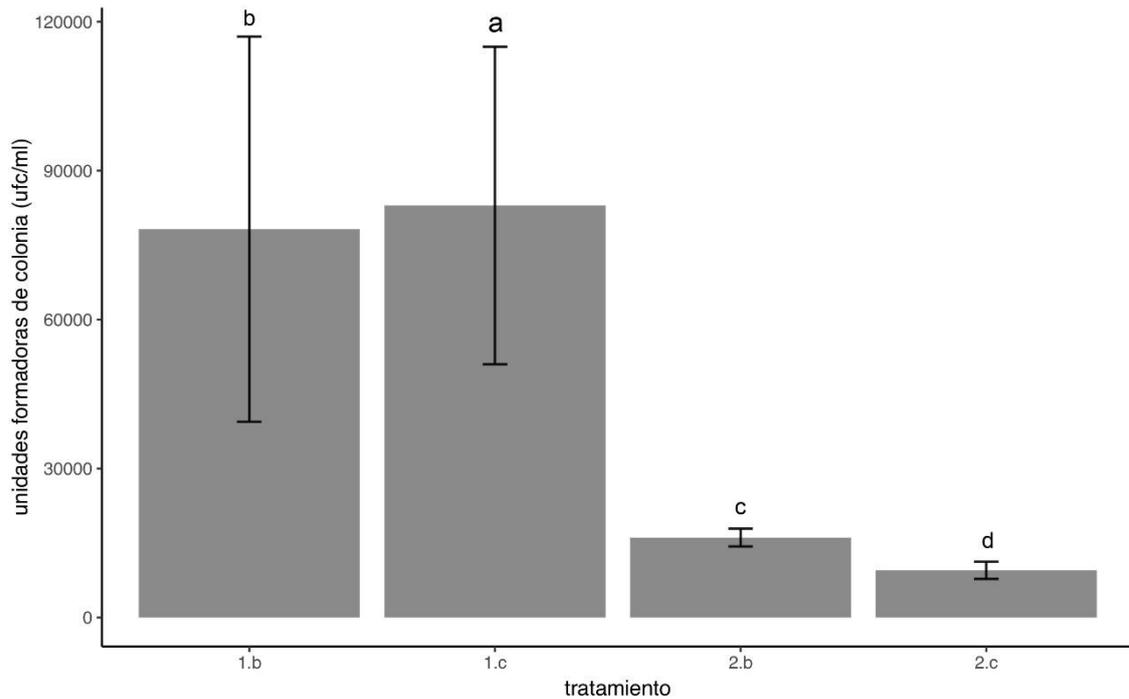


Fig.8: Gráfico de barras (medias \pm error estándar) de las UFC/mL de los cultivos de kombucha en el medio de té, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas según la comparación múltiple de medias.

- Medio de TJA (Figura 9):

En el medio de TJA, el efecto del té ($F_{1,32}=142346$, $p<0,001$), el del inóculo ($F_{1,32}=301234$, $p<0,001$) y la interacción entre ambos ($F_{1,32}=278570$, $p<0,001$) también generaron diferencias significativas sobre el número de UFC en los cultivos de kombucha. Aunque en este caso, el efecto del inóculo no fue el más notable, el tratamiento 2C tuvo un mayor número de UFC que el 2B, siendo el tratamiento con el té barato y el inóculo de *komvida* (2B) el que menor número de UFC presentó.

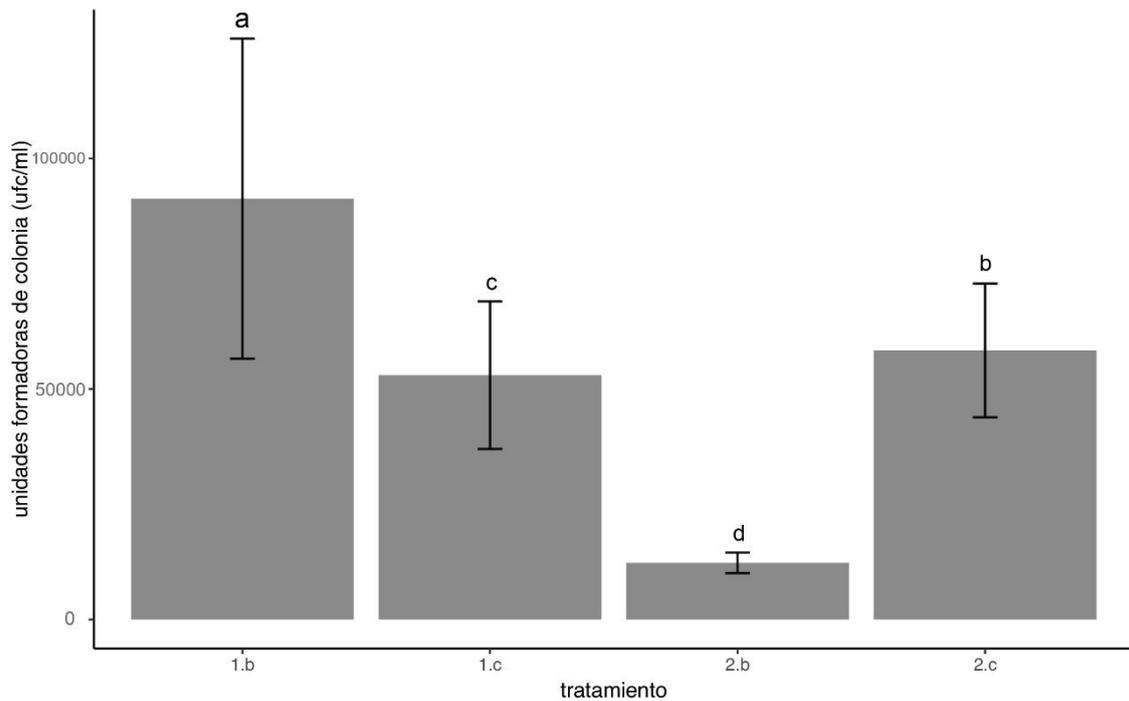


Fig.9: Gráfico de barras (medias \pm error estándar) de las UFC/mL de los cultivos de kombucha en el medio de TJA, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticas según la comparación múltiple de medias.

Características morfológicas y fenotípicas de las cepas aisladas

En la tabla 1, que resume los datos obtenidos de los diferentes estudios de las cepas aisladas, se puede ver que hubo un predominio de células eucariotas, que representaron el 83,33% del total de las cepas que se aislaron, pudiendo encontrarse en ambos medios y en los *biofilms* de todos los tratamientos. Tras la observación al microscopio, se pudieron ver células grandes, con forma redondeada, que en algunas ocasiones presentaron vainas o tubos germinales. Posiblemente fuesen levaduras. Además, en el tratamiento 2C se encontraron dos cepas con células grandes y alargadas que posiblemente correspondiesen a paramecios.

También se observaron bacterias, aunque en menor proporción, ya que solo supusieron un 8,33% de todas las cepas obtenidas. Se observaron cocos y bacilos cortos Gram -, todos con oxidasa y catalasa negativas tras realizarse las pruebas, lo que indica que posiblemente fuesen bacterias ácido-lácticas, puede que pertenecientes al género *Lactobacillus*. Estas bacterias solo se observaron en los tratamientos con el inóculo adquirido (1), y se encontraron en mayor medida en el tratamiento 1C, ya que supusieron un 23,01% de las cepas obtenidas en ese tratamiento.

Además, fue en los tratamientos con el inóculo adquirido donde también se encontró un mayor número de eucariotas, los tratamientos 1 contaron con un 63,33% del total de las cepas eucariotas que se encontraron. También fueron los tratamientos con más diversidad

y mayor número de cepas aisladas, representando entre los dos tratamientos un 63,88% de las cepas obtenidas en todo el estudio.

Se pudo observar crecimiento en medio con carboximetilcelulosa (CMC) como única fuente de carbono de cepas pertenecientes a todos los tipos de *biofilms*, un 41,67% de las cepas presentaron crecimiento en este medio, el tratamiento con mayor cantidad de cepas con crecimiento en medio con CMC como única fuente de carbono fue el 2B, con un 33,33% del total de las cepas con crecimiento en CMC. Un 93,33% de las cepas que crecieron en CMC correspondía a células eucariotas (Anexo 1). Además, los tratamientos con el inóculo adquirido (2) presentaron una mayor proporción de cepas con crecimiento en CMC, en el tratamiento 2B, un 83,88% de las cepas aisladas presentó crecimiento en CMC, en el 2C, un 57,14%, sin embargo, en los tratamientos con el otro inóculo, hubo una menor proporción de cepas con crecimiento en CMC, en el 1C, un 30,77% de las cepas que se cultivaron, presentó crecimiento en CMC, y en el 1B, tan solo un 20%.

Tabla 1: Número de cepas según su clasificación a raíz de las características observadas al microscopio de los aislados de kombucha y el número de éstas que crecieron en el medio con CMC como única fuente de carbono tras una resiembra, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados con la kombucha de *komvida* en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro.

Tratamiento	Microorganismo					CMC
	Eucariota	Procariota				
		Gram +		Gram -		
		Cocos	Bacilos cortos	Cocos	Bacilos cortos	
1C	10	0	0	2	1	4
1B	9	0	0	1	0	2
2C	5 (2*)	0	0	0	0	4
2B	6	0	0	0	0	5

4. DISCUSIÓN

Los resultados indican que existen diferencias significativas en todas las características estudiadas de los *biofilms* de kombucha según el inóculo que se emplee.

Los tratamientos inoculados con la kombucha adquirida (1C y 1B), presentaron mayor WHC que los inoculados con la kombucha de *komvida*, siendo el 1C el que mayor WHC presentaba de todos los tratamientos. Esto es contrario a la resistencia, ya que fueron estos mismos tratamientos (1C y 1B), los que presentaron algún tipo de rotura, siendo el 1C el que mayor rotura presentó. Esto puede ser debido al secado de los *biofilms*. Nuestros resultados concuerdan con la bibliografía en la que se defiende que cuando un material

con un alto grado de WHC se seca y pierde el agua, sus fibras de celulosa experimentan una contracción muy significativa, que puede resultar en la reducción de su resistencia y en cambios permanentes en la estructura del material, algo que no ocurre de la misma manera en materiales con menor WHC (Samyn, 2013). Al tener mayor WHC, los tratamientos 1C y 1B presentaron mayor elasticidad y una estructura menos compacta, pero, al secarse, perdieron resistencia y se vieron más afectados por la sequedad su estructura que la de los *biofilms* del otro inóculo (2C y 2B), que no vieron tan modificada su estructura al perder el agua, manteniendo una mayor elasticidad y resistencia a la rotura una vez secos.

Además, fueron también los *biofilms* generados con el inóculo adquirido (1) los que mayor grado de rugosidad presentaron y más probabilidades de generar textura rugosa tenían. Esto puede atender de nuevo a la mayor afectación de los *biofilms* con mayor WHC a la pérdida de agua. Al sacarse de sus respectivas kombuchas, todos los *biofilms* presentaban una superficie lisa acuosa, por lo que se puede asumir que la textura rugosa se generó al secarse los tejidos. En general, los materiales que presentan mayor elasticidad tienden a mostrar una menor rugosidad en comparación con aquellos con menor elasticidad (Golhin et al., 2023). En los *biofilms* que presentan mayor flexibilidad y elasticidad una vez secos, la textura fue menos rugosa, se puede suponer, debido a la mayor maleabilidad, suavizando las rugosidades con su manipulación o simplemente con el efecto de la gravedad. Mientras que, en los *biofilms* que presentaron una estructura más seca y frágil, se observó una textura más rugosa, debido a la contracción desigual de un material que pierde el agua y no tiene la elasticidad necesaria para perder esa rugosidad.

En cuanto al número de agujeros, fue el tratamiento 1B el que presentó mayor número de éstos, con la kombucha adquirida y el té barato. La presencia de agujeros en el SCOBY podría estar asociada a la producción de gas durante la fermentación. El metabolismo de la kombucha es un proceso aeróbico, que genera dióxido de carbono, que puede quedar atrapado en el *biofilm* y acumularse (Villarreal-Soto et al., 2018). Una kombucha que genere mayores cantidades de CO₂ podría llegar a formar grandes burbujas de este gas en el *biofilm*, que, tras su secado, acaban produciendo agujeros. La presencia de *biofilms* con agujeros en el tratamiento 1B coincide con el mayor número de UFC en este tratamiento por encima de los otros 3. Además, también fue en 1B donde se encontró un mayor número de eucariotas, posibles levaduras, por lo que un gran número de estas levaduras que generan CO₂ podría estar relacionado con la presencia de agujeros en los *biofilms* de kombucha. Es posible, por tanto, que una kombucha con una menor proporción de levaduras de lugar a un tejido más homogéneo, sin agujeros.

Teniendo en cuenta todo esto, podríamos decir que los *biofilms* formados con el inóculo adquirido, pertenecientes a los tratamientos 1B y 1C, fueron los que presentaron mayor rugosidad, WHC, menor resistencia y el tratamiento 1B, agujeros. Es decir, características quizá menos favorables de cara a la producción industrial del *biofilm* de kombucha como tejido. Además, fueron estos mismos tratamientos los que contaron con un mayor número de UFC, una mayor diversidad taxonómica, siendo los únicos en los que se pudieron aislar bacterias y los que también presentaron más levaduras.

Las bacterias encontradas podrían corresponder a bacterias lácticas. Las bacterias lácticas no desempeñan un papel principal en la formación del SCOBY, pues, aunque son importantes para estabilizar la matriz del *biofilm*, son las bacterias acéticas las principales responsables de la formación del SCOBY (Gullo *et al.*, 2018). Teniendo en cuenta los resultados, podríamos suponer que las bacterias lácticas no benefician la creación de un *biofilm* con unas características físicas favorables para su utilización como tejido, pues los dos tratamientos en los que se encontraron bacterias que probablemente fuesen ácido-lácticas, fueron los formados con el inóculo adquirido (1B y 1C), los mismos que presentaron peores condiciones de cara a la industria textil. No obstante, todas las bacterias encontradas habían crecido en el medio de TJA (Anexo 1), medio especializado en bacterias ácido-lácticas y levaduras. Al no conocer los microorganismos que ven favorecido su crecimiento en el medio de té, ya que no hay constancia de su utilización en estudios anteriores, también se puede suponer que no contábamos con ningún medio adecuado para el crecimiento de bacterias acéticas, que serían las bacterias con mayor relevancia en el proceso de formación del *biofilm*.

De manera general, se encontró un mayor número de unidades formadoras de colonia en los tratamientos inoculados con el SCOBY adquirido (de nuevo 1C y 1B), coincidiendo con un mayor número de cepas aisladas y de eucariotas. Quizá un mayor número de UFC y de eucariotas genere un ambiente más competitivo para las bacterias acéticas, que se encargan de producir la celulosa, de esta manera, los *biofilms* tienen peores características, como ocurrió en los tratamientos 1C y 1B. Aun así, se debe tener en cuenta que en este estudio no ha sido posible el aislamiento de ninguna bacteria acética, por lo que son necesarios más ensayos para corroborarlo.

Cabe destacar que el tratamiento 2C en el medio TJA presentó un gran número de UFC en comparación a los otros tratamientos con su mismo inóculo, pero esta anomalía podría deberse a la presencia de posibles paramecios en este mismo tratamiento, ya que los paramecios no forman parte del microbioma de la kombucha, podríamos asumir que esta kombucha podría haber presentado algún tipo de contaminación, lo que explicaría la diferencia en el número de UFC. Además, mientras que el medio de té empleado en la siembra no dio problemas a la hora del conteo de las UFC, con el medio de TJA, al contener tomate y, por lo tanto, grumos visibles, el conteo de estas UFC fue más problemático, se tuvieron que descartar varias placas por la dificultad que presentaba distinguir los grumos de tomate de las colonias crecidas. Por estas causas, es de entender que haya anomalías en los resultados y que el tratamiento 2C, en el medio de TJA, tenga un menor número de UFC del que contamos en el estudio.

Además, se debe tener en cuenta el bajo número de bacterias aisladas de las kombuchas. La diferencia entre el número de eucariotas y bacterias es muy grande, y probablemente se deba al bajo número de aislados en general, puede ser a causa de la ausencia de un medio específico para el crecimiento de las bacterias presentes en la kombucha, como por ejemplo bacterias acéticas, o una mala praxis en el laboratorio, ya que no se lograron aislar algunas de las cepas bacterianas con las que se contaba en un principio, además, hubo algunas contaminaciones en los cultivos.

Por otro lado, el tipo de inóculo también afectó al número de cepas que presentó crecimiento en CMC. Para los tratamientos con los inóculos provenientes de la kombucha de *komvida* (2), se obtuvo un mayor porcentaje de cepas con crecimiento en CMC en proporción al número de cepas que crecieron en estos tratamientos, siendo el tratamiento 2B el que mayor porcentaje de cepas con crecimiento en CMC contenía. Las cepas que crecen en medio con CMC como única fuente de carbono son capaces de degradar celulosa. Podríamos pensar que los microorganismos que degradan celulosa, que es el material que forma el *biofilm*, serían contraproductores para un mejor crecimiento del SCOBY, no obstante, fue el tratamiento 1B el que tuvo menor cantidad de cepas que degradan celulosa, además de ser el que contaba con malas características para formar *biofilm* utilizable como tejido ya que presentaba agujeros, rotura y rugosidad. Debido a estos resultados, cabría esperar que una kombucha que contenga cepas que degradan celulosa generará *biofilms* con mejores características para ser usados como tejido en la industria. Aun así, también se deben tener en cuenta las limitaciones en los resultados debido al bajo número de cepas aisladas obtenidas en el estudio.

Aunque la mayoría de las características presentan diferencias estadísticas en función del tipo de té, son los tratamientos con diferentes inóculos en los que más destacan estas diferencias. Aun así, se detectó un efecto significativo del tipo de té en algunas características como el número de agujeros que presentaron los *biofilms*, siendo el tratamiento 1B el único con agujeros, la rotura, ya que el 1C fue el tratamiento que menor resistencia presentó, o la rugosidad, con el tratamiento 1C presentando un mayor grado de rugosidad que el 1B. Estas características tienen en común que los diferentes tipos de té afectan cuando el inóculo empleado es el adquirido (1). Mientras que en los tratamientos 2B y 2C no hay casi diferencias dependiendo del tipo de té que se use, en los tratamientos 1B y 1C sí que podemos ver variación en sus características dependiendo del té. Esto puede deberse a que, en condiciones en las que el crecimiento de los *biofilms* no es tan favorable (como pasa con el inóculo adquirido), el tipo de té cobra importancia. Debido a que los *biofilms* generados con ambos té presentan condiciones desfavorables para su uso en la industria textil, ya que el té caro parece contribuir a una mayor rotura y rugosidad, pero el té económico genera agujeros, no es posible sacar en claro cuál de los dos té provocaría mejores condiciones de cara a la utilización de los *biofilms* como tejidos. Cabe la posibilidad de que con diferentes tipos de té que no hayan sido probados en este estudio se obtengan comportamientos diferentes en las características de los *biofilms*.

Aunque en este trabajo se definen algunas características de los *biofilms* como “mejores” o “peores”, de cara a su utilización como tejidos, en realidad puede que esto no sea tan tajante, la industria de la moda podría caracterizarse por su búsqueda de variedad. También es posible que en determinadas situaciones o siguiendo ciertas tendencias los agujeros impredecibles o una textura más rugosa en la fabricación del tejido supongan una ventaja. Estas características que hoy en día representan una mala calidad del tejido pueden verse modificadas según las modas varían, esto implica una gran versatilidad dependiendo de la demanda. El tipo de té, y sobre todo el tipo de inóculo que se utilice

hace que las características físicas de los *biofilms* cambien, y aunque es cierto que de cara a la industria textil se persiga un modelo lo más predecible, resistente, liso y elástico posible, es posible crear *biofilms* con otras características si eso fuese lo buscado. La creación de un catálogo que registrase las características en el tejido que producen determinados té e inóculos podría suponer un gran avance en la facilitación de la utilización de un tejido sostenible.

5. CONCLUSIÓN

En general, los *biofilms* creados a raíz de la kombucha de la marca *komvida*, disponible en la mayoría de los supermercados de España, es la que mejores características para los *biofilms* parece generar (ausencia de agujeros, mejor textura y mayor resistencia a roturas), independientemente del té que se utilice. Esto desmiente nuestras ideas iniciales, que afirmaban que el inóculo adquirido y el té más caro provocarían mejores características de cara a la utilización de los *biofilms* como tejido. No obstante, estos resultados son preferibles para su utilización en la industria, ya que unas buenas características físicas obtenidas en los *biofilms* de este estudio provienen de kombuchas inoculadas de manera accesible con un té que puede ser el más económico del mercado.

Aquellos *biofilms* creados con un inóculo adquirido a un proveedor presentaron mayor capacidad de retención de agua, lo que acaba siendo una desventaja una vez secos, ya que fueron los que presentaron características menos favorables para su utilización como tejidos (presencia de agujeros, más rugosidad y menor elasticidad). Además, un mayor número de UFC, mayor diversidad de microorganismos y menor cantidad de cepas que degraden celulosa parecen ser también características perjudiciales para la formación de un *biofilm* útil para la industria textil.

Este trabajo promueve el crecimiento económico y trabajo decente (ODS8), al intentar influir en la dinámica de la industria (ODS9) de la ropa, proponiendo nuevas ideas que, de manera económica, puedan alterar la producción textil contaminante, promoviendo a su vez un consumo responsable (ODS12). Por lo tanto, al abogar por la sostenibilidad de esta industria, el trabajo tiene relación con los objetivos de desarrollo sostenible adoptados en la agenda 2030 anteriormente citados.

6. LÍNEAS FUTURAS

Saber que es posible generar un tejido con buenas condiciones para su utilización y posible incorporación en la industria textil a raíz de una bebida económica y accesible, que no pierde calidad por utilizar un té económico como sustrato, supone un avance en el

objetivo de mejorar las condiciones de una industria tan contaminante, de manera barata y al alcance de todos. No obstante, sería necesario un mayor estudio del caso.

Una investigación más profunda, diseñando medios de cultivo adecuados para el crecimiento de todos los microorganismos presentes en la kombucha sería necesaria para completar este trabajo. Es importante conocer todos los microorganismos involucrados en la formación de los diferentes SCOBY para saber cuál es la composición microbiana que da determinada textura o forma a los *biofilms*, además de la influencia de los diferentes inóculos en la composición de microorganismos que forman los SCOBY. Una vez se sepa esto, se podrá producir un *biofilm* con un consorcio microbiano diseñado para obtener las características físicas de interés en cada caso.

El estudio de otros factores que puedan influir en las características de los *biofilms* también sería importante, así como el pH, el tiempo de fermentación o el tipo de azúcar que se emplea en el cultivo de la kombucha. También sería de interés evaluar otras características físicas que definan la calidad del *biofilm* como tejido, como la impermeabilidad, su capacidad para teñirse de otros colores, o un estudio de la reacción del cuerpo humano tras un contacto prolongado con el SCOBY.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamental II de la URJC de Móstoles, por la utilización de las instalaciones y los equipos necesarios. A Mercedes y Sara, que sin su ayuda este trabajo no habría sido posible, a Marina, por la iniciativa y la parte creativa, y especialmente a Pilar, no solo por haberme dado la oportunidad de llevar este trabajo a cabo, sino también por haber confiado y creído en mi idea.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aedo, V. R. (2011). *Determinación de parámetros de fermentación para la producción de kombucha utilizando una población mixta de microorganismos denominado fermento de té*. <http://repositorio.unamba.edu.pe/handle/UNAMBA/418>
- Alberto, F. B. D. (2023). *Elaboración de una bebida probiótica kombucha empleando dos endulzantes no calóricos a partir de scoby (colonia simbiótica de bacterias y levaduras)*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/25405>

- Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M. B., Hargafi, K., Jaouadi, B., Ayadi, F., Elfeki, A., & Ammar, E. (2012). Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-63>
- Amarasinghe, H., Weerakkody, N. S., & Waisundara, V. Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science & Nutrition*, 6(3), 659-665. <https://doi.org/10.1002/fsn3.605>
- Arencibia, D. F., Rosario, L. A., Gómez, R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. Finlay Ediciones Sitio web: <https://www.researchgate.net/publication/262724715>
- Avcioglu, N. H., Birben, M., & Bilkay, I. S. (2021). Optimization and physicochemical characterization of enhanced microbial cellulose production with a new Kombucha consortium. *Process Biochemistry*, 108, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.005>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects models using lme4. *Journal Of Statistical Software*, 67(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Castro, Y. B., & Salas, A. C. (2022). Desarrollo y diseño exploratorio de un textil biobasado en té, café y yerba mate. *Base Diseño E Innovación*, 7(7), 107-122. <https://doi.org/10.52611/bdi.num7.2022.807>
- Chávez, D. G. B., Ramos, N. L. P., Moyano, A. M. J., & Quintana, M. S. N. (2023). Análisis textil: una aproximación a las fibras naturales. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 5(6), 660-675. <https://doi.org/10.59169/pentaciencias.v5i6.884>

- Cuetara, D. G. T., & García, C. T. (2021). Consumismo de ropa y contaminación de la industria textil: una propuesta para revertirlo. *DIS*, 9, 1-24.
<https://doi.org/10.48102/dis.9.5.87>
- De la Montaña Durán-Barrantes, M. (2022, 1 septiembre). *Optimización en la formulación de Kombucha de Te Verde y Panela*. idUS - Depósito de Investigación Universidad de Sevilla. <https://hdl.handle.net/11441/142154>
- Delgado, A. R. (2015). Té de Kombucha y sus beneficios para el sistema digestivo.
<https://www.monografias.com/trabajos-pdf4/te-kombucha-y-salud/te-kombucha-y-salud.pdf>
- Esteban, C. I. (2007). El hongo Kombucha. *Bol Soc Micol Madrid*, 31, 269-72.
<https://ebuah.uah.es/xmlui/handle/10017/7991>
- Fernandes, L. N., De Lima, M., & Schmidt, V. C. R. (2024). Physical and chemical treatments in obtaining and purifying Kombucha SCOBY Cellulose. *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA*, 22(9), e6622.
<https://doi.org/10.55905/oelv22n9-066>
- Gallissà, E. C. (2017). Los retos sostenibilistas del sector textil. *Revista de Química E Industria Textil*, 220, 20-32.
<https://upcommons.upc.edu/bitstream/2117/103614/1/Los%20retos%20sostenibilistas%20del%20sector%20textil.pdf>
- Golhin, A. P., Tonello, R., Frisvad, J. R., Grammatikos, S., & Strandlie, A. (2023). Surface roughness of as-printed polymers: a comprehensive review. *The International Journal Of Advanced Manufacturing Technology*, 127(3-4), 987-1043. <https://doi.org/10.1007/s00170-023-11566-z>
- Gullo, M., La China, S., Falcone, P. M., & Giudici, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives.

Applied Microbiology And Biotechnology, 102(16), 6885-6898.

<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>

Günther W. Frank - El Diario de Kombucha- 2005- <http://www.kombu.de/spanish.htm>

Hothorn T, Bretz F, Westfall P (2008). “Simultaneous Inference in General Parametric Models.” *Biometrical Journal*, *50*(3), 346-363.

Illana, C. (2007). El hongo Kombucha. ResearchGate.

https://www.researchgate.net/publication/286452817_El_hongo_Kombucha

Javier, C. S. D. (2018). Aislamiento y caracterización de bacterias y levaduras a partir del consorcio de microorganismos denominado KOMBUCHA.

<http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/22715>

Jayabalan, R., Chen, P., Hsieh, Y., Prabhakaran, K., Pitchai, P., Marimuthu, S.,

Thangaraj, P., Swaminathan, . K., & Yun, S. E. (2011). Effect of solvent fractions of kombucha tea on viability and invasiveness of cancer cells—

Characterization of dimethyl 2-(2-hydroxy-2-methoxypropylidene) malonate and vitexin. *Indian Journal Of Biotechnology*.

<http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/10955/1/IJBT%2010%281%29%2075-82.pdf>

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 And Food Safety, 13(4), 538-550. [https://doi.org/10.1111/1541-](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073)

[4337.12073](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073)

Kramar, A., & González-Benito, F. J. (2022). Cellulose-Based Nanofibers Processing Techniques and Methods Based on Bottom-Up Approach—A Review.

Polymers, 14(2), 286. <https://doi.org/10.3390/polym14020286>

- Laavanya, D., Shirkole, S., & Balasubramanian, P. (2021). Current challenges, applications and future perspectives of SCOBY cellulose of Kombucha fermentation. *Journal Of Cleaner Production*, 295, 126454.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126454>
- Leal, J. M., Suárez, 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>
- Maciuca, O. M., Sánchez-Juanes, F., & Menéndez, E. (2022). Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en bebidas probióticas: el caso de la kombucha. *Farmajournal*, 7(2), 29-39. <https://doi.org/10.14201/fj2022722939>
- Martínez Hidalgo, P (2013). Actinobacterias endofíticas aisladas de nódulos de *Medicago sativa*: análisis de su biodiversidad y su potencial agronómico como PGPR. DIGITAL.CSIC. <http://hdl.handle.net/10261/81274>
- Mohite, B. V., & Patil, S. V. (2014). A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology And Applied Biochemistry Online/Biotechnology And Applied Biochemistry*, 61(2), 101-110.
<https://doi.org/10.1002/bab.1148>
- Njieukam, J. A., Ciccone, M., Gottardi, D., Ricci, A., Parpinello, G. P., Siroli, L., Lanciotti, R., & Patrignani, F. (2024). Microbiological, Functional, and Chemico-Physical Characterization of Artisanal Kombucha: An Interesting Reservoir of Microbial Diversity. *Foods*, 13(12), 1947.
<https://doi.org/10.3390/foods13121947>
- Podolich, O., Zaets, I., Kukharenko, O., Orlovskaya, I., Reva, O., Khirunenko, L., Sosnin, M., Haidak, A., Shpylova, S., Rabbow, E., Skoryk, M., Kremensky, M.,

- Demets, R., Kozyrovska, N., & De Vera, J. (2017). *Kombucha Multimicrobial Community under Simulated Spaceflight and Martian Conditions*. *Astrobiology*, 17(5), 459-469. <https://doi.org/10.1089/ast.2016.1480>
- Prakash, O., Nimonkar, Y., & Shouche, Y. S. (2012). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Redondi, A. E. C. (2023, 19 diciembre). *Real-Time Monitoring of SCOBY-Derived Bacterial Cellulose Production for Sustainable Material Development*. <https://hdl.handle.net/10589/215849>
- Ruiz-Toquica, J. S., Becerra-Real, L. M., & Díaz, L. M. V. (2020). Evaluación del efecto de *Bacillus firmus* C101 en el crecimiento de poslarvas de *Litopenaeus vannamei* Boone (camarón blanco) y *Brachionus plicatilis* s.s. Müller (rotífero). *Boletín De Investigaciones Marinas Y Costeras*, 49(1), 63–80. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2020.49.1.774>
- Salazar-Manzanares, M., Márquez-Reyes, J., Rodríguez-Romero, B., Méndez-Zamora, G., Luna-Maldonado, A., & Treviño-Garza, M. (2023). Aprovechamiento de suero de leche para producción de celulosa microbiana. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1), 339-348. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.46>
- Samyn, P. (2013). Wetting and hydrophobic modification of cellulose surfaces for paper applications. *Journal Of Materials Science*, 48(19), 6455-6498. <https://doi.org/10.1007/s10853-013-7519-y>

- Schrecker, S. T., & Gostomski, P. A. (2005). Determining the Water Holding Capacity of Microbial Cellulose. *Biotechnology Letters*, 27(19), 1435-1438.
<https://doi.org/10.1007/s10529-005-1465-y>
- Ul-Islam, M., Khan, T., & Park, J. K. (2012). Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 596-603. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>
- Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., & 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>
- Watanabe, K., Tabuchi, M., Morinaga, Y., & Yoshinaga, F. (1998). Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. *Cellulose*, 5(3), 187-200. <https://doi.org/10.1023/a:1009272904582>
- Zailani, N. S., & Adnan, A. (2022). SUBSTRATES AND METABOLIC PATHWAYS IN SYMBIOTIC CULTURE OF BACTERIA AND YEAST (SCOBY) FERMENTATION: a MINI REVIEW. *Jurnal Teknologi*, 84(5), 155-165.
<https://doi.org/10.11113/jurnalteknologi.v84.18534>

9. ANEXO

Tabla A1. Características observadas al microscopio y resultado de las pruebas de oxidasa y catalasa de las cepas aisladas de los *biofilms* de kombucha y el número de éstas que crecieron en el medio CMC tras una resiembra, en función de los distintos tratamientos utilizados: 1B *biofilms* inoculados con la kombucha adquirida en té barato, 1C inoculados con la kombucha adquirida en té caro, 2B inoculados

con la kombucha de komvida en té barato y 2C inoculados con *komvida* en té caro, y los dos medios de cultivo empleados: té y TJA.

Biofilm	Microscopía	Medio	Nº de cepas	Nº de cepas que crecen en CMC
1C	Células grandes, con forma redondeada, en algunas ocasiones presentan vainas o tubos germinales. Eucariotas, posiblemente levaduras.	Té	7	1
1C	Células grandes, de forma redondeada. Eucariotas, posibles levaduras.	TJA	3	2
1C	Cocos, Gram-, oxidasa y catalasa -	TJA	2	1
1C	Bacilos cortos, Gram -, oxidasa y catalasa -	TJA	1	0
1B	Células grandes, forma redondeada, en algunas ocasiones presentan vainas o tubos germinales. Eucariotas, posiblemente levaduras.	Té	8	2
1B	Células grandes, forma redondeada. Eucariotas, posibles levaduras.	TJA	1	0
1B	Cocos, Gram -, oxidasa y catalasa -	TJA	1	0
2C	Células grandes, forma redondeada, en algunas ocasiones presentan vainas o tubos germinales. Eucariotas, posiblemente levaduras.	Té	2	1
2C	Células grandes, forma redondeada. Eucariotas, posibles levaduras.	TJA	3	2
2C	Células alargadas, forma de paramecio. Posible paramecio.	Té	2	1
2B	Células grandes, forma redondeada, en algunas ocasiones presentan vainas o tubos germinales. Eucariotas, posiblemente levaduras.	Té	3	4
2B	Células grandes, forma redondeada. Eucariotas, posibles levaduras.	TJA	3	1