



universidad
de león



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA
MICROBIOTA CULTIVABLE DEL KÉFIR DE
AGUA**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE
CULTURABLE MICROBIOTA OF WATER KEFIR**

Eva Rodríguez Mendoza

Tutor: Francisco Javier Casqueiro Blanco

Cotutor: Yaiza Carnicero Mayo

GRADO EN BIOLOGÍA

Julio, 2023

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cultivo iniciador: Los gránulos del kéfir de agua	2
1.2. Origen e historia del kéfir de agua.....	2
1.3. Elaboración tradicional y producción industrial del kéfir de agua	3
1.4. Microbiota del kéfir de agua.....	4
1.5. Relaciones y dinámica de fermentación	5
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1. Elaboración de kéfir de agua	6
3.2. Aislamiento y cultivo de los microorganismos	6
3.3. Cuantificación de la microbiota cultivable del kéfir.....	7
3.4. Obtención de cultivos puros	7
3.5. Identificación de microorganismos.....	7
3.5.1. Identificación molecular mediante MALDI-TOF MS	8
3.5.2. Identificación molecular por secuenciación del ADNr	8
3.6. Construcción de árboles filogenéticos.	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1. Las bacterias del ácido acético son los microorganismos predominantes en el kéfir de agua.....	10
4.2. La microbiota cultivable de cada kéfir presenta una composición única y diferente ...	12
4.3. Los árboles filogenéticos muestran que las especies microbianas se identificaron correctamente.....	16
4.4. Identificación por MALDI TOF MS vs secuenciación de ADNr	21
5. CONCLUSIONES	22
6. REFERENCIAS	24
7. ANEXOS	26

RESUMEN

El kéfir de agua es una bebida fermentada con propiedades probióticas, obtenida al inocular gránulos de kéfir en una solución de agua, sacarosa y frutas. Las especies de microorganismos presentes en los gránulos: bacterias del ácido láctico, bacterias del ácido acético y levaduras, varían en función del origen de dichos gránulos y/o de las condiciones de fermentación. Esto resulta en kéfirs con diferentes características dependiendo de su elaboración. El objetivo de este trabajo es estudiar la microbiota cultivable del kéfir de agua elaborado con gránulos de diferente procedencia. Con este propósito, se preparó kéfir con gránulos obtenidos de tres orígenes diferentes. Se aisló la microbiota cultivable y se identificó mediante técnicas moleculares. Los resultados mostraron una mayor presencia de bacterias que de levaduras. Dentro de las bacterias la microbiota del kéfir la dominaron las bacterias del ácido acético. Además, se aislaron microorganismos típicos del kéfir como: bacterias del ácido láctico del género *Liquorilactobacillus*; bacterias del ácido acético del género *Acetobacter* y levaduras del género *Saccharomyces*, comunes a los tres tipos de kéfir de agua estudiados. Se aislaron también microorganismos únicos de cada kéfir, confirmando que la microbiota del kéfir de agua varía en función del origen de los gránulos. Por último el uso de la secuenciación del ADNr para la identificación de microorganismos y establecimiento de relaciones filogenéticas resultó más eficaz y preciso en comparación con la técnica MALDI-TOF MS.

Palabras clave: Bacterias del ácido acético, bacterias del ácido láctico, kéfir de agua, levaduras, microbiota.

ABSTRACT

Water kefir is a fermented beverage known for its probiotic traits. It is produced by fermenting kefir grains in a solution of water, sucrose, and various fruits. The microorganisms present in the grains, including lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast, vary depending on the origin of the grains and fermentation conditions. This leads to different characteristics in the resulting kefir depending on how it is prepared. The objective of this study was to investigate the cultivable microbiota of water kefir made with grains from different sources. For this purpose, kefir was prepared using grains obtained from three different origins. The cultivable microbiota was isolated and identified using molecular techniques. The results showed a higher presence of bacteria than yeast. Within the bacteria, the microbiota of kefir was dominated by acetic acid bacteria. Additionally, typical microorganisms found in kefir, such as lactic acid bacteria from the *Liquorilactobacillus* genus, acetic acid bacteria from the *Acetobacter* genus, and yeasts from the *Saccharomyces* genus, were isolated and found to be common among the three types of water kefir studied. Furthermore, each kefir sample contained unique microorganisms, confirming that the microbiota of water kefir varies depending on the origin of the grains. Finally, the use of rDNA sequencing for the identification of microorganisms and establishment of phylogenetic relationships proved to be more effective and accurate compared to the MALDI-TOF MS technique

Keywords: Acetic acid bacteria (AAB), kefir grains, microbiota, lactic acid bacteria (LAB), water kefir, yeast

ABREVIATURAS

- **ADNr.** Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
- **ARNr.** Ácido Ribonucleico ribosomal
- **BAA.** Bacterias del Ácido Acético
- **BAL.** Bacterias del Ácido Láctico
- **MALDI-TOF MS:** *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-Of-Flight Mass Spectrometry*
- **NCBI.** *National Center for Biotechnology Information*
- **UFC.** Unidades Formadoras de Colonias.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día el papel de la microbiota intestinal en nuestra salud, y la relación que tiene con el sistema inmune ha cobrado gran importancia, sobre todo después de la COVID-19 (Azizi *et al.*, 2021). Esto ha llevado a la búsqueda de alimentos que contengan microorganismos probióticos, es decir, microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso en nuestra salud. Así, bebidas como el kéfir de agua o el kéfir de leche han ganado popularidad (Prado *et al.*, 2015; Rezac *et al.*, 2018; Pendón *et al.*, 2022).

Estas bebidas se caracterizan por pasar por un proceso de fermentación para la obtención del producto final. La fermentación consiste en la transformación química del alimento o bebida original por la acción enzimática procedente de diferentes microorganismos (Dimidi *et al.*, 2019). La fermentación aporta sabor y reduce el riesgo de contaminación por microorganismos patógenos, es por ello que se utiliza desde hace miles de años para la preparación y conservación de alimentos (Rezac *et al.*, 2018).

Existen básicamente dos métodos para la preparación de alimentos fermentados: el primero, es el proceso natural en el que los propios alimentos actúan como iniciadores de dicha fermentación. Esto ocurre por ejemplo, en la elaboración del chucrut (repollo fermentado). El segundo método implica añadir cultivos iniciadores, como es el caso del kéfir, donde dichos cultivos se denominan gránulos o nódulos de kéfir (De la Mano *et al.*, 2019; Dimidi *et al.*, 2019).

Existen dos tipos diferentes de kéfir: el kéfir de agua y el kéfir de leche. Las diferencias principales entre ambos son la composición de los gránulos, el líquido donde se fermentan, agua o leche, y por supuesto el producto final (Guzel-Seydim *et al.*, 2021). El kéfir de agua es una bebida refrescante con aroma afrutado, con un sabor ácido o dulce, y con un ligero contenido alcohólico. Se elabora mediante la inoculación de gránulos de kéfir de agua en una solución de agua, frutas y azúcares, donde los microorganismos presentes en dichos gránulos fermentan los azúcares (Waldher *et al.*, 2010; Laureys y De Vuyst, 2014; Azizi *et al.*, 2021). El kéfir de agua puede ser consumido por personas veganas y/o con intolerancia a la lactosa (Pendón *et al.*, 2022). Está descrito que el kéfir de agua tiene efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos, (Moreira *et al.*, 2008; Azizi *et al.*, 2021).

1.1.Cultivo iniciador: Los gránulos del kéfir de agua

Los gránulos de kéfir de agua, que constituyen el cultivo iniciador, presentan una apariencia translúcida gelatinosa, con un color que varía entre blanco y amarillo (Rezac *et al.*, 2018; Cufaoglu y Erdinc, 2023). El tamaño de los gránulos oscila entre 1-10 mm de diámetro, tienen forma de coliflor, y están compuestos por una matriz polisacáridica, formada principalmente por dextrano, que alberga la comunidad microbiana (Waldher *et al.*, 2010; Cufaoglu y Erdinc, 2023). La composición de la comunidad microbiana presente en los gránulos depende principalmente del tipo de azúcar y/o de las frutas utilizadas, así como de las condiciones de fermentación y de la procedencia de los gránulos (Hsieh *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2021; Cufaoglu y Erdinc, 2023; Zannini *et al.*, 2023). Los microorganismos que constituyen estos gránulos se dividen en tres grupos principales: bacterias del ácido láctico (BAL), bacterias del ácido acético (BAA) y levaduras (Gulitz *et al.*, 2011; Laureys y De Vuyst, 2014; Lynch *et al.*, 2021; Cufaoglu y Erdinc, 2023). En los gránulos, las BAL se encuentran aproximadamente a una concentración de 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de nódulo, las BAA entre 10^6 - 10^8 UFC/g y las levaduras entre 10^6 - 10^7 UFC/g (Gulitz *et al.*, 2011).

1.2. Origen e historia del kéfir de agua

Los gránulos de kéfir de agua, también conocidos como gránulos de kéfir azucarado o “*sugary kefir*”, tienen un origen incierto y han sido denominados con diferentes nombres a lo largo de la historia. Algunos de estos nombres incluyen “*Tibicos*”, “*Tibi*”, “*Ginger beer plants*” (plantas de cerveza de jengibre) y “*Japanese Beer Seeds*” (semillas de cerveza japonesa), debido a las diferentes hipótesis sobre su origen (Pendón *et al.*, 2022). Una de las hipótesis sugiere que los gránulos fueron introducidos en Europa por soldados británicos que regresaron de la Guerra de Crimea en 1855, y los llamaron *Ginger beer plants* (plantas de cerveza de jengibre). Por otro lado, una segunda hipótesis propone que estos gránulos, conocidos como “*Tibis*”, se formaron de manera espontánea a partir de las hojas del cactus mexicano *Opuntia*, donde los microorganismos se alimentaban de las excreciones azucaradas de la planta. A pesar de la incertidumbre sobre su origen, los gránulos han sido transmitidos de generación en generación para la elaboración casera de esta bebida fermentada en todo el mundo (Waldher *et al.*, 2010; Fiorda *et al.*, 2017; Pendón *et al.*, 2022; Cufaoglu y Erdinc, 2023).

1.3. Elaboración tradicional y producción industrial del kéfir de agua

La preparación tradicional del kéfir de agua implica la inoculación de los nódulos de kéfir en una solución de agua, azúcar y frutas (**Figura 1**). El azúcar, generalmente sacarosa, se añade en una concentración entre el 6% y el 30% (p/v), mientras que los gránulos de kéfir se agregan en una concentración del 6% al 20% (p/v) (Pendón *et al.*, 2022). Las frutas, tanto frescas como secas, se añaden en cantidades variables. La adición de frutas secas es esencial, ya que aportan aminoácidos, vitaminas y minerales necesarios para el crecimiento de los microorganismos del kéfir. Las frutas secas más comunes utilizadas son las pasas o los higos. Así mismo, se añaden frutas frescas para brindar sabor, siendo los cítricos como el limón, una elección común, aunque esto varía según las preferencias personales (Azizi *et al.*, 2021; Pendón *et al.*, 2022; Cufaoglu y Erdinc, 2023). Una vez que se ha preparado esta mezcla, se deja fermentar en un recipiente cerrado, como un tarro o una botella, durante un tiempo que oscila entre las 24 y las 72 horas, preferentemente en un lugar oscuro, sin agitar, y a una temperatura de entre 20°C y 37°C (Lynch *et al.*, 2021; Azizi *et al.*, 2021; Pendón *et al.*, 2022; Cufaoglu y Erdinc, 2023). Al finalizar la incubación, los gránulos se retiran de la solución mediante un colador de tela, se lavan y se almacenan a una temperatura de 4°C para su uso en futuras fermentaciones (Cufaoglu y Erdinc, 2023).

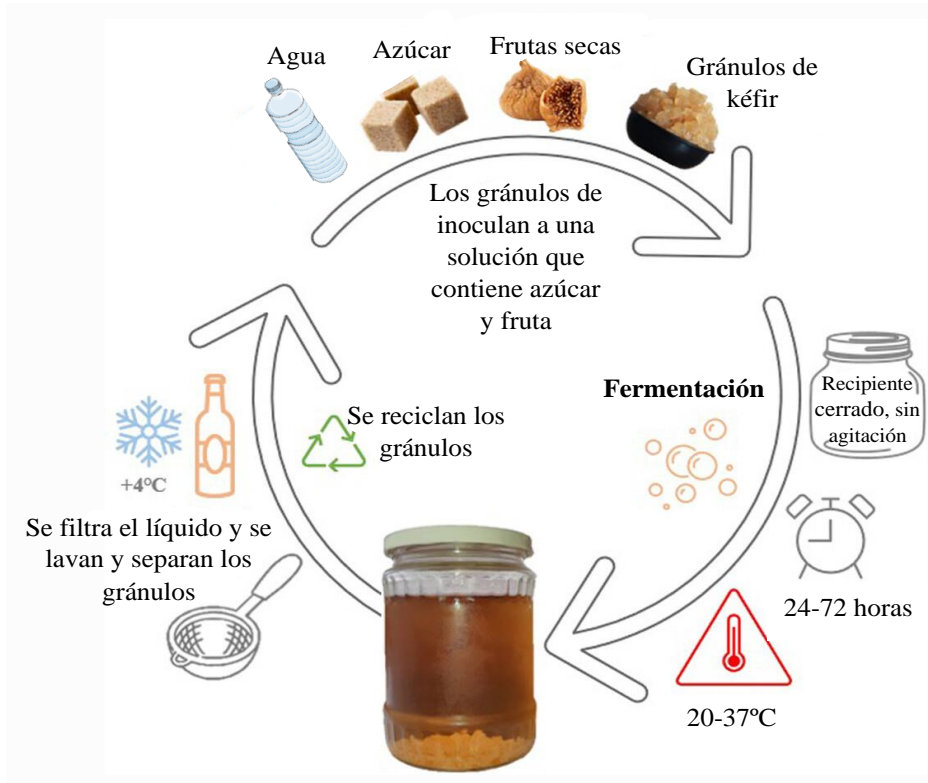


Figura 1. Esquema que representa la producción tradicional del kéfir de agua. Modificado de Cufaoglu y Erdinc, 2023.

Respecto a la producción industrial, algunas empresas producen kéfir de agua a nivel local y lo comercializan como suplemento para la salud tanto para humanos como para animales. Sin embargo, la producción industrial de kéfir de agua no es muy relevante debido a su bajo rendimiento. Además, las fermentaciones son inestables, lo que resulta en kéfir de agua de calidad variable. Por tanto, en caso del kéfir de agua sigue predominando la producción casera (Laureys *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021).

1.4. Microbiota del kéfir de agua.

Los nódulos del kéfir conforman un sistema microbiológico complejo en el que se establecen relaciones simbióticas entre diversas especies de bacterias y levaduras (Cufaoglu y Erdinc, 2023). La microbiota del kéfir está compuesta por tres grupos principales: BAL, BAA y levaduras. Las bacterias (BAL y BAA) suelen presentarse en una concentración de 10^7 UFC/mL en el líquido del kéfir. Por otro lado, las levaduras se encuentran en una concentración menor, alrededor de 10^5 UFC/mL (Patel *et al.*, 2022).

Las BAL son los principales representantes bacterianos en el kéfir, especialmente los lactobacilos que incluyen a todos los miembros del género *Lactobacillus* recientemente reclasificados (Zheng *et al.*, 2020). Las principales especies de BAL descritas en el kéfir de agua son: *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Liquorilactobacillus nagelii* y *Liquorilactobacillus ghanensis*. Siguiendo con la comunidad bacteriana, en menor concentración se encuentran las BAA, cuya presencia depende de la concentración de oxígeno, ya que son bacterias aerobias estrictas. Se ha descrito principalmente la presencia de *Acetobacter* con especies como *A. persici* o *A. indonesiensis* y, en menor medida, del género *Gluconobacter* (Laureys y De Vuyst, 2014; Lynch *et al.*, 2021; Cufaoglu y Erdinc, 2023). Además de estos dos grupos bacterianos, también se ha encontrado *Zymomonas mobilis* y, aunque es poco común, se ha descrito ya como un miembro más de la microbiota del kéfir de agua (Marsh *et al.*, 2013).

En el kéfir de agua la diversidad y la concentración de levaduras tiende a ser menor en comparación con las bacterias. Se pueden encontrar levaduras del género *Saccharomyces*, donde destaca especialmente la especie *S. cerevisiae*; pero también se encuentran levaduras de géneros como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* o *Debaryomyces* (Marsh *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2021). Es importante destacar que la proporción y diversidad de microorganismos del kéfir de agua son únicas y dependen de varios factores, como el origen de los nódulos, los

tiempos de fermentación, la temperatura y de las frutas y/o azúcar utilizado (Hsieh *et al.*, 2012; Lynch *et al.*, 2021; Cufaoglu y Erdicn, 2023, Zannini *et al.*, 2023).

1.5.Relaciones y dinámica de fermentación

El kéfir de agua al comienzo de la fermentación es un entorno desafiante para los microorganismos, ya que tiene niveles altos de carbono (sacarosa) pero los niveles de nitrógeno disponible son bajos. El nitrógeno es esencial para el crecimiento de los microorganismos y se encuentra inmovilizado en las frutas. Es necesario que las levaduras secreten al medio aminoácidos y péptidos, que extraen de las frutas, para que estén disponibles para las bacterias (Stadie *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2021). Además, las levaduras hidrolizan la sacarosa produciendo glucosa y fructosa. Estos azúcares son utilizados para realizar la fermentación alcohólica dando lugar a etanol y dióxido de carbono, lo que contribuye a ese toque gaseoso característico del kéfir (Lynch *et al.*, 2021). La hidrólisis de la sacarosa, hace que la fructosa y la glucosa estén disponibles para las bacterias. Las BAL también son capaces de hidrolizar la sacarosa dando lugar a glucosa y fructosa, que vía fermentación láctica genera ácido láctico, lo que reduce el pH de la bebida y ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados (Lynch *et al.*, 2021). Además la sacarosa es el sustrato principal para la síntesis del dextrano un exopolisacárido producido por las BAL, y el componente principal de la matriz de los nódulos (Waldher *et al.*, 2010; Lynch *et al.*, 2021). Durante la fermentación hay BAL que pasan a la solución donde crecen y fermentan azúcares y otras que se quedan unidas a los nódulos donde se encargan de sintetizar la matriz que los conforma (Pendón *et al.*, 2022). Por último, las BAA contribuyen a mantener el pH bajo metabolizando etanol y en menor medida glucosa, produciendo ácido acético y ácido glucónico respectivamente (Martínez-Torres *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021).

2. OBJETIVOS

El estudio de la microbiota que se encuentra en el kéfir de agua generan un gran interés debido a la presencia de microorganismos con propiedades probióticas. Tanto los microorganismos como las propiedades químicas de esta bebida fermentada pueden variar en función de múltiples factores como el origen de los gránulos, el método de elaboración, las frutas empleadas y las condiciones de fermentación. El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio de la microbiota cultivable en kéfir de agua obtenido de gránulos

de kefir de tres orígenes diferentes. Con esta premisa se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Cuantificar la carga microbiana del kéfir elaborado con gránulos de tres orígenes diferentes.
2. Aislar e identificar la microbiota cultivable del kéfir elaborado con gránulos de tres orígenes diferentes

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de kéfir de agua

Los gránulos de kéfir empleados en este estudio proceden de tres orígenes diferentes. Los gránulos del kéfir 1 se obtuvieron de una persona que produce kéfir de agua de forma tradicional de manera regular. Los gránulos del kéfir 2 se compraron en Natural Probio (<https://natural-probio.com/>). Por último, los gránulos del kéfir 3 fueron proporcionados por el Dr. Francisco Javier Casqueiro Blanco, profesor titular del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León (España).

Para la elaboración del kéfir de agua se siguió el método tradicional, como sigue. Para iniciar la fermentación, en un recipiente de cristal esterilizado se añadieron 200 mL de agua mineral natural (Foncetecelta), 12 g de azúcar de caña (Acor), 22 g de uvas pasas (Hacendado), 1/8 de un limón y 3 g de jengibre. Se mezcló todo y se inocularon 15 g de gránulos de kéfir de agua. La mezcla se dejó fermentar durante 24 horas a 25 °C sin agitación. Se midió el pH a tiempo 0 y a las 24 horas de fermentación con un pH-metro digital modelo GLP 21 (Crison). Finalizada la incubación, los gránulos se separaron del kéfir, se lavaron con agua y se conservaron en agua con sacarosa a 4° C (Cufaoglu y Erdinc, 2023).

3.2. Aislamiento y cultivo de los microorganismos

Para cada uno de los kéfires, se tomaron muestras de 100 µL de cada kéfir después de 24 horas de fermentación. A partir de estas muestras, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en solución salina estéril (0,9% NaCl, pH 7-8) por duplicado hasta alcanzar la dilución 10⁻⁵. A continuación, se sembraron 100 µL de cada dilución en 2 placas de tres medios de cultivo diferentes: (MRS, GYC e YGC). El objetivo de este proceso fue determinar las UFC/mL y aislar la mayor diversidad posible de la microbiota presente en cada muestra. Se utilizaron tres medios de cultivo, cuya composición se muestra en el *Anexo 1*, que fueron:

- Medio MRS (VWR Chemicals): usado para el aislamiento y recuento de BAL, sobre todo *Lactobacilli*. Se suplementó con maltosa al 1% (p/v) y con fructosa al 0,5% (p/v) con el fin de incrementar el crecimiento microbiano (De Man *et al.*, 1960).
- Medio GYC: es un medio de cultivo diferencial que permite el aislamiento e identificación de BAA (Mayeux *et al.*, 1962).
- Medio Yeast extract-Glucose-Chloramphenicol (YGC): para el crecimiento de levaduras y mohos (Wickerham, 1951).

A los medios empleados para el aislamiento de bacterias (MRS y GYC) se les añadió pimaricina a concentración final de 50 mg/L con el fin de inhibir el crecimiento de levaduras.

Una vez que se sembraron, las placas se incubaron a 30 °C. Las placas del medio MRS se incubaron durante 5 días en condiciones de anaerobiosis con el sistema AnaeronGen™ 2.5L (Thermo Scientific), mientras que las placas de los medios YGC y GYC se incubaron durante 3-5 días en condiciones de aerobiosis.

3.3. Cuantificación de la microbiota cultivable del kéfir

Con el fin de conocer la carga microbiana en cada kéfir se cuantificó la microbiota cultivable en cada medio de cultivo. Las BAL en el medio MRS, las BAA en el medio GYC y las levaduras en el medio YGC. Se seleccionaron dos placas por cada tipo de medio y kéfir. Se contaron las colonias de placas que contenían entre 30 y 300 colonias, y ese número se dividió entre el factor de dilución y el volumen sembrado. De esta forma se obtuvieron las UFC/mL de/en cada medio y cada tipo de kéfir.

3.4. Obtención de cultivos puros

Para la obtención de cultivos puros de las bacterias y de las levaduras se seleccionó una colonia de cada una de las diferentes morfologías presenten en las placas de los medios MRS, GYC e YGC. Con cada colonia seleccionada se realizaron, de forma consecutiva, tres siembras por agotamiento en estría. En el último pase se sembraron dos placas para cada tipo de colonia. La primera se empleó para identificar el microorganismo y la segunda se empleó para recoger las colonias en glicerol 40%, y conservarlas a largo plazo a – 80 °C.

3.5. Identificación de microorganismos

La identificación de los microorganismos se llevó a cabo con dos técnicas: (I) *Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), y

(II) secuenciación de Ácido desoxirribonucleico ribosomal (ADNr) por el método de Sanger para los microorganismos que no se lograron identificar con MALDI-TOF MS.

3.5.1. Identificación molecular mediante MALDI-TOF MS

La identificación molecular de las levaduras y bacterias con esta técnica fue llevada a cabo por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. De forma resumida, se utiliza un espectrómetro de masas que genera un espectro único y característico que representa una huella genética molecular específica de cada especie. Esto permite identificar microorganismos desconocidos comparando los espectros generados con bibliotecas de patrones de referencia. Como resultado de la comparación de los patrones moleculares se obtiene una puntuación basada en la similitud entre el patrón de la muestra problema y los patrones de las muestras de la biblioteca. Esta puntuación varía de 3 a 0. Una puntuación de 3 indica una identificación altamente fiable, mientras que una puntuación de 0 indica que no es posible la identificación (Ashfaq *et al.*, 2022).

En este estudio, se seleccionaron las muestras que obtuvieron una puntuación superior a 1,80, lo cual indica una confianza moderadamente alta en la identificación de los microorganismos.

3.5.2. Identificación molecular por secuenciación del ADNr

Las bacterias y las levaduras que no se pudieron identificar por el método MALDI-TOF MS, se identificaron mediante la secuenciación del ADNr, que fue llevado a cabo por el Área de Análisis de Ácidos Nucleicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. El procedimiento seguido para las bacterias fue amplificar y secuenciar un fragmento de 1100 pares de bases que codificaba para la subunidad 16S del Ácido Ribonucleico ribosomal (ARNr). El amplicón purificado, se secuenció por el método de Sanger. De manera análoga se siguió el mismo procedimiento para levaduras, pero en este caso se utilizó la región D1-D2 del gen codificante para el ARNr 28S. Para la identificación se emplearon dos tipos de secuencias: las obtenidas en el presente estudio y aquellas secuencias depositadas en la base de datos GenBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) con las que presentaron una mayor similitud. Esto se realizó mediante el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI, que permite encontrar secuencias que presentan una mayor similitud con la secuencia problema.

3.6. Construcción de árboles filogenéticos.

Una vez que se realizó la identificación de los microorganismos, se elaboraron árboles filogenéticos para comprobar si la asignación de especies fue correcta. Se elaboraron cuatro árboles en total: dos para las bacterias y las levaduras identificadas con la técnica MALDI-TOF MS, y otros dos para las bacterias y las levaduras identificadas por secuenciación de un fragmento del ADNr.

Para los microorganismos identificados con la técnica MALDI-TOF MS, se empleó el *software MALDI Biotyper Compass* que permite crear dendrogramas. Los dendrogramas son representaciones en forma de árbol de la similitud entre taxones basándose en la similitud de sus espectros.

Para los microorganismos identificados por secuenciación de ADNr, se llevó a cabo la construcción de árboles filogenéticos con el *software* MEGA7. Se utilizaron las secuencias obtenidas en este trabajo, así como aquellas secuencias de la base de datos GenBank del NCBI con las que presentaron una mayor similitud. Se empleó la herramienta BLAST del NCBI, que proporciona secuencias similares a la secuencia problema.

Una vez que se obtuvieron todas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple, para ello, se utilizó la herramienta MAFFT. A continuación, con el programa MEGA7 se procedió a seleccionar el mejor modelo para la estimación de la distancia entre para las secuencias. En este caso, tanto para el árbol filogenético construido a partir del ADNr 16S de bacterias como para el árbol filogenético construido a partir del ADNr 28S de levaduras, se determinó que el modelo más adecuado era el de Kimura+G. Este modelo considera diferentes probabilidades para las transiciones y transversiones (Kimura, 1980). La G hace referencia a la distribución discreta de Gamma. Esta distribución discreta utiliza 5 categorías de tasas para modelar la desigualdad de las tasas evolutivas entre los sitios de las secuencias (Kumar *et al.*, 2016).

Con ello, se construyeron los árboles utilizando el método de *Maximun Likelihood* o máxima verosimilitud, que a partir de un árbol inicial, prueba diferentes topologías con el fin de encontrar la que tenga mayor probabilidad de explicar los datos (Kumar *et al.*, 2016). Además, se realizaron 1000 réplicas *Bootstrap* para cada árbol, para comprobar la confianza de las ramas y de la topología (Felsenstein, 1985).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Las bacterias del ácido acético son los microorganismos predominantes en el kéfir de agua

Los diferentes tipos de microorganismos que constituyen la comunidad del kéfir no se encuentran en la misma concentración. Las poblaciones de bacterias tienden a predominar sobre las levaduras (Patel *et al.*, 2022). Además, dentro de la comunidad de bacterias, las BAL suelen encontrarse en una proporción mayor que las BAA (Gulitz *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022). Aun así, el crecimiento de los microorganismos puede verse influenciado por diversos factores, como las condiciones de fermentación, las frutas utilizadas o el origen de los gránulos (Lynch *et al.*, 2021; Cufaoglu y Erdicn, 2023; Zannini *et al.*, 2023).

En este trabajo se cuantificaron las poblaciones microbianas en el kéfir elaborado con gránulos de 3 orígenes diferentes tras 24 horas de fermentación a 25°C. Para ello, se cogieron muestras del kéfir y se cultivaron en tres medios diferentes: en el medio de cultivo MRS para cuantificar BAL, en el medio de cultivo GYC para cuantificar BAA y en el medio de cultivo YGC para cuantificar levaduras. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**. Es importante señalar que en el medio MRS del kéfir 2 aunque hay crecimiento microbiano, a la hora de la identificación no se encontraron solo BAL, como se expone en el apartado 4.2. de **Resultados y Discusión**. Por tanto, a la hora de discutir los resultados de las UFC/mL de las BAL, solo se tendrá en cuenta las de los kéfires 1 y 3.

Tabla 1. Se muestra para cada kéfir preparado (K1: kéfir 1; K2: kéfir 2; K3: kéfir 3) y para cada medio utilizado (MRS, GYC e YGC), la concentración de microorganismos (UFC/mL) tras 24 horas de fermentación a 25°C). En la última fila se muestra la carga microbiológica total de cada kéfir.

	UFC/mL		
	K1	K2	K3
Medio MRS	8,45 x 10 ⁵	3,28x10 ⁵	3,23 x10 ⁶
Medio GYC	1,62 x 10 ⁷	2,46x10 ⁷	6,55 x10 ⁷
Medio YGC	7,9 x 10 ⁴	7,35x10 ⁶	1,36 x10 ⁵
Total de UFC/mL de kéfir	1,71 x 10 ⁷	3,22 x10 ⁷	6,89 x10 ⁷

Como se muestra en la **Tabla 1**, las concentraciones de bacterias, correspondientes con los medios MRS y GYC fueron del orden del 10⁷ UFC/mL, mientras que las de las levaduras correspondientes con el medio YGC, fueron de 10⁴-10⁶ UFC/mL. Es decir, la concentración

de bacterias fue más alta en los tres kéfires analizados en comparación con la concentración de levaduras. Estos resultados concuerdan con los datos mostrados por Patel *et al.* (2022) en el kéfir de agua tras 24 horas de fermentación. En su investigación, se observó que las bacterias presentaban una concentración total de 10^7 UFC/mL, al igual que en este estudio, mientras que las levaduras estaban a una concentración de 10^5 UFC/mL, una concentración similar a la de este estudio.

Respecto a las concentración total, en los tres kéfires analizados en este TFG la carga microbiana total es de 10^7 UFC/mL. En los tres kéfires las BAA fueron los microorganismos que presentaron una concentración mayor. Además, el kéfir 3 fue el que mostró mayor concentración de BAL y levaduras. En el kéfir 2 las levaduras se encontraron en una concentración mayor a las bacterias que crecieron en el medio MRS.

En cuanto a la comunidad bacteriana, ha sido ampliamente descrito que las BAL se encuentran en una concentración mayor que las BAA tanto en los nódulos como en la bebida (Gulitz *et al.*, 2011; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022). Sin embargo, los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado indican lo contrario. La concentración de BAA fue entre 10 y 100 veces mayor que la concentración de las BAL. Esto se puede deber a que en los tres casos las frutas añadidas pudieran haber favorecido más el crecimiento de las BAA, o que en los tres casos, los gránulos contuvieran una mayor concentración de BAA, aunque esto último es poco probable (Zannini *et al.*, 2023). Otra posible explicación para el sobrecrecimiento de las BAA en comparación con las BAL es la presencia de más oxígeno durante la fermentación del kéfir. Esto habría favorecido el crecimiento a las BAA, que son bacterias aerobias estrictas, y disminuido el de las BAL, que son bacterias aerotolerantes, pero para su crecimiento no necesitan oxígeno ya que realizan la fermentación láctica (Lynch *et al.*, 2021). En el proceso habitual para obtener kéfir de agua, las BAA deben sobrevivir con niveles bajos de oxígeno durante toda la fermentación, pero cuando este deja de ser limitante, se puede producir un sobrecrecimiento, haciendo que produzcan ácido acético y que el pH del kéfir disminuya notablemente (Laureys *et al.*, 2018). Esto concuerda con lo sucedido en este estudio. En los tres kéfires estudiados, el pH final del kéfir se encontraba por debajo de 3,8 (*Anexo 2*), mientras que el pH habitual del kéfir de agua está alrededor de 4,5 (Laureys *et al.*, 2018; Lynch *et al.*, 2021). Esto sugiere que durante la fermentación hubo suficiente oxígeno para un crecimiento óptimo de BAA, que sintetizaron grandes cantidades de ácido acético, lo que llevo a una caída del pH de la bebida. La mayor presencia de oxígeno se puede explicar

por el uso de un recipiente ancho durante la fermentación que permitió mayor contacto del líquido con el aire.

4.2. La microbiota cultivable de cada kéfir presenta una composición única y diferente

El kéfir de agua es una bebida que alberga una comunidad microbiana de gran complejidad. Se han descrito muchas especies que forman parte de esta comunidad, que pertenecen sobre todo a tres grandes grupos: BAL, BAA y levaduras; aunque también se han descrito otras especies como *Zymomonas mobilis* (Marsh *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2022.). Dentro de estos tres grandes grupos la diversidad es amplia, y la microbiota de cada kéfir es diferente y única, ya que depende de factores como la procedencia de los gránulos o las condiciones de fermentación en otros (Lynch *et al.*, 2021; Cufaoglu y Erdicn, 2023; Zannini *et al.*, 2023).

Con el objetivo de caracterizar la microbiota de cada uno de los tres kéfires elaborados, se tomaron muestras que se cultivaron en tres medios de cultivo MRS, GYC e YCG. Se observó la diversidad en la morfología de las colonias que crecían y, atendiendo al tamaño, forma, margen, color, textura y elevación de las colonias, se seleccionó una colonia de cada morfología. En el **Anexo 3** se detallan las características morfológicas de cada colonia escogida. A cada colonia se le asignó un código en función del medio en el que se aisló (M-MRS, G-GYC e Y-YGC) y del kéfir (K1, para kéfir 1, K2, para kéfir 2 y K3 para kéfir 3).

Se emplearon dos técnicas para la identificación de los microorganismos: la técnica MALDI-TOF MS con la que identificaron 10 bacterias y 5 levaduras; y la secuenciación de ADNr 16S para bacterias y ADNr 28S para levaduras con la que se identificaron 15 bacterias y 7 levaduras. En la **Tabla 2** se detalla la técnica con la que fue identificado cada microorganismo. En total se identificaron los microorganismos de 38 colonias: 12 BAL aisladas en el medio MRS, 12 BAA aisladas en el medio GYC, 1 cepa de *Zymomonas mobilis* aislada en el medio MRS y 13 levaduras aisladas en el medio YGC (**Tabla 2**).

Tabla 2. Identificación de especies de bacterias y levaduras aisladas de kéfires fermentados con gránulos de origen diferente. En la tabla se muestra las especies aisladas, junto a su código y agrupadas en función del medio de cultivo (MRS, GYC e YGC) y del kéfir (K1: kéfir 1; K2: kéfir 2; K3: kéfir 3) . En letra azul se muestran las especies identificadas mediante MALDI TOF MS y en letra negra se muestran las identificadas mediante secuenciación.

K1		K2		K3	
Medio MRS (bacterias)					
Código	Especie	Código	Especie	Código	Especie
MK11	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	MK21	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	MK31	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>
MK12	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	MK22	<i>Lactacaseibacillus paracasei</i>	MK32	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>
MK13	<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i>	MK23	<i>Lactacaseibacillus paracasei</i>	MK33	<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i>
MK14	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	MK24	<i>Zymomonas mobilis</i>	MK34	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>
		MK25	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>		
Medio GYC (bacterias)					
GK11	<i>Acetobacter persici</i>	GK21	<i>Acetobacter persici</i>	GK31	<i>Acetobacter persici</i>
GK12	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	GK22	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	GK32	<i>Gluconobacter cerinus</i>
GK13	<i>Acetobacter persici</i>	GK23	<i>Acetobacter persici</i>	GK33	<i>Acetobacter okinawensis</i>
		GK24	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	GK34	<i>Acetobacter okinawensis</i>
				GK35	<i>Acetobacter persici</i>
Medio YGC (levaduras)					
YK11	<i>Pichia fermentans</i>	YK21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YK31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
YK12	<i>Candida guilliermondii</i>	YK22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YK32	<i>Candida guilliermondii</i>
YK13	<i>Saccharomyces uvarum</i>	YK23	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	YK33	<i>Candida valida</i>
YK14	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	YK24	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	YK34	<i>Pichia membranifaciens</i>
				YK35	<i>Debaryomyces hansenii</i>

Como se muestra en la **Tabla 2**, se identificó la población de bacterias y levaduras cultivables presentes en el kéfir elaborado con gránulos de orígenes diferentes.

En cuanto a la población bacteriana (**Tabla 2**), se identificaron bacterias de dos filos: el filo Bacillota representado por la familia Lactobacillaceae donde se encuentran las BAL; y el filo Pseudomonadota con la familia Acetobacteraceae, donde se encuadran las BAA, y la familia Zymomonadaceae (Schoch *et al.*, 2020).

Ya dentro de la familia Lactobacillaceae, se identificaron bacterias de dos géneros: *Lacticaseibacillus* y *Liquorilactobacillus*. Para el género *Lacticaseibacillus*, se identificó la especie *L. paracasei* en el kéfir 2; y para el género *Liquorilactobacillus*, se identificaron las especies, *L. ghanensis* en los kéfires 1 y 3, y *L. nagelii* en los tres kéfires, siendo esta la especie más frecuente. Estas bacterias encontradas corresponden con BAL que se aíslan de manera común en el kéfir (Gulitz *et al.*, 2011; Laureys y De Vuyst, 2017; Laureys *et al.*, 2019; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022). Hay otras BAL como *Leuconostoc* o *Bifidobacterium*, que también son frecuentes en el kéfir, pero en este estudio no fueron identificadas (Magalhaes *et al.*, 2010; Laureys *et al.*, 2019; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022). Esto se puede deber a no haber usado medios adecuados para el crecimiento de las mismas, como el medio M17 para *Leuconostoc* o el medio RB para *Bifidobacterium*.

Respecto a la familia Acetobacteraceae, se observó la presencia del género *Acetobacter*, con la especie *Acetobacter persici* como representante mayoritario, ya que fue aislado en los 3 kéfires estudiados. La especie *Acetobacter indonesiensis* se encontró en el kéfir 1 y en el kéfir 2. La especie *Acetobacter okinawensis* se encontró solo en el kéfir 3. Dentro de esta misma familia también se aisló en el kéfir 3 la especie *Gluconobacter cerinus*, género de bacterias encontrado en baja proporción en el kéfir de agua (Lynch *et al.*, 2021). En otros estudios, se describe *Acetobacter* como género mayoritario de BAA (Laureys y De Vuyst, 2014, Martínez-Torres *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022).

Por otra parte, dentro del filo Pseudomonadota en el kéfir 2 se identificó *Zymomonas mobilis* perteneciente a la familia Zymomonadaceae. *Z. mobilis* es una bacteria anaerobia facultativa, que realiza la fermentación de azúcares, como fructosa o glucosa, produciendo etanol. En el kéfir de agua desempeña el mismo papel que las levaduras (Panesar *et al.*, 2006). Esta bacteria se aisló en el medio MRS, medio rico en azúcares y cultivado en condiciones de anoxia, siendo el sustrato ideal para su crecimiento. El aislamiento de esta bacteria no estaba previsto, puesto que se suele identificar por métodos independientes de cultivo (Marsh *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2022).

La población de levaduras identificadas pertenece al filo Ascomycota (**Tabla 2**), y todas ellas a la clase de Saccharomycetes. Dentro de esta clase, se aislaron cepas pertenecientes a varias familias. Se identificaron levaduras del género *Saccharomyces* en los tres kéfires, perteneciente a la familia Saccharomycetaceae; del género *Pichia* de la familia Pichiaceae en los kéfires 1 y 3; y la especie *Hanseniaspora valbyensis* en el kéfir 2 perteneciente a la familia Saccharomycodacea. Por último, se aisló el género *Candida* en los kéfires 1 y 3; y la especie *Debaryomyces hansenii* en el kéfir 3, ambas clasificadas dentro de la clase Saccharomycetes pero sin familia asignada (Schoch *et al.*, 2020). De todas las levaduras, el género *Saccharomyces* fue el más frecuente, aislándose en los tres kéfires. En el caso del kéfir 2 y del kéfir 3, se identificó la especie *S. cerevisiae*, mientras que en el kéfir 1 se aislaron las especies *S. paradoxus* y *S. uvarum*. Estos resultados concuerdan con la bibliografía, hasta ahora *Saccharomyces* representa una de las levaduras más comunes del kéfir agua, residiendo su importancia en la transformación de glucosa a etanol (Gulitz *et al.*, 2011; Marsh *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022). Por otra parte en el kéfir 1 y en el kéfir 3, elaborados con gránulos de origen “casero”, se identificó levadura *Candida*. Esta levadura se asocia a los gránulos de kéfir de leche, lo que sugiere que los gránulos con los que se elaboran dichas bebidas podrían haber sido originalmente utilizados para hacer kéfir de leche (Fiorda *et al.*, 2017). Mientras que en el kéfir 2, elaborado con gránulos de origen comercial, no se encontró esta especie de levadura.

El kéfir 3 mostró la mayor diversidad de levaduras y BAA. Se aislaron especies de levaduras como: *Debaryomyces hansenii*, *Candida valida*, *Pichia membranifaciens* y de BAA como *Gluconobacter cerinus* y *Acetobacter okinawensis*, que no se encontraron en los otros dos kéfires.

El kéfir 2, que corresponde con el kéfir elaborado a partir de gránulos de kéfir comerciales, presenta menor diversidad microbiológica en lo que respecta a BAA y levaduras, sin embargo es el único en el que se identificó la BAL *L.paracasei*, Además, de *Zymomonas mobilis*, especie poco común en estudios que emplean métodos dependientes de cultivo (Panesar *et al.*, 2006; Marsh *et al.*, 2013; Lynch *et al.*, 2021).

En el kéfir 1 lo más destacable son las dos especies aisladas del género *Saccharomyces*: *S. uvarum* y *S. paradoxus*.

Por último en los tres kéfires analizados los géneros de microorganismos comunes fueron: *Liquorilactobacillus*, *Acetobacter*, y *Saccharomyces* que corresponden con BAL,

BAA y levaduras respectivamente. Comparando estos resultados con la bibliografía existente, los tres géneros tienden a ser los representantes principales de la microbiota del kéfir de agua (Marsh *et al.*, 2013; Martínez-Torres *et al.*, 2017; Laureys *et al.*, 2019; Lynch *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2022). A pesar de que los de que los gránulos utilizados sean de un origen diferente y que cada kéfir posea características particulares, se observa que estos tres géneros de microorganismos se mantienen constantes en todos ellos y comunes a otros estudios.

4.3. Los árboles filogenéticos muestran que las especies microbianas se identificaron correctamente

Después de identificar las cepas, se elaboraron árboles filogenéticos para comprobar que la identificación fue correcta. Se utilizaron dos métodos de identificación: MALDI-TOF MS y secuenciación, lo que llevó a construir cuatro árboles filogenéticos en total. Dos de ellos representan las bacterias y las levaduras identificadas mediante MALDI-TOF MS (*Figuras 2 y 3*), mientras que los otros dos representan las bacterias y las levaduras identificadas por secuenciación de nucleótidos (*Figuras 4 y 5*).

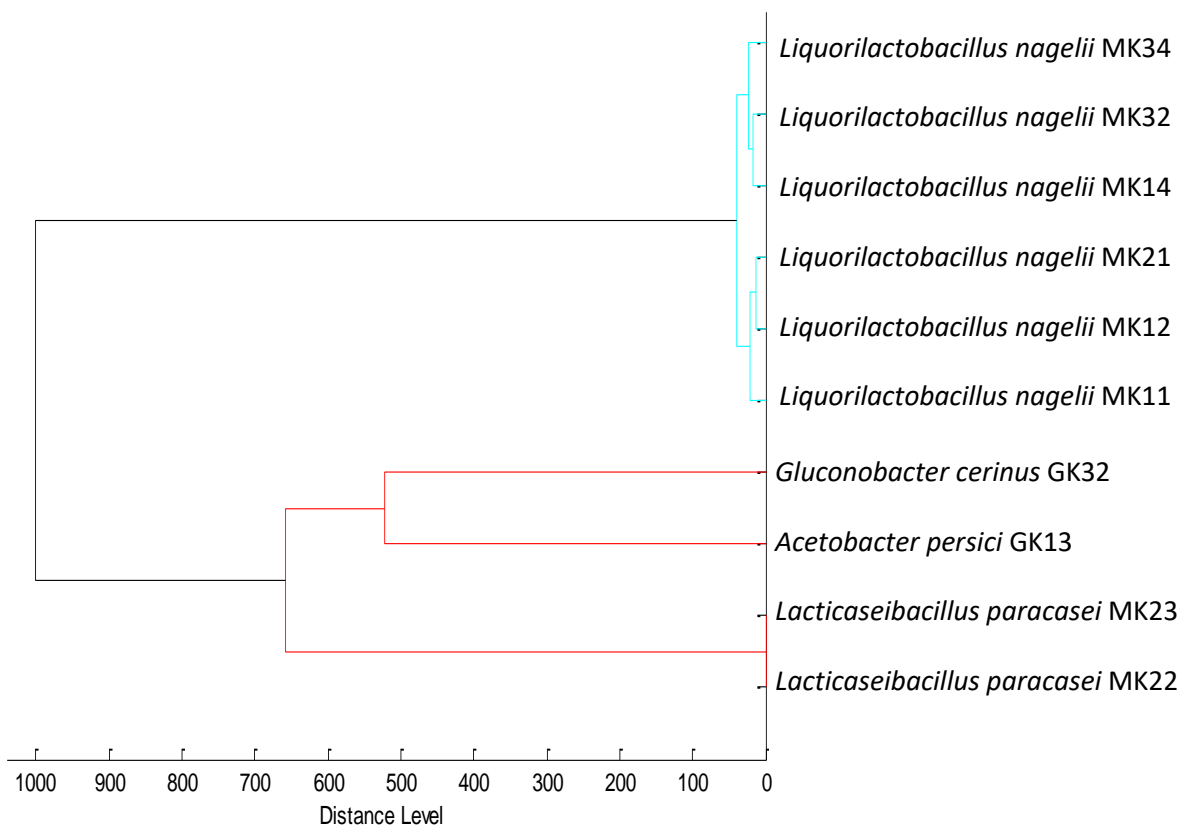


Figura 2. Árbol filogenético elaborado con el *software MALDI Biotyper Compass* mediante la comparación de los espectros de masas generados por la tecnología MALDI-TOF MS. Se muestra las relaciones filogenéticas más probables entre las bacterias identificadas atendiendo a la similitud de sus espectros. La longitud de las ramas muestra la similitud entre los taxones y la escala muestra la distancia relativa entre las diferentes taxones.

En la **Figura 2** se muestra el dendrograma elaborado para las bacterias identificadas mediante MALDI-TOF MS. Se observan dos grandes grupos diferenciados por colores. El primero, en color azul, reúne a diferentes cepas de *Liquorilactobacillus nagelii*, que son BAL. El segundo, en color rojo, agrupa a cepas de *Lacticaseibacillus paracasei*, también BAL, junto con dos especies de BAA: *Acetobacter persici* y *Gluconobacter cerinus*. Es decir, el programa ha agrupado a *L. paracasei* con BAA, en vez de con *L.nagelii*, especie con la que comparte familia. Una posible explicación para este hecho, es que los espectros asociados a *L.paracasei* hubieran presentado una mayor similitud con los espectros de *A.persici* y *G.cerinus*. Esto habría llevado a que al generar el dendrograma, se produjera esta agrupación errónea entre *L.paracasei* con las dos especies de BAA, dando lugar a una representación que no es filogenéticamente correcta. Aun así, se puede afirmar que la asignación de especies fue correcta porque las cepas problema presentaban un alto grado de similitud con las especies de las librerías de espectros. Esto se refuerza con el hecho de que las cepas de la misma especie presenten distancias relativas muy bajas entre ellas, como se puede observar entre las diferentes cepas de *L.paracasei* o *L.nagelii*.

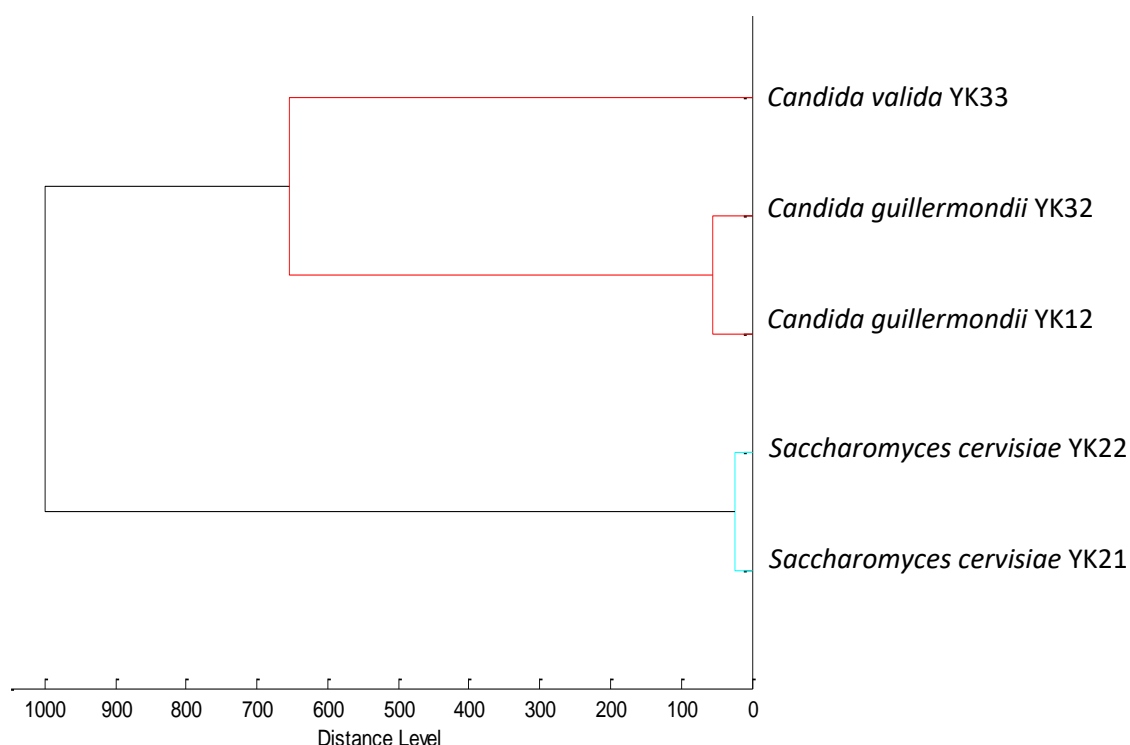


Figura 3. Árbol filogenético elaborado con el *software MALDI Biotyper Compass* mediante la comparación de los espectros generados por la técnica MALDI-TOF MS. Se muestra las relaciones filogenéticas más probables entre las levaduras identificadas atendiendo a la similitud de sus espectros. La longitud de las ramas muestra la similitud entre los taxones y la escala muestra la distancia relativa entre las diferentes taxones.

En el dendrograma de las levaduras identificadas por MALDI-TOF MS (*Figura 3*), se observan también dos grandes grupos diferenciados por colores. El primero en color rojo, agrupa a dos especies del género *Candida*: *C.valida* y *C.guilliermondi*, mientras que el segundo grupo, en color azul, une a dos cepas de *S.cerevisiae*. En este caso las especies han sido agrupadas de acuerdo con su filogenia, a diferencia de lo que ocurrió con las bacterias. Además al igual que las bacterias, se observa que las cepas de la misma especie poseen una distancia relativa muy baja, es decir tienen un alto grado de similitud, lo que refuerza el hecho de que la asignación de especies fue correcta.

En el caso de las cepas identificadas mediante la secuenciación parcial del ADNr 16S/28S, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el software MEGA7. Se incluyeron las secuencias obtenidas en este estudio y las secuencias con las que presentaron mayor similitud depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. Además se seleccionaron secuencias de microorganismos filogenéticamente alejados para que funcionaran como grupos externos (*outgroup*) y poder enraizar los árboles. Para las bacterias se eligió la secuencia ADNr 16S de *Escherichia coli* KSE 34 y para las levaduras la región D1-D2 de ADNr de *Bulleribasidium pseudovariabile* CBS 9609. Con estas premisas se realizó el alineamiento de las secuencias y se construyeron árboles utilizando el método de *Maximun Likelihood* que ofrece la topología de mayor probabilidad, asociada al logaritmo de mayor verosimilitud (Kumar *et al.*, 2016). Los árboles escogidos presentaban los siguientes logaritmos de mayor verosimilitud: log-3370.6741 para bacterias y log -2309.7221 para levaduras.

Además, con la opción *Model Selection* en MEGA 7 se seleccionó el mejor modelo de distancias para los árboles, que en ambos casos fue Kimura + G; el modelo Kimura asume diferentes probabilidades para las transiciones y las transversiones, y G que se refiera a la distribución discreta de Gamma sirve para modelar las diferencias de velocidad evolutiva entre las secuencias (Kimura, 1980; Kumar *et al.*, 2016).

Por último de cada árbol, se calcularon 1000 réplicas del test *Bootstrap*, para determinar la fiabilidad de los nodos. Un valor de *Bootstrap* alto para un nodo es indicativo de una alta fiabilidad y robustez de la rama. Se considera que valores de soporte superiores al 70% son ramas estables (Felsenstein, 1985).

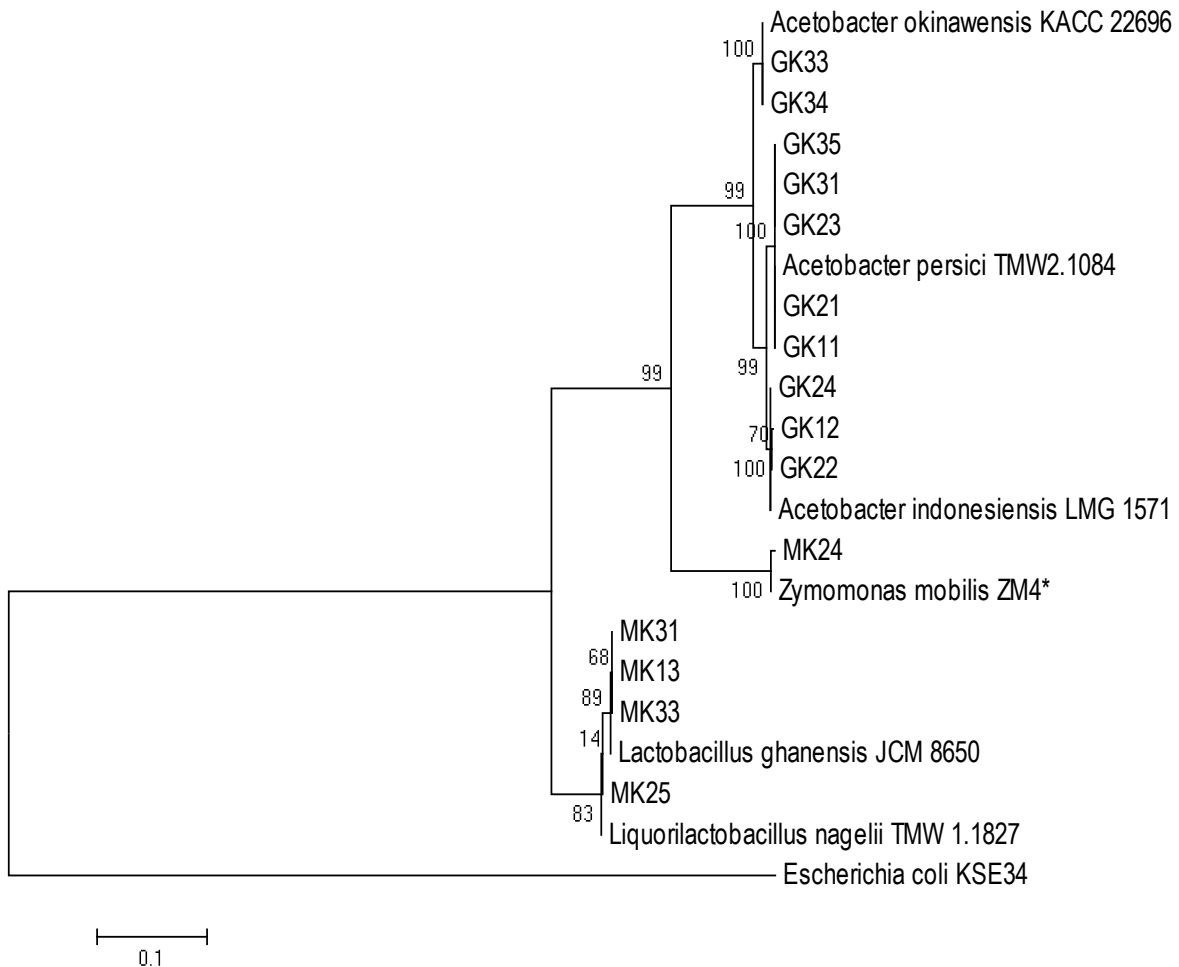


Figura 4. Árbol filogenético obtenido por el método *Maximum Likelihood* basado en el modelo Kimura 2 parámetros+G, realizado mediante la comparación de secuencias del gen codificante para el ARNr 16S de bacterias. Se representan las relaciones filogenéticas entre las cepas de bacterias aisladas y las cepas depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. Como *outgroup* se utilizó la especie *Escherichia coli* KSE 34. Las longitudes de las ramas reflejan el número de sustituciones por sitio y la escala muestra la distancia filogenética.

En la **Figura 4** se muestra el árbol realizado para las bacterias identificadas mediante la secuenciación parcial de ADNr 16S. Es un filograma métrico, es decir la longitud de las ramas refleja el número de cambios nucleótidos entre las diferentes secuencias. Además, se observa que la identificación fue correcta, ya que las bacteria problema se agruparon correctamente con las especies de referencia obtenidas de la base datos GenBank.

Respecto a las ramas, se observa que la mayoría de ellas tienen un valor de soporte mayor al 70%, lo cual indica una buena confianza en las relaciones filogenéticas. Sin embargo, existe una excepción en la rama que agrupa las especies *L. nagelii* y *L. ghanensis*, la cual tiene un valor de soporte del 14%. Estas dos especies están cercanas filogenéticamente, por lo que un valor de soporte tan bajo sugiere que las relaciones entre ellas no son claras. Esto podría deberse a que tienen secuencias muy similares pero no lo

suficiente como para ser consideradas la misma especie. Y por lo tanto el programa no ha sabido como muy bien como agruparlas, lo que ha llevado a que tengan un valor de soporte bajo. (Schoch *et al.*, 2020)

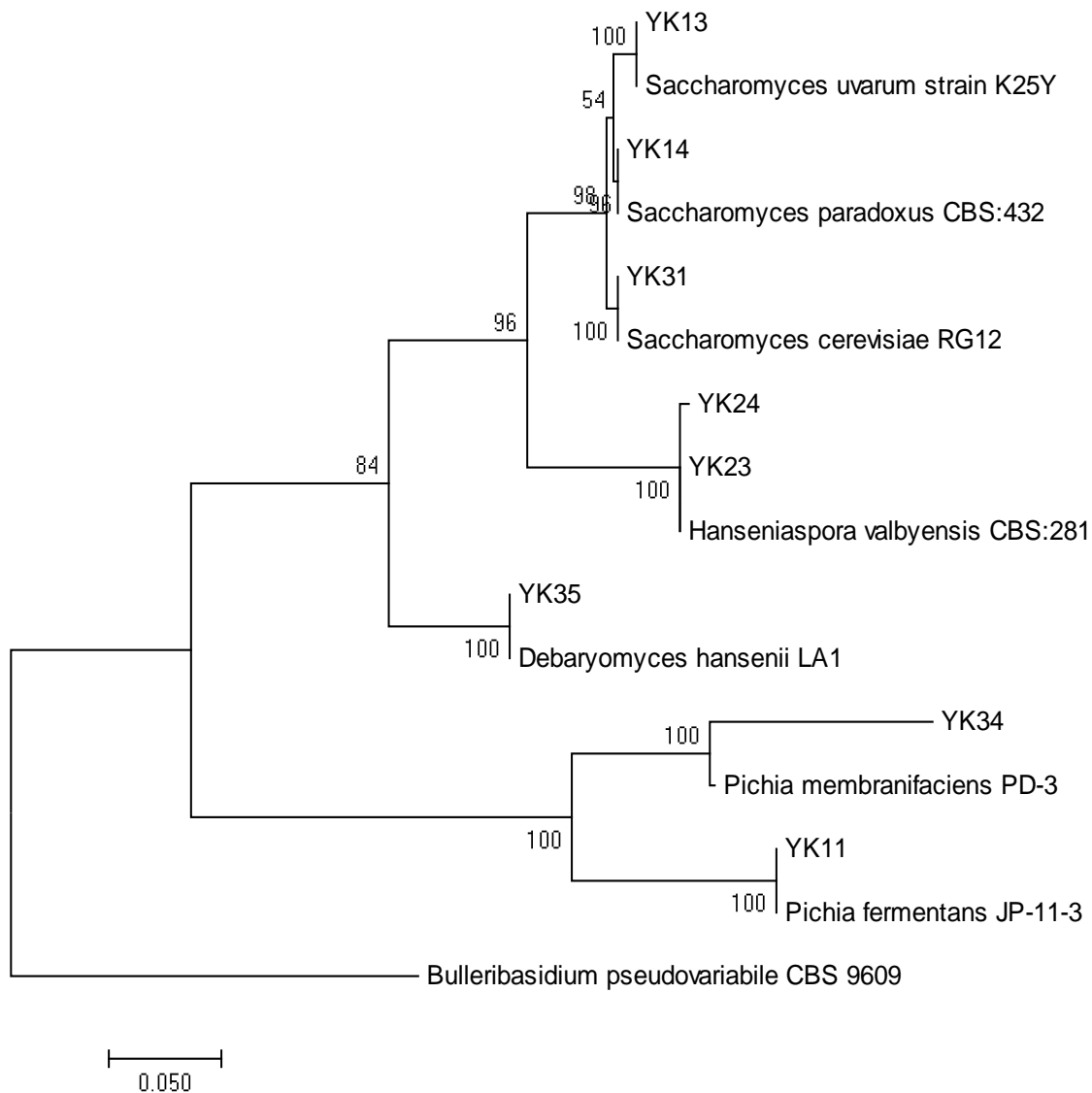


Figura 5. Árbol filogenético obtenido por el método *Maximum Likelihood* basado en el modelo Kimura 2 parámetros, realizado mediante la comparación de secuencias de la región D1-D2 del gen codificante para el ARNr 28S de levaduras. Se representan las relaciones filogenéticas entre las cepas de levaduras aisladas y las cepas depositadas en la base de datos GenBank del NCBI. Como *outgroup* se utilizó la especie *Bulleribasidium pseudovariabile* CBS 9609. Las longitudes de las ramas reflejan el número de sustituciones por sitio y la escala muestra la distancia filogenética.

En la **Figura 5** se muestra el árbol filogenético elaborado para las levaduras identificadas por secuenciación parcial del ADNr 28S. A igual que el árbol de las bacterias (**Figura 4**) es un filograma métrico, es decir la longitud de las ramas refleja el número de

cambios nucleótidos entre las secuencias. Y la asignación de especies también fue correcta, puesto que las levaduras problema se unieron correctamente con las especies referencia obtenidas de la base datos GenBank

Se observa además que todas las ramas tienen un valor de soporte mayor del 70%, a excepción del nodo que une las cepas de *S. paradoxus*, con las de *S. uvarum*. Esta rama tiene un valor de confianza de 54%. Esto es indicativo de que la filogenia de dicha rama no está clara. A pesar de ello, ambas son especies del mismo género y se sabe que son especies filogenéticamente próximas (Schoch *et al.*, 2020). Centrándonos en las relaciones filogenéticas, se puede observar que todas las levaduras aisladas conforman un grupo monofilético, esto se debe a que todas ellas forman parte de la misma clase, Saccharomycetes.

4.4. Identificación por MALDI TOF MS vs secuenciación de ADNr

En este trabajo se han empleado dos tipos de técnicas para la identificación de los microorganismos: la técnica MALDI TOF MS y la secuenciación parcial del ADNr. La tecnología MALDI TOF MS es un método rápido que utiliza librerías de espectros para la identificación de microorganismos (Ashfaq *et al.*, 2022). Sin embargo, tiene una limitación importante y es que no todos los microorganismos tienen sus espectros caracterizado en estas librerías. Esta limitación se evidenció en el presente trabajo, donde se utilizó inicialmente esta técnica para la identificación de los microorganismos. En la **Tabla 2** se observa que con esta técnica solo se lograron identificar 10 bacterias y 5 levaduras de un total de 38 cepas. Para el resto de los microorganismos, no se encontraron espectros en las librerías que coincidieran con la especie a identificar, o en caso de haberlos, no presentaban un grado suficiente de similitud para ser considerados de la misma especie.

Por otra parte, la secuenciación del ADNr es un método que requiere más tiempo, pero ofrece mayor confianza. Mediante este proceso, se obtiene una secuencia de nucleótidos que se puede comparar con bases de datos, y así, identificar el microorganismo con el que presenta mayor similitud. En este trabajo, todas las bacterias y levaduras que no pudieron ser identificadas mediante la técnica MALDI TOF MS, fueron identificadas mediante la secuenciación parcial del ADNr. Por lo tanto, la secuenciación en el presente trabajo proporcionó resultados más precisos, en comparación con las limitaciones de las librerías de la técnica MALDI TOF MS.

Además, en el contexto de estudios filogenéticos, tener secuencias de ADNr es más ventajoso, ya que permite el estudio de regiones conservadas entre varias secuencias o el cálculo de distancias filogénicas entre taxones, entre otros aspectos. En el presente trabajo esto no se estudió, pero si se elaboraron árboles filogenéticos (**Figuras 4 y 5**) para comprobar que la asignación de especies fue correcta.

Por otro lado, el programa *MALDI Biotyper Compass* ofrece un esbozo de las posibles relaciones filogenéticas. Esto lo realiza al comparar los espectros y elaborar dendrogramas basados en la similitud de los mismos. Sin embargo, es importante señalar que la similitud entre dos espectros no siempre indica un parentesco real. Esto puede llevar a la generación de dendrogramas que no reflejen con precisión la filogenia, como sucedió en el presente trabajo en la **Figura 2**, donde se representa un dendrograma de cepas bacterianas generado con dicho programa. En este dendrograma se agrupó a la BAL *L.paracasei* junto con *Acetobacter* y *Gluconobacter* ambas BAA, en lugar de agruparla con diferentes cepas de *L.nageli* (BAL), que están filogenéticamente más cercanas. Este error resultó en la creación de un dendrograma que no representaba correctamente las relaciones filogenéticas y con ello proporcionaba información incorrecta. Mientras que en los árboles filogenéticos elaborados a partir de las secuencias no se produjo ningún error de este tipo como se puede observar en las **Figuras 4 y 5**. Por último, el programa *MALDI Biotyper Compass* no proporciona información real sobre la historia evolutiva, la cual solo puede ser obtenida a través del análisis de secuencias de ADN.

5. CONCLUSIONES

El kéfir de agua es una bebida fermentada, que alberga una amplia y diversa comunidad de microorganismos. Este producto se reconoce por sus beneficios para la salud intestinal debido a su valor probiótico. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar la microbiota del kéfir de agua elaborada con gránulos de orígenes diferentes, con el fin de comprender mejor la diversidad microbiana presente en esta bebida. Con esta premisa, se llevó a cabo el aislamiento e identificación de la microbiota cultivable y se cuantificó la población de bacterias y levaduras. A partir de esto, se obtuvieron las siguientes conclusiones.

1. Las bacterias se encuentran en una mayor concentración que las levaduras en el kéfir de agua. Y dentro de las bacterias las BAA se encuentran en una mayor concentración que las BAL.

2. La comunidad microbiana cultivable de estos tres kéfires está compuesta principalmente por las especies de bacterias: *Liquorilactobacillus nagelii* y *Acetobacter persici*; y levaduras del género *Saccharomyces*.
3. Los kéfires de diferentes procedencia muestran diferencias en la composición y diversidad de su microbiota, siendo el kéfir 3 el que mayor diversidad presentaba.
4. La secuenciación del ADNr fue más fiable y eficaz para identificar microorganismos y establecer relaciones filogenéticas, que la técnica MALDI-TOF MS.

6. REFERENCIAS

- Ashfaq, M. Y., Da'na, D. A. y Al-Ghouti, M. A. (2022) "Application of MALDI-TOF MS for identification of environmental bacteria: A review", *Journal of Environmental Management*, 305: 114359.
- Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O. *et al.* (2021) "Kefir and its biological activities", *Foods*, 10(6): 1210.
- Caliński, T. (2014) "Dendrogram", *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. doi:10.1002/9781118445112.stat05624.
- Cufaoglu, G. y Erdinc, A. N. (2023) "An alternative source of probiotics: Water kefir", *Food Frontiers*, 4(1), pp. 21-31.
- De Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. (1960) "A medium for the cultivation of lactobacilli", *Journal of applied bacteriology*, 23(1), pp. 130-135.
- De la Mano, L. G., Kaimen, A. L., López, F., Moreno, L. I., Alfageme, C. y Drolas, C. (2019) "Descripción y análisis de las técnicas de producción de Kéfir", *Rev. Nutr. Argentina*, pp. 309-349.
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M. y Whelan, K. (2019) "Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease", *Nutrients*, 11(8): 1806.
- Felsenstein, J. (1985) "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap", *Evolution*, 39(4), pp. 783-791.
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., de Souza Vandenberghe, L. P. y Soccol, C. R. (2017) "Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review", *Food Microbiology*, 66, pp. 86-95.
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A. y Vogel, R. F. (2011) "The microbial diversity of water kéfir", *International journal of food microbiology*, 151(3), pp. 284-288.
- Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, Ç. y Greene, A. K. (2021) "A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties", *Trends in Food Science & Technology*, 113, pp. 42-53.
- Hsieh, H. H., Wang, S. Y., Chen, T. L., Huang, Y. L. y Chen, M. J. (2012) "Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains", *International journal of food microbiology*, 157(1), pp. 73-81.
- Kimura M. (1980) "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *Journal of Molecular Evolution* 16, pp. 111-120.
- Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016) "MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular biology and evolution*, 33(7), pp. 1870-1874.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P. y De Vuyst, L. (2018) "Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process", *Food microbiology*, 73, pp. 351-361.
- Laureys, D., Aerts, M., Vandamme, P. y De Vuyst, L. (2019) "The buffer capacity and calcium concentration of water influence the microbial species diversity, grain growth, and metabolite production during water kefir fermentation", *Frontiers in microbiology*, 10: 2876.
- Laureys, D. y De Vuyst, L. (2014) "Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation", *Applied and environmental microbiology*, 80(8), pp. 2564-2572.
- Laureys, D., Van Jean, A., Dumont, J. y De Vuyst, L. (2017) "Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process", *Applied microbiology and biotechnology*, 101, pp. 2811-2819.
- Li, Y., Liu, T. J. y He, G. Q. (2015) "Isolation and identification of yeasts from Tibet Kefir", *Advance Journal of Food Science and Technology*, 7(3), pp. 199-203.
- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L. y Arendt, E. K. (2021) "An update on water kefir: Microbiology, composition and production", *International Journal of Food Microbiology*, 345, pp. 109-128.

- Magalhaes, K. T., de M. Pereira, G. V., Dias, D. R. y Schwan, R. F. (2010) "Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, pp. 1241-1250.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P. y Cotter, P. D. (2013) "Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources", *FEMS microbiology letters*, 348(1), pp. 79-85.
- Martínez-Torres, A., Gutiérrez-Ambrocio, S., Heredia-del-Orbe, P., Villa-Tanaca, L. y Hernández-Rodríguez, C. (2017) "Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations", *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), pp. 559-571.
- Moreira, M. E. C., Santos, M. D., Zolini, G. P. P., Wouters, A. T. B. *et al.* (2008). "Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir", *Journal of medicinal food*, 11(2), pp. 356-361.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. y Schäffer, A. A. (2008) "Database indexing for production MegaBLAST searches", *Bioinformatics*, 24(16), pp. 1757-1764.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Nueva York: Oxford University Press.
- Panesar, P. S., Marwaha, S. S. y Kennedy, J. F. (2006) "Zymomonas mobilis: an alternative ethanol producer", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(4), pp. 623-635.
- Patel, S. H., Tan, J. P., Börner, R. A., Zhang, S. J. *et al.* (2022) "A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 80: 103084.
- Pendón, M. D., Bengoa, A. A., Iraporda, C., Medrano, M., Garrote, G. L. y Abraham, A. G. (2022) "Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage", *Journal of Applied Microbiology*, 133(1), pp. 162-180.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V. y Soccol, C. R. (2015) "Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products", *Frontiers in microbiology*, 6: 1177.
- Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M. y Hutkins, R. (2018) "Fermented foods as a dietary source of live organisms", *Frontiers in microbiology*, 9: 1785.
- Schoch C.L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L. *et al.* (2020) "NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools", *Database*, 2020: baaa062.
- Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M. A. y Vogel, R. F. (2013) "Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir", *Food microbiology*, 35(2), pp. 92-98.
- Swings, J. (1992) "The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*", en Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K. H. (eds.) *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification and applications*. 2.^a ed. Nueva York: Springer Verlag, pp. 2268–2286.
- Wickerham, L. J. (1951) *Taxonomy of yeasts*. Estados Unidos: Department of Agriculture.
- Zannini, E., Lynch, K. M., Nyhan, L., Sahin, A. W., O'Riordan, P., Luk, D. y Arendt, E. K. (2023) "Influence of substrate on the fermentation characteristics and culture-dependent microbial composition of water kefir", *Fermentation*, 9(1): 28.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. *et al.* (2020) "A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*", *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), pp. 2782-2858.

7. ANEXOS

Anexo 1- Composición de medios de cultivo

Medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) descrito por De Man *et al.* (1960). Este medio es empleado para el aislamiento de bacterias del ácido láctico, sobre todo lactobacilos. Se suplementó con maltosa al 1% y fructosa al 0,5% con el fin de favorecer el crecimiento bacteriano. Se muestra su composición para 1 litro de este medio en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Composición de 1 L de medio MRS (VWR Chemicals).

Componentes	Cantidad	Componentes	Cantidad
Peptona	10 g	Sulfato de magnesio	0,2 g
Extracto de carne	10 g	Sulfato de manganeso	0,05 g
Extracto de levadura	5 g	Citrato de amonio	2 g
Glucosa	20g	Tween 80	1,08 g
Hidrógeno-fosfato dipotásico	2 g	Acetato de sodio	5 g

*Se suplemento con Agar 20g/L para hacerlo medio sólido

Medio Glucose-Yeast extract-Calcium carbonate (GYC) descrito por Swings (1992). Medio diferencial para el cultivo de bacterias del ácido acético. Se muestra en la **Tabla 4** la composición para 1 litro de medio.

Tabla 4. Composición de 1 L de medio GYC sólido.

Componentes	Cantidad
Glucosa	50 g
Extracto de levadura	10 g
Carbonato de calcio	5 g
Agar	20 g

Medio Yeast extract-Glucose-Chloramphenicol (YGC) descrito por Medio empleado para el aislamiento selectivo de levaduras en productos lácteos y derivados. Se muestra la composición de este medio en la **Tabla 5** (Wickerham, 1951).

Tabla 5. Composición de 1L de medio YGC sólido.

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	20 g

Anexo 2- Ph del kéfir y recuentos microbianos

PH DEL KÉFIR

Tabla 6. Se muestra el pH de cada kéfir (K1: kéfir 1; K2: kéfir 2; K3: kéfir 3) antes de la fermentación y tras 24 horas fermentado a 25°C

	K1	K2	K3
pH inicial	6,83	6,9	6,79
pH tras 24h a 25°C	3,57	3,86	3,72

RECUEENTOS MICROBIANOS

Tabla 7. Se muestra los recuentos microbianos, la dilución en la que se realizó, los UFC/mL y la media de UFC/mL para cada tipo de kéfir (K1: kéfir 1; K2: kéfir 2; K3: kéfir 3) y de medio.

Tipo de kéfir	N.º de colonias	Dilución	UFC/mL	Media UFC/mL
Medio MRS				
K1	88	10 ³	8,80 x10 ⁵	8,45 x 10 ⁵
	81	10 ³	8,10x 10 ⁵	
K2	186	10 ²	1,86x 10 ⁵	3,28x10 ⁵
	47	10 ³	4,70x 10 ⁵	
K3	266	10 ³	2,66x10 ⁶	3,23 x10 ⁶
	38	10 ⁴	3,80 x10 ⁶	
Medio GYC				
K1	141	10 ⁴	1,41x10 ⁷	1,62 x 10 ⁷
	182	10 ⁴	1,82x10 ⁷	
K2	285	10 ⁴	2,85 x10 ⁷	2,46x10 ⁷
	206	10 ⁴	2,06 x10 ⁷	
K3	45	10 ⁵	4,50x10 ⁷	3,24 x10 ⁷
	86	10 ⁵	8,60 x10 ⁷	
Medio YGC				
K1	86	10 ²	8,60x10 ⁴	7,9 x 10 ⁴
	72	10 ²	7,20x10 ⁴	
K2	74	10 ⁴	7,40 x10 ⁶	7,35x10 ⁶
	73	10 ⁴	7,30 x10 ⁶	
K3	146	10 ²	1,46x10 ⁵	1,36 x10 ⁵
	125	10 ²	1,25x10 ⁵	

Anexo 3-Morfologías de microorganismos

Tabla 7. Se presentan las características morfológicas de las diferentes cepas de bacterias aisladas en el medio MRS, para cada tipo de kéfir. Se muestra el código y la especie.

Código	Especie bacteriana	Tamaño	Forma	Márgen	Coloración	Textura	Elevación
MK11	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	5 mm	Circular	Entero	Blanca con bordes translúcidos	Mucosa	Convexa
MK12	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	3- 5 mm	Circular	Ondulado	Blanca con bordes translúcidos	Mucosa	Elevada
MK13	<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i>	3- 4 mm	Circular	Ondulado	Blanca ligeramente translúcida	Mucosa	Plana
MK14	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	2-3 mm	Circular	Entero	Blanca	Mucosa	Convexa
MK21	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	4 mm	Circular	Entero	Blanca ligeramente translúcida	Mucosa	Plana
MK22	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	4 mm	Circular	Entero	Blanca amarillenta	Mucosa	Elevada
MK23	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	2-4mm	Circular	Filiforme	Blanco concéntrico	Mucosa	Plana
MK24	<i>Zymomonas mobilis</i>	3 mm	Irregular	Serrado	Blanco translucido	Mucosa	Plana
MK25	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	<1mm	Puntiforme	Entero	Blanco cremoso	Mucosa	Convexa
MK31	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	1,5-2 mm	Circular	Ondulado	Blanca	Mucosa	Plana
MK32	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	1-2 mm	Circular	Entero	Blanca	Mucosa/ rugosa	Convexa
MK33	<i>Liquorilactobacillus ghanensis</i>	5-6 mm	irregular	Filiforme	Blanca	mucosa	Plana
MK34	<i>Liquorilactobacillus nagelii</i>	2-3 mm	Circular	Entero	Blanca	mucosa	Convexa

Tabla 8. Se presentan las características morfológicas de las diferentes cepas de BAA aisladas en el medio GYC, para cada tipo de kéfir. Se muestra el código y la especie.

Código	Especie bacteriana	Tamaño	Forma	Márgen	Coloración	Textura	Elevación
GK11	<i>Acetobacter persici</i>	2-3 mm	Circular	Serrado	Blanca con bordes translúcidos	Mucosa	Plana
GK12	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	2-3 mm	Circular	Serrado	Amarillenta	Mucosa	Plana
GK13	<i>Acetobacter persici</i>	2-3 mm	Circular	Entero	Blanca	Mucosa	Plana
GK21	<i>Acetobacter persici</i>	2 mm	Circular	Entero	Blanca con bordes translúcidos	Mucosa	Plana
GK22	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	4 mm	Circular	Ondulado	Amarillenta	Mucosa	Convexa
GK23	<i>Acetobacter persici</i>	3 mm	Circular	Entero	Blanca	Mucosa	Plana
GK24	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	2-3 mm	Circular	Entero	Amarillenta	Mucosa	Plana
GK31	<i>Acetobacter persici</i>	1,5 mm	Circular	Entero	Amarillenta	Mucosa	Plana
GK32	<i>Gluconobacter cerinus</i>	1,5 mm	Circular	Entero	Blanca	Mucosa	Plana
GK33	<i>Acetobacter okinawensis</i>	1,5- 2 mm	Circular	Ondulado	Blanca con bordes trasnlúcidos	Seca	Plana
GK34	<i>Acetobacter okinawensis</i>	2-3 mm	Circular	Serrado	Blanco	Seca	Plana
GK35	<i>Acetobacter persici</i>	3 mm	Circular	Entero	Amarillenta	Mucosa	Umbilicada

Tabla 9. Se presentan las características morfológicas de las diferentes cepas de BAL aisladas en el medio GYC, para cada tipo de kéfir. Se muestra el código y la especie.

Código	Especie fúngica	Tamaño	Forma	Márgen	Coloración	Brillo	Textura	Elevación
YK11	<i>Pichia fermentans</i>	4- 5 mm	Circular	Serrado	Blanca	Sin brillo	Seca	Elevada
YK12	<i>Candida guilliermondii</i>	3- 4 mm	Circular	Entero	Blanca	Sin brillo	Mucosa	Convexa
YK13	<i>Saccharomyces uvarum</i>	<1 mm	Puntiforme	Entero	Blanca	Sin brillo	Seca	Convexa
YK14	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	3- 4 mm	Circular	Entero	Blanca	Brillante	Mucosa	Convexa
YK21	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4- 5 mm	Circular	Entero	Blanca	Sin brillo	Mucosa	Convexa
YK22	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4- 5 mm	Circular	Entero	Amarillenta/ blanca	Sin brillo	Mucosa	Umbilicada
YK23	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	1- 2 mm	Puntiforme	Serrado	Blanca	Sin brillo	Mucosa	Convexa
YK24	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	3- 4 mm	Circular	Entero	Blanquecina/ transparente	Brillante	Mucosa	Convexa
YK31	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4 mm	Circular	Entero	Blanca	Brillante	Mucosa	Convexa
YK32	<i>Candida guilliermondii</i>	3 mm	Circular	Entero	Blanca	Brillante	Mucosa	Plana
YK33	<i>Candida valida</i>	2,5 mm	Circular	Ondulado	Amarillenta/ blanca	Sin brillo	Seca	Elevada
YK34	<i>Pichia membranifaciens</i>	2 mm	Circular	Entero	Amarillenta/ blanca	Sin brillo	Mucosa	Elevada
YK35	<i>Debaryomyces hansenii</i>	< 1mm	Puntiforme	Entero	Blanquecina con bordes translúcidos	Brillante	Mucosa	Elevada