



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

## Trabajo Fin de Grado

# **Estudio de la comunidad microbiana del kéfir y aislamiento de microorganismos con actividad antimicrobiana.**

**Alumno: María del Pilar Fernández Pérez.**

**Junio, 2017.**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

## Trabajo Fin de Grado

# **Estudio de la comunidad microbiana del kéfir y aislamiento de microorganismos con actividad antimicrobiana.**

**Alumno: María del Pilar Fernández Pérez.**

**Junio, 2017.**

## ÍNDICE.

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
3.1.	El kéfir.....	3
3.2.	Tipos de kéfir .....	7
3.2.1.	Kéfir de leche.....	7
3.2.2.	Kéfir de agua .....	9
3.2.3.	<i>Kéfir de té o “kombucha”</i> .....	10
3.3.	Beneficios del kéfir.....	11
4.	OBJETIVOS.....	14
5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	15
5.1	Muestras de kéfir .....	15
5.2	Medios de cultivo y soluciones. ....	15
5.3.	Bacterias indicadoras utilizadas .....	18
5.4.	Determinación de la carga microbiana del kéfir .....	18
5.5.	Detección de la actividad antimicrobiana.....	19
5.6.	Confirmación de la inhibición.....	19
5.7.	Detección de microorganismos de interés.....	20
6.	RESULTADOS. ....	21
6.1.	Determinación de la carga microbiana del kéfir.....	21
6.2.	Determinación de la actividad antimicrobiana. ....	23
6.2.1.	Kéfir de leche.....	23
6.2.2.	Kéfir de agua. ....	24
6.2.3.	Kéfir de té. ....	24
6.3.	Producción de las sustancias antimicrobianas en medio líquido. ....	24
6.4.	Selección e identificación preliminar de microorganismos de interés.....	25
6.4.1.	Microorganismos identificados tras la tinción clásica:.....	25
6.4.2.	Diferenciación de las bacterias, identificadas en la tinción clásica, mediante la tinción de Gram:.....	26
7.	DISCUSIÓN.....	27
8.	CONCLUSIÓN.....	28
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	29

## 1. RESUMEN.

En la actualidad, un gran tema de interés es el de los alimentos que además proporcionar los nutrientes básicos para la vida, son capaces de prevenir enfermedades con su consumo. Un ejemplo típico y conocido de este tipo de alimentos, es el de los probióticos ya que éstos son microorganismos capaces de producir sustancias inhibitorias frente a patógenos cotidianos. Más concretamente, en este ensayo se procederá al estudio de un tipo específico de probiótico, el kéfir, en tres de sus variedades tradicionales, el kéfir de leche, agua y té.

Nuestro objetivo a seguir, es el estudio de la comunidad microbiana de dichos tipos de kéfir para así poder encontrar microorganismos de interés con actividad antimicrobiana. Para estudiar dicha acción inhibitoria frente a patógenos, se expusieron dichas cepas de interés frente a bacterias como *Salmonella*, *Bacillus cereus* LWL1, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* S-47, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Esta detección de actividad antimicrobiana, se realizó mediante la siembra en cruz y en medio líquido en los tres tipos de kéfir. Pudiéndose comprobar, que el kéfir de leche tenía una clara producción de sustancias bactericidas frente a algunas de las bacterias indicadoras, mientras que el kéfir de agua y de té no presentaron dicha actividad.

Este trabajo deja la puerta abierta a nuevos estudios sobre probióticos, o en este caso especial sobre el kéfir. Productos que cada día están más solicitados y son más comunes en nuestra alimentación, debido a los nutrientes esenciales que se aportan a nuestra dieta, además de la capacidad antimicrobiana que podrían otorgar frente a diversas patologías. Asimismo, estos estudios proporcionan un punto de confianza en la sociedad a la hora de consumir dichos productos naturales.

Palabras clave: kéfir de leche, kéfir de agua, kéfir de té, probióticos, capacidad antimicrobiana, bactericida, comunidad microbiana.

## 2. ABSTRACT.

Nowadays, a great topic of interest is that of foods that also provides the basic nutrients for human life, are able to prevent diseases with their consumption. A typical and well-known example of this type of food is that of probiotics since these are microorganisms capable of producing inhibitory substances against daily pathogens. In this work, we will analyze a specific type of probiotic, the kefir, in its three traditional varieties, milk, water and tea kefir.

Our main objective is to study the microbial community of these types of kefir in order to find microorganisms with antimicrobial activity. To study such inhibitory activity against pathogens, we exposed these bacterial strains against other bacteria such as *Salmonella*, *Bacillus cereus* LWL1, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* S-47, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. This detection of antimicrobial activity was performed by plating on cross and in broth medium for all three types of kefir. We verified that milk kefir had a clear production of antibacterial substances against some of the indicator bacteria. Nevertheless, water and tea kefir had no such activity.

This work leaves the door open to new studies on probiotics, and especially the kefir. Products that are more frequently requested by population and are more common in our diet, due to their essential nutrients that are added to our diet in addition to its antimicrobial capacity that could act against diverse pathogens. Also, this essay gives confidence to the society in terms of consuming natural products.

Key words: milk kefir, water kefir, tea kefir, probiotics, antimicrobial activity, bactericide, microbial community.

### 3. INTRODUCCIÓN.

#### 3.1. El kéfir.

Los microorganismos probióticos son organismos vivos capaces de ejercer efectos beneficiosos para la salud tales como capturar aflatoxinas (Garrote, 1999), sustancias tóxicas generadas por hongos del género *Aspergillus* (<https://es.wikipedia.org/wiki/Aflatoxina>). Un ejemplo microbiano con propiedad probiótica es el kéfir (Garrote, 1999). Su nombre proviene de la palabra “kefy” o “kef”, palabra turca que significa “sabor agradable” (Boldrini, 2009).

El kéfir tiene un aspecto similar al de la coliflor, masa blanca, blanda y apariencia rugosa, debido a su composición en numerosos gránulos. Además tiene una textura gelatinosa, y en la mayoría de los casos insoluble en agua (Zudaire, 2011).

El kéfir es un producto fermentado, característica que le proporciona su particular sabor ácido a la bebida final obtenida. Esta fermentación tiene origen en sus componentes microbianos, levaduras y bacterias, asociadas en un seno de proteínas denominado kefiriano. Estos microorganismos llevan a cabo una doble fermentación, láctica y alcohólica. Esta reacción puede desarrollarse en varios medios, uno de los más conocidos y utilizados es la leche. En ella, la fermentación comienza con una transformación de la lactosa en ácido láctico y posteriormente éste en nuevos componentes; uno de ellos el alcohol, en una menor proporción a los demás resultantes (Zudaire, 2011).

Algunos de los más destacados microorganismos presentes en los granos de este producto, que posteriormente se transfieren al medio donde crecen y realizan su actividad, son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Saccharomyces*, *Leuconostoc* y *Kluyveromyces* entre otros (Garrote, 1999).

A continuación, se muestra de manera más detallada la composición de este producto (Tabla 1; Boldrini, 2009).

<b>Tabla 1. Microbiota típica aislada de lotes de granos de kéfir.</b>		
<b><i>Lactobacillus</i> sp.</b>	<b><i>Streptococcus/ Lactococcus</i></b>	<b><i>Levaduras</i></b>
<i>Lb. galactose</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>S. florentinus</i>
<i>Lb. casei subsp. casei</i>	<i>Str. lactis</i>	<i>S. pretoriensis</i>
<i>Lb. casei subsp. pseudo plantarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>candida valida</i>
<i>Lb. casei subsp. ramos</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>	<i>C. lambica</i>
<i>Lb. casei subsp. tolerant</i>		<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Lb. coraciiform subsp. torque ns</i>		<i>Hansenula yalbensis</i>
<i>Lb. fructose</i>		
<i>Lb. hilarities</i>		
<i>Lb. homophobia</i>		
<i>Lb. plantarum</i>		
<i>Lb. pseudo plantarum</i>		
<i>Lb. admonishes</i>		

Éste es uno de los productos más antiguos que se conocen ya que su consumo se remonta a más de mil años antes de la época actual. Tiene su origen en la región del Cáucaso, donde sin congeladores ni frigoríficos debían conservarse los alimentos diariamente (Fagella, 2010).

Las leches fermentadas adquirieron tal difusión entre poblaciones gracias a la divulgación por pueblos migratorios, tales como germánicos y nórdicos (Zudaire, 2011). Al igual que los situados en toda la región asiática; concretamente en la región de Xinjiang, China, donde los primeros hallazgos de consumo de kéfir datan de la edad de bronce (1980 a 1450 a. c.); otro dato insólito de los individuos de esta región es el uso de gargantillas fabricadas con gránulos de kéfir en los difuntos,

concretamente en sus enseres destinados a la posible nueva vida tras la muerte (Yang et al., 2015). Esta difusión del kéfir fue gracias al alto consumo de productos lácteos en estos pueblos; además la bebida resultante de la fermentación era muy nutritiva, sabrosa y fresca. Característica clave en una época donde el agua potable no estaba al alcance de toda la población, ocasionando gran cantidad de enfermedades infecciosas (Fagella, 2010).

Al igual que en la cultura occidental se ensalza el pan y el vino, ambos productos fermentados, y los nativos americanos el maíz y el bisonte, esta bebida fermentada ha sido objeto de veneración en el Medio Oriente. No fue hasta mediados del siglo XIX que se incluyó en la costumbre europea, convirtiéndose en un instrumento esencial en el tratamiento de enfermedades propias de aquella época como tuberculosis; es por ello que su uso pronto se extendió por todos los países occidentales. Uno de estos países fue España, registrándose su primera entrada a mediados del siglo XX, desde las Islas Baleares. Fue en el año 1950, cuando una empresa comenzó a comercializarlo por primera vez pero la idea no tuvo mucho éxito ya que era una época donde la cultura española, la poca información sobre el producto y su relación con asuntos médicos no lo hacían deseable para la población (Fagella, 2010).

Existen varios métodos de conservación tras limpiar el kéfir en agua. En cuanto a este dato, la mayoría de estudios aconsejan no lavar al principio del uso el kéfir, ya que las cuajadas adheridas a él lo protegen del medio externo, por lo que se recomienda una limpieza cada 15 días en un mes ([www.ifeelmaps.com](http://www.ifeelmaps.com)).

Por lo tanto, en cuanto a los métodos de conservación:

→Uno de ellos es en el frigorífico, donde el kéfir debe conservarse a 4°C y durará en perfectas condiciones unas dos semanas. Otro detalle a tener en cuenta es el del agua de limpieza, que debe ser sin cloro y no sobrepasar los 35°C ya que esta temperatura podría matar a los microorganismos. También es importante la limpieza de los utensilios que se utilizan, lavándolos con agua caliente y detergentes ([www.ifeelmaps.com](http://www.ifeelmaps.com)).

→Otra opción es en el congelador, donde el kéfir, bien seco, se introduce en un recipiente y se congela; cuando se quiere volver a utilizar este debe sacarse del congelador y recuperar su forma original en el frigorífico. Posteriormente, se introducen los granos en leche, o en el medio que requiera, durante unos tres días. El producto obtenido se deshecha, y el kéfir ya estaría listo para su nuevo uso



([www.ifeelmaps.com](http://www.ifeelmaps.com)), aunque según Zudaire (2011), “el kéfir no recupera todas sus características iniciales”.

→Y la última y menos conocida forma de conservación es la deshidratación, donde el kéfir se deposita sobre un papel absorbente hasta adquirir un aspecto sólido, pierde toda su textura viscosa. De esta manera puede durar entre unos 2-3 meses. Para volver a utilizarlo tras la deshidratación, se introduce en leche, o en el medio correspondiente, durante unas dos semanas, renovando éste cada dos días aproximadamente ([www.ifeelmaps.com](http://www.ifeelmaps.com)).

Habitualmente, el kéfir ha pasado de unas personas a otras de forma gratuita; ya que este crece a una rapidez significativa, el propietario se ve forzado a dar una cierta cantidad cada cierto tiempo ([www.ifeelmaps.com](http://www.ifeelmaps.com)).

Durante el proceso de manipulación, no es recomendable utilizar utensilios de metal, ya que algunos de ellos pueden reaccionar con el ácido del kéfir y producir una pequeña corriente eléctrica. Dato reflejado en algunos experimentos, donde se introdujo 1 litro de kéfir en un recipiente de acero inoxidable y se esperó a ver las posibles corrientes eléctricas producidas. Pasado un tiempo se verificó la teoría, cuando se introdujo el kéfir en el recipiente se ocasionó una corriente de 150Mv-30 microampers. Sin embargo, al incluir 100 gramos de kéfir se produjo una corriente mayor que en el caso anterior, 250Mv-50 microampers. Corriente eléctrica que es perjudicial para mantener el equilibrio de la microbiota intestinal, ya que se liberan iones de estos utensilios y pueden ser asimilados por el organismo, almacenándose en el interior y produciéndose alguna patología a largo plazo. Lo ideal es utilizar utensilios de vidrio ya que el plástico también puede reaccionar y liberar los compuestos químicos que los forman.

Aunque hoy en día, ningún producto está totalmente libre de contener algún compuesto químico o metales, ya que la mayoría de utensilios de vidrio han sido fabricados con moldes de vidrio, lo que les hace tener restos en el resultado final. Incluso los utensilios de procedencia natural pueden contener pesticidas o fungicidas, por lo que habría que lavarlos con detergente o hervirlos en vinagre. Pero siempre se debe elegir un producto que no modifique o no modifique en gran medida las cualidades del kéfir y para ello el más recomendado es el de vidrio ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_cultivo.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_cultivo.html)).

### 3.2. Tipos de kéfir

Existen tres tipos de kéfir, el de leche, el de agua y el de té. Del primer tipo se obtiene una leche ligeramente más densa, con textura parecida al yogurt; del segundo se obtiene un agua gaseosa parecida a un refresco con un ligero sabor a cítricos y del último una bebida con un sabor parecido a una infusión (Zudaire, 2011). Aunque parezcan diferentes y que tienen finalidades desiguales estos tres tipos de kéfir no varían prácticamente en su composición sino que lo que los hace distintivos son los medios sobre los que desarrollan su actividad. Hay pocas empresas en auge que se dediquen a la comercialización del kéfir, siendo el de leche el más mercantilizado debido a su parecido con el yogurt (Zudaire, 2011). A continuación se muestra una explicación algo más detallada de cada uno de ellos:

#### 3.2.1. Kéfir de leche

El kéfir tiene múltiples formas de consumo, entre ellas las más conocidas son las del kéfir de leche. Este kéfir puede tomarse como una bebida fermentada, leche obtenida tras colar los granos de kéfir fermentadores de ésta. También pueden elaborarse con ésta exquisitos batidos con frutas, cereales o simplemente añadiendo unas gotas de miel; un complemento perfecto en los desayunos. También pueden prepararse exquisitas cremas de queso. A pesar de su parecido y de las múltiples ventajas del kéfir con respecto al yogurt, este último es más vendido ya que su proceso de obtención es más simple y productivo. (Zudaire, 2011). El aspecto físico del kéfir de leche es el siguiente (Fig. 1):



Figura 1. Gránulos de kéfir de leche (Said, 2014)

En sus comienzos el kéfir se preparaba sobre leche de camella, pasados unos años con leche de yegua y actualmente sobre leche de cabra o vaca, siendo esta última la más utilizada (Garrote, 1999).

El proceso de preparación de este tipo de kéfir es artesanal ya que no aguanta procesos mecánicos, como los que hay en la industria. Este kéfir se introduce en leche fresca, mejor leche pasteurizada que aquella que haya sufrido más choques térmicos o procesos de esterilización o UHT. La medida estándar utilizada, para los gránulos de kéfir, es una cantidad similar a la del tamaño de un limón en 75 ml de leche (Zudaire, 2011). Esta mezcla se introduce en un recipiente de cristal, hermético o con un paño de tela sobre él, y se mete en la parte menos fría del frigorífico; debe evitar siempre el contacto con el aire. Tras pasar 12 horas, obtendremos una leche fermentada; al pasar 24 horas, obtendremos una especie de leche con una consistencia parecida al yogurt y pasadas 36 horas, se obtiene una bebida muy densa con un sabor más amargo. Durante este proceso de fermentación, es oportuno agitar el recipiente, donde se encuentran los granos de kéfir y la leche adicionada, para que se mezclen los granos con leche que está más alejada de estos y así alimentar en mayor medida a la microbiota contenida. Esto aumentaría la velocidad de fermentación y con ello la obtención de la bebida fermentada ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html)).

Posteriormente, los granos de kéfir se filtran con un colador no metálico y estos se lavan con agua, sin cloro, y bien se vuelven a introducir en la leche o pueden almacenarse (Zudaire, 2011).

Hay ocasiones en las que la obtención de esta leche fermentada no se logra a partir de los gránulos de kéfir, a través del método descrito anteriormente, sino que se consigue a partir de una leche fermentada obtenida anteriormente a la cual se le adiciona de nuevo leche. Con este otro método nos podemos exponer a perder las propiedades beneficiosas de este producto, además de aumentar las probabilidades de contaminación por microorganismos no deseados las cuales podrían acabar con el desarrollo de patologías gástricas. Es por este motivo que la mayoría de autores recomiendan la obtención de esta bebida a partir de los nódulos de kéfir ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html)).

Según Blasco, 2000 “El kéfir de leche une los nutrientes de la leche y las ventajas de los alimentos fermentados, pero hay personas que prefieren prescindir totalmente de los productos lácteos, ya sea por motivos ideológicos o de salud”.

### 3.2.2. Kéfir de agua

Aunque el kéfir de leche es el más conocido existen otros tipos. En este caso concreto, la bebida fermentada se prepara a partir de agua, obteniéndose un refresco con un sabor a cítricos. Esta bebida es conocida en Rusia como kvas (Beltran, 1994).

Hay una diferencia física clara en este kéfir con respecto al anterior; la apariencia de estos tipos de granos es transparente, suelta y de un tono marrón claro. Su aspecto externo es el de una superficie poco rugosa y compacta, tan consistente que algunos autores lo explican con una ejemplificación; si uno de esos granos se arrojaran sobre una superficie sólida estos revotarían como si fueran elásticos. ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html)). Tal y como puede verse en la siguiente imagen (Fig. 2):



Figura 2. Aspecto físico del kéfir de agua

(<https://nutriendo-jl.blogspot.com.es/2014/05/kefir-de-agua.html>)

Otra particularidad de este tipo de kéfir es la posible adaptación sufrida a este medio, ya que se han perdido algunos de los microorganismos presentes en el kéfir de leche, encargados de la obtención del polisacárido soluble kefiran. Alguno de es *Lactobacillus kefiranofaciens*. Al igual que se han perdido ambos microorganismos también se ha reconocido al *Lactobacillus brevis*, causante de la producción de un polisacárido soluble en agua; la presencia de este sacárido puede observarse claramente cuando se cuele el agua fermentada obtenida y al dejarla reposar, se aprecia el crecimiento de este junto con los de los nódulos de kéfir ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html)).

Las propiedades de este tipo de kéfir; regeneración de la flora intestinal, ayuda en el proceso de digestión o ayuda en el tratamiento de infecciones víricas y enfermedades, son más beneficiosas que las del kéfir de agua según algunos estudios. Ya que este es laxante, relajante muscular, ayuda a la eliminación de ansiedades; por lo que su rápida asimilación ayuda en periodos de recuperación tras sufrir una enfermedad. Asimismo, es el aliado perfecto tras un gran esfuerzo físico ya que proporciona poder antioxidante y nutrientes ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_leche.htm](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_leche.htm)).

### 3.2.3. Kéfir de té o “kombucha”

La kombucha, o kéfir de té conocido en occidente, es un conjunto de microorganismos que viven en simbiosis; concretamente hablamos de tres tipos de microorganismos, la bacteria del ácido acético (*Acetobacter xylinum*) y dos tipos de levaduras, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Cándida* sp. (<http://fundacionqinti.blogspot.com>).

Estos microorganismos simbióticos crecen sobre una bebida de té azucarada fría (en la mayoría de ocasiones se utiliza té negro, verde o rojo) para no provocar la muerte de los microorganismos. El continuo crecimiento de estos microorganismos crea un círculo denso en la superficie de la solución, el cual va adquiriendo grosor con el paso de los días (<http://fundacionqinti.blogspot.com>), tal y como se muestra en la siguiente imagen (Fig. 3):



Figura 3. Crecimiento circular del kéfir de té (<https://www.comprarkefir.com>)

Con el paso de los días esta bebida va perdiendo el sabor dulce ya que el hongo consume los azúcares del té (<http://fundacionqinti.blogspot.com>).

Los microorganismos propios de este tipo de kéfir son diferentes a los descritos anteriormente en los otros tipos de kéfir. También su tipo de fermentación es diferente ya que el paso final donde el recipiente se tapa, para evitar el contacto del producto

con el exterior, no se lleva a cabo; quedándose el recipiente destapado. Lo cual le proporciona características finales propias pero también un mayor riesgo de contaminación (<http://buenasiembra.blogspot.com>).

Al ser un poco diferente a los tipos de kéfir descritos anteriormente, éste debe tomarse en pequeñas dosis al comienzo del consumo e ir aumentando poco a poco estas cantidades con el paso del tiempo (<http://fundacionqinti.blogspot.com>).

Algunas de las características propias de este tipo de bebida fermentada son: perfecto reconstituyente energético, ayuda en los problemas relacionados con el tracto respiratorio y aparato digestivo, es un perfecto aliado en la recuperación de la piel tras verse expuesta a problemas de manchas o sequedad e incluso a problemas de quemaduras, es un buen limpiador facial y aporta gran cantidad de frescura y brillo a la piel o cabello tras su uso y ayuda con las picaduras de abejas, cuando en estas se introduce el aguijón en el interior de la piel, ya que ayuda a expulsarlo y a recuperar la piel tras la picadura (<http://fundacionqinti.blogspot.com>).

Cuando se cambia muy rápidamente de medio, los estudios certifican que los granos de kéfir pierden la gran parte de sus propiedades y con ellas su capacidad de crecimiento. Además, cuando el kéfir fermenta en un medio no es prudente cultivarlo en otros espacios ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_cultivo.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_cultivo.html)).

### **3.3. Beneficios del kéfir.**

En cuanto a sus características más representativas y beneficiosas se pueden destacar:

-El kéfir es una bebida fermentada de aspecto denso y con un sabor amargo y ligeramente espumoso (Zudaire, 2011).

-Este producto ayuda en la digestión de los alimentos (Zudaire, 2011).

-Los componentes del kéfir de leche no varían mucho en cuanto a los componentes de la leche, ya que los de este son de una calidad superior (Zudaire, 2011).

-El kéfir contiene más de 40 tipos diferentes de microorganismos y vitaminas, además de otros componentes que son esenciales en diversos procesos vitales del organismo (Zudaire, 2011).

-Ayuda en la desintoxicación de patologías. Actúa como laxante, ya que libera secreciones salivales, gástricas y pancreáticas actuando directamente en los movimientos peristálticos del estómago que ayudan a la expulsión de las sustancias de deshecho (Zudaire, 2011).

-Contiene compuestos microbianos que son capaces de regenerar la microbiota intestinal y que combaten a las bacterias patógenas que crecen en el aparato digestivo, las cuales pueden producir una gran cantidad de enfermedades, como es la gastroenteritis. Además de competir con estos microorganismos, actúan sobre el sistema inmunológico (defensa) y aporta nutrientes. Colabora con la defensa al organismo, gracias a la activación del sistema inmunológico por una sustancia llamada esfingomielina (Zudaire, 2011).

Es por ello que ciertos estudios relacionan este producto con la prevención del cáncer de colon ya que el kéfir es capaz de reestablecer la microbiota intestinal propia, transformando los alimentos ingeridos en mal estado en digeribles ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html)).

Se conoce que en un régimen alimentario carnívoro se pueden depositar hasta un par de kilos de carne en mal estado en el colon, siendo clave para este caso la utilización del kéfir por sus múltiples beneficios y medios de prevención de posibles patologías relacionadas con este órgano ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html)).

Es por estas características que este producto es indicado en personas intolerantes a la lactosa. Aunque deben tomarlo en cantidades pequeñas en el inicio e ir aumentando la dosis con el tiempo para poder así habituar al organismo (Zudaire, 2011).

-Reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Zudaire, 2011).

-También puede usarse el kéfir como antiséptico bacteriano ante heridas externas (Zudaire, 2011).

-Además, se ha podido comprobar la relación directa entre su consumo y una buena respuesta ante sucesos de alergias y herpes. Característica común al yogur que contribuye a sanar infecciones genitales femeninas como la candidiasis (causada por el hongo *Cándida albicans*, crecimiento en medio ligeramente ácido) (Zudaire, 2011).

-El kéfir excita al organismo provocando en él un aspecto más luminoso, por ejemplo en el cabello y en la piel. Además de abrir el apetito (Zudaire, 2011).

-Un dato llamativo es que el kefiran, sustancia liberada por los microorganismos con el crecimiento de los granos, es un elemento clave en la conservación de algunos productos como por ejemplo los encurtidos; hasta tal punto es un buen conservante que hace innecesaria la presencia de otros como por ejemplo la sal ([http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_leche.htm](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_leche.htm)).

En cuanto a las dosis recomendadas, cada persona debe ser capaz de encontrar su dosis más conveniente. Aunque en un adulto sin ningún tipo de patología se recomienda unos 250 ml al día, mientras que en personas adolescentes, niños o personas de la tercera edad se recomienda una dosis mayor 500 ml al día. Sin embargo, cuando se utiliza para sanar alguna enfermedad es recomendable consumir un litro al día, repartido en las diferentes comidas o periodos del día. Esto siempre debe ir acompañado de una alimentación sana y equilibrada. Es necesario aclarar que este producto debe siempre tomarse junto con otros tratamientos en patologías graves y siempre bajo la supervisión de un especialista (Blasco, 2000).



#### **4. OBJETIVOS**

1. Estudio de la comunidad microbiana de tres tipos de kéfir; leche, agua y té.
2. Búsqueda de microorganismos con capacidad antimicrobiana.
3. Producción de bacteriocinas por los microorganismos aislados del kéfir.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Muestras de kéfir

El primer paso de la investigación fue la obtención de tres tipos de kéfir y posterior estudio de la comunidad microbiana de estos y su posible capacidad antimicrobiana. Para ello, hemos utilizado tres tipos de kéfir, de agua, leche y té para ver las posibles diferencias en estos y realizar una conclusión clara sobre ellos que se incluye redactada en este documento.

### 5.2 Medios de cultivo y soluciones.

Las muestras anteriores se sembrarán en distintos medios de cultivo para conocer la comunidad microbiana que los componen. Todos los medios de cultivo fueron adquiridos de la casa comercial Scharlab (España). Éstos son:

-Medio Trypticase Soy Agar (TSA):

Debido a su composición se ha convertido en un medio muy extendido, ya que crecen en él la mayoría de bacterias. Además, este medio está suplementado con sangre, lo que ayuda al crecimiento de especies bacterianas más exigentes y a la visualización de reacciones hemolíticas producidas por algunas bacterias. Su composición de reactivos por litro de agua purificada es la siguiente:

Reactivos	Peso (gramos)
Digerido pancreático de caseína	14.5
Digerido papaico de harina de soja	5.0
Cloruro sódico	5.0
Agar	14.0
Factores de crecimiento	1.5

El medio debe almacenarse en un lugar oscuro a una temperatura entre 2-25°C. No debe congelarse ni sobrecalentarse.

-Medio Trypticase Soy Broth (TSB):

Medio con las mismas características que el TSA y misma composición exceptuando la incorporación de agar, lo que lo hace un medio líquido.

-Medio MacConkey agar.

Se trata de un medio selectivo utilizado para el aislamiento y diferenciación de bacilos

Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa. Se utiliza con frecuencia para el aislamiento de coliformes. Su composición de reactivos por litro de agua destilada es:

<b>Reactivos</b>	<b>Peso (gramos)</b>
-Digerido pancreático de gelatina	17.0
Digerido pancreático de caseína	1.5
Digerido péptico de tejido animal	1.5
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	30.0
Cristal violeta	1.0

El medio debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2-25°C.

-Medio DE MAN, ROGOSA, SHARPE agar (MRS-agar):

Se trata de un medio selectivo ya que permite el crecimiento y aislamiento de Lactobacilos y otras bacterias ácido-lácticas. Su composición de reactivos en un litro de agua destilada es:

<b>Reactivos</b>	<b>Peso (gramos)</b>
Mezcla de peptona	18.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Tween 80	1.0
Fosfato dipotasio de hidrógeno	2.0
Citrato triamonio	2.0
Acetato de sodio anhidro	3.0
Sulfato de magnesio 7 H <sub>2</sub> O	0.2
Sulfato de magnesio anhidro	0.034
Agar	12.0

El medio debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2-25°C.

-Medio Yeast Malt Agar (YMA):

Este medio de cultivo es selectivo ya que es el más usado para detección de levaduras. Su composición de reactivos en un litro de agua destilada es la siguiente:

<b>Reactivos</b>	<b>Peso (gramos)</b>
Manitol	10.0
Extracto de levadura	4.0
K <sub>2</sub> POH <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub>	0.2
NaCl	0.1
Agar	15
Rojo Congo	81g/ 400 ml

De cada uno de los medios anteriores (TSA, MacConkey, MRS-agar, YMA) se prepararon 500 ml.

Por cada litro de agua se debe de adicionar 18 g de agar para preparar medios sólidos; siempre y cuando este no esté incluido en su composición.

-Solución salina 0.85%:

En este caso se ha agregado 0.85 g de NaCl en 100 ml. En 10 ml de solución salina se resuspendió 1 gramo de cada tipo de kéfir; es decir, hemos tenido finalmente tres tubos con 10 ml cada uno y un gramo de kéfir de agua en uno de los tubos, 1 gramo de kéfir de leche en otro tubo y finalmente 1 gramo de kéfir de té en el último tubo (solución madre).

-Medio Brain Heart Infusion-agar tamponado (BHA-T):

Este medio se preparó en placas de Petri y está constituido por:

<b>Reactivos</b>	<b>Peso (gramos).</b>
Fosfato dibásico	2.5
Fosfato monobásico	1.075
Agar	4.25
BHI	3.25
H <sub>2</sub> O	250 ml

-Medio Brain Heart Infusion-agar blando y tamponado (BHA-T):

Este medio se preparó en tubos a razón de 6 ml/tubo (sobrecapas) y está constituido por:

Reactivos	Peso (gramos)
Fosfato dibásico	2.5
Fosfato monobásico	1
Agar	2
BHI	3.75
H <sub>2</sub> O	250 ml

Todos los medios preparados se autoclavaron durante 15 minutos a 121°C para conseguir la esterilidad de éstos.

### 5.3. Bacterias indicadoras utilizadas

Las bacterias utilizadas como indicadoras en los ensayos de actividad antimicrobiana fueron las siguientes: *Salmonella*, *Bacillus cereus* LWL1, *Listeria Innocua*, *Enterococcus faecalis* S-47, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### 5.4. Determinación de la carga microbiana del kéfir

Para ello, se preparó una serie de diluciones seriadas a partir de las soluciones madres del kéfir, para la posterior siembra de éstas en los medios de cultivo preparados.

Se partió de la solución  $10^{-1}$ : compuesta por 1g de kéfir y 10 ml de solución salina (solución madre); de ésta se han cogido 100 µl hasta la dilución  $10^{-2}$  (con 900 µl de solución salina) y se repitió esta misma acción hasta llegar a la dilución  $10^{-6}$ .

Posteriormente, 100 µl de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  se sembraron en medio MacConkey, MRS e YMA. Y otros 100 µl de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  se sembraron en medio TSA.

En el caso del kéfir de leche, se sembrarán las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en el medio MRS-agar, ya que en las diluciones menores parecen demasiadas colonias; lo mismo ocurre con el medio YMA, en el que se sembraron las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ .

El medio TSA y MacConkey agar se incubaron a 37°C durante 48 horas y el medio YMA y MRS agar se incubaron a 30°C durante 48 horas. Con los resultados de recuento de las colonias crecidas se calculará el número de UFC/ml en cada caso.

### 5.5. Detección de la actividad antimicrobiana

Una vez obtenido el valor de UFC/ml procedimos a realizar el próximo paso, detectar la actividad antimicrobiana de las colonias crecidas de kéfir. Para ello se utilizaron medios de cultivo en distintos estados, medio sólido y medio líquido:

Se utilizaron los medios YMA y MRS agar, si han crecido colonias de la siembra de kéfir en estos. Para ello, se picaron las colonias, crecidas en los medios tras las 48 horas, y se sembraron en cruces sobre placas de YMA y MRS agar. Dichas placas se incubaron a 30°C durante 24 horas.

Pasadas 24 horas, se vertió sobre las placas sembradas en cruces una sobrecapa de 6 ml de BHT (a una temperatura aproximada de 50°C) a la que se le adicionó 60 µl de bacteria indicadora (en el caso de *Bacillus* sólo añadiremos 30 µl, ya que 60 sería una cantidad demasiado grande para este microorganismo esporulado). Posteriormente, estas placas se incubarán a 37°C durante 48 horas. Esto tiene como finalidad detectar la posible actividad antimicrobiana de los microorganismos del kéfir con la presencia o ausencia de un halo de inhibición.

### 5.6. Confirmación de la inhibición.

Las colonias resultantes con halo de inhibición deberán ser sembradas en medio TSB e incubarlas a 30°C durante 24 horas. Al día siguiente, se deberá pasar 1.5 ml de las siembras realizadas en TSB a un eppendorf para centrifugar (a 3000 rpm durante 15 minutos) y separar las células del sobrenadante. Tras la centrifugación, se procederá a recoger y almacenar el sobrenadante para su posterior utilización.

También se utilizaron placas de BHA-tamponado sobre las cuales se ha puesto unos pocillos de acero inoxidable. Tal y como se muestra en la siguiente imagen (Fig. 4):



Figura 4. Placas de Petri con pocillos de acero inoxidable.

Sobre dichas placas con los pocillos puestos, se añadió una sobrecapa de BHA-tamponado y la bacteria indicadora. Pasados unos 30 minutos, tiempo que tarda en

solidificar la sobrecapa, se retiraron los pocillos dejando un hueco en la placa lo suficientemente adecuado para verter en él 100 µl del sobrenadante anteriormente recogido. Este paso permitirá verificar la inhibición detectada anteriormente en las placas sembradas en cruz. Por ello, se utilizaron las mismas cepas de bacterias indicadoras que las que hayan dado positivo en la inhibición anterior.

### **5.7. Detección de microorganismos de interés.**

Los microorganismos con posible capacidad inhibitoria se sembraron en medio TSA para posteriormente poder ser observados al microscopio. Esta detección se hizo mediante dos tinciones:

-Tinción clásica:

Se pone una gota de agua sobre el portaobjetos y con un asa de siembra (impregnada en con la colonia que queremos identificar) se extiende dicha gota hasta que se seca. Después se fija con el calor del mechero Bunsen, se añade azul de metileno (colorante) durante dos minutos, se lava con agua destilada, se seca y ya estaría lista para observarla al microscopio con el objetivo de 100. Con esta tinción podremos diferenciar levaduras de bacterias.

-Tinción de Gram:

Con esta tinción podremos observar las bacterias obtenidas en el proceso para clasificarlas. Para ello se pone una gota de agua sobre el portaobjetos y con el asa de siembra (impregnada con la colonia de interés) se extiende dicha gota. Después se deja secar y se fija con calor. Una vez fijada, se tiñe con cristal violeta durante 2 minutos, pasado ese tiempo se tira el sobrante y se añade lugol durante 2 minutos. Después se lava el lugol con agua destilada y se decolora con etanol durante 30 segundos, enjuagando después de este con agua destilada de nuevo. Por último, se tiñe con safranina durante dos minutos y pasado ese tiempo se lava con agua destilada, se seca y ya estaría lista para observar al microscopio con el objetivo de 100. Con esta tinción podremos diferenciar bacterias Gram + (aparecerán de color violeta) de bacterias Gram – (de color rosa).

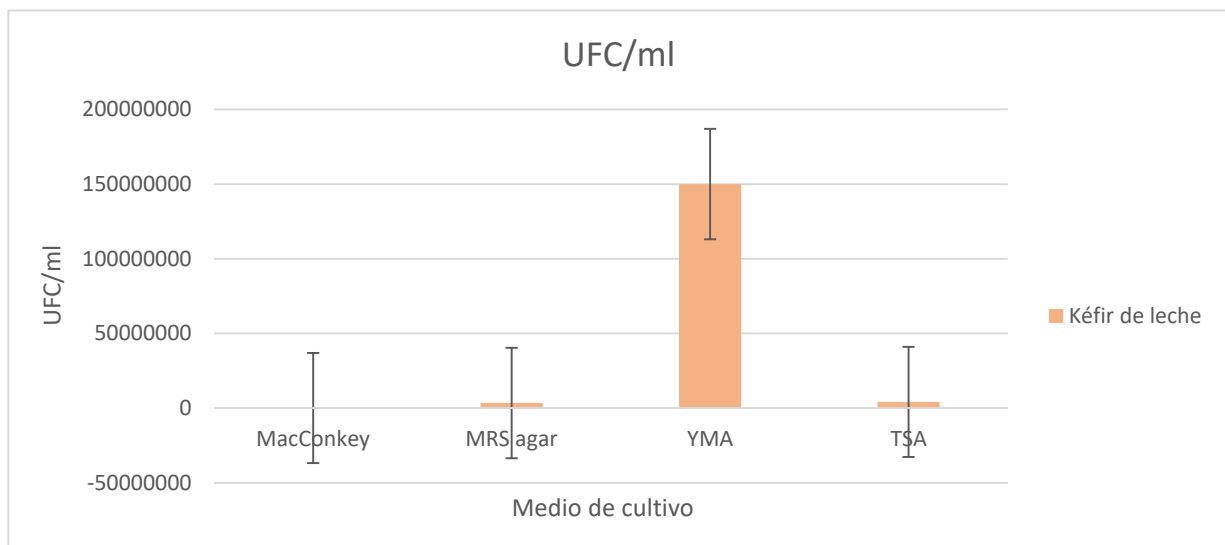
## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Determinación de la carga microbiana del kéfir.

Los resultados de los recuentos de la comunidad microbiana se muestran a continuación.

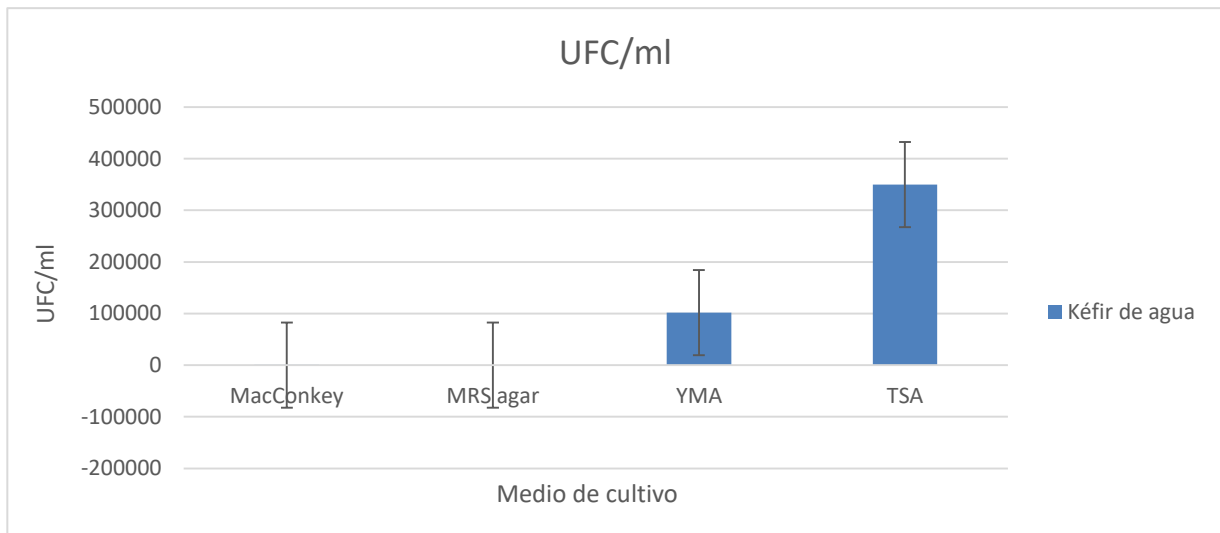
MEDIO	Diluciones	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	UFC/ ml
MacConkey	Kéfir agua	1.5	0.5	0	-	-	-	1.5* 10 <sup>2</sup>
	Kéfir leche	0	0	0	-	-	-	0
	Kéfir té	32.5	2	0	-	-	-	3.25*10 <sup>3</sup>
MRS agar	Kéfir agua	0	0	0	-	-	-	0
	Kéfir leche	+300	+300	+300	34	1.5	0	3.4*10 <sup>6</sup>
	Kéfir té	0	0	0	-	-	-	0
YMA	Kéfir agua	+300	102	10	-	-	-	1.02*10 <sup>5</sup>
	Kéfir leche	+300	+300	+300	150	1.5	-	1.5*10 <sup>8</sup>
	Kéfir té	51	0	0	-	-	-	5.1*10 <sup>3</sup>
TSA	Kéfir agua	-	-	-	3.5	2.5	0.5	3.5*10 <sup>5</sup>
	Kéfir leche	-	-	-	41.5	9.5	0	4.15*10 <sup>6</sup>
	Kéfir té	-	-	-	0	0	0	0

Tabla 2. Resultados del número de UFC/ml obtenido en los tres tipos de kéfir.

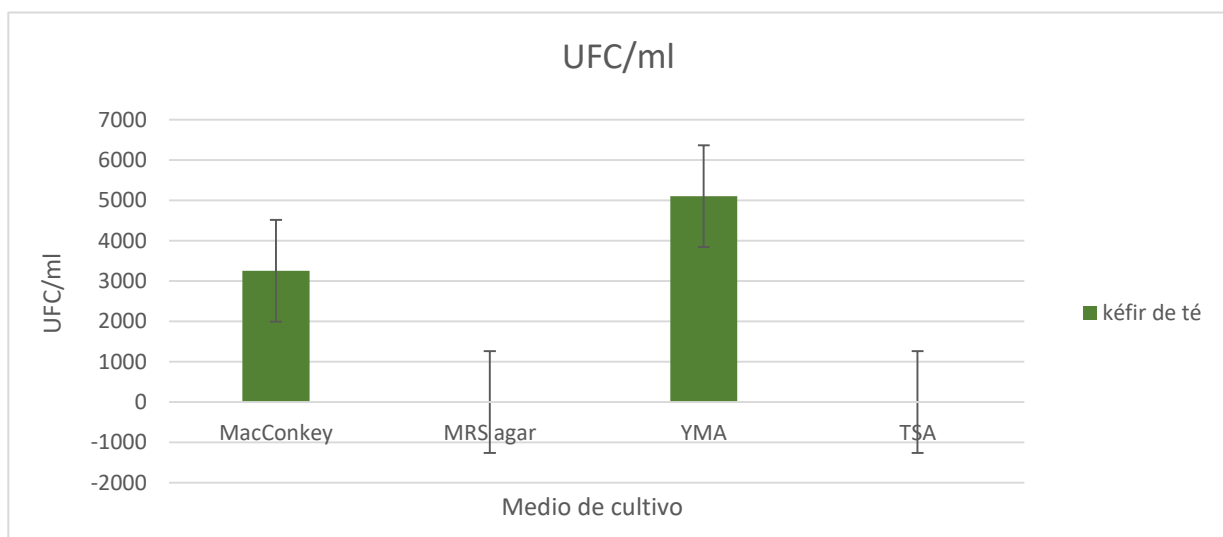


Gráfica 1. Representación del número de UFC/ml en el kéfir de leche con sus correspondientes barras de error.





Gráfica 2. Representación del número de UFC/ml en el kéfir de agua con sus correspondientes barras de error.



Gráfica 3. Representación del número de UFC/ml en el kéfir de té con sus correspondientes barras de error.

En cuanto a los resultados obtenidos se puede decir que:

-En el medio MacConkey: podemos apreciar mayor número de UFC/ml en el caso del kéfir de té, lo que supone que este tipo de kéfir tiene mayor número de enterobacterias en su composición que el kéfir de agua (Tabla 1, Gráficas 1-3). Mientras que el kéfir de leche no contiene ninguna enterobacteria en su composición (Tabla 1, Gráficas 1-3).

-En el medio MRS agar: se puede observar sólo UFC/ml en el caso del kéfir de leche, lo cual indica que sólo este tipo de kéfir contiene bacterias ácido-lácticas en su composición.

-En el medio YMA: se puede contemplar mayor número de UFC/ml en el caso del kéfir de leche, lo cual señala que este tipo de kéfir tiene mayor cantidad de levaduras que los otros dos tipos de kéfir (Tabla 1, Gráficas 1-3).

-En el medio TSA: se puede observar mayor número de UFC/ml en el caso del kéfir de leche, seguido por el kéfir de agua. Sin embargo, aunque a pesar de ser un medio de cultivo general, en el kéfir de té no presenta ninguna colonia (Tabla 1, Gráficas 1-3).

## 6.2. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Los microorganismos aislados de las placas de los medios MRS agar e YMA inoculados en cruz sobre sus respectivos medios e incubados durante 24 horas a 30°C fueron cubiertos con la sobrecapa con la bacteria indicadora y posteriormente incubados durante 24 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y presentan los distintos microorganismos que han producido halo de inhibición frente a las bacterias indicadoras. En este caso, sólo las colonias provenientes del kéfir de leche han producido sustancias antimicrobianas (Tabla 2, Figura 5).

### 6.2.1. Kéfir de leche.

Bacteria indicadora	Medio YMA	Medio MRS agar
<b>Salmonella</b>	Colonia 15 y 16	
<b>B. cereus LWL1</b>		Colonia 7
<b>L. innocua</b>	Colonia 7 y 16	Colonia 6
<b>E. faecalis S-47</b>		
<b>S. aureus</b>	Colonia 16, 17 y 18	Colonia 7
<b>E. coli</b>	Colonia 7 y 16	Colonia 7

Tabla 2. Resultados donde se muestran los halos de inhibición producidos sobre las bacterias indicadoras.



Figura 5. Fotografía en la que se puede apreciar algunos de los halos de inhibición en las muestras de kéfir de leche.

#### 6.2.2. Kéfir de agua.

Ninguna colonia, de kéfir de agua, provocó halo de inhibición frente a ninguna bacteria indicadora.

#### 6.2.3. Kéfir de té.

Ninguna colonia, de kéfir de té, provocó halo de inhibición frente a ninguna bacteria indicadora.

### 6.3. Producción de las sustancias antimicrobianas en medio líquido.

Esta prueba sólo se realizó a la muestra de kéfir de leche ya que sólo en ésta aparecieron halos de inhibición. Tras verter el sobrenadante de los cultivos de diferentes microorganismos en los pocillos, sólo se detectó inhibición para la colonia 16 frente a la bacteria indicadora *Listeria innocua* y *S. aureus*. El halo de inhibición frente a *Listeria innocua* presenta un diámetro de 15 mm y frente a *S. aureus* es de 11 mm.

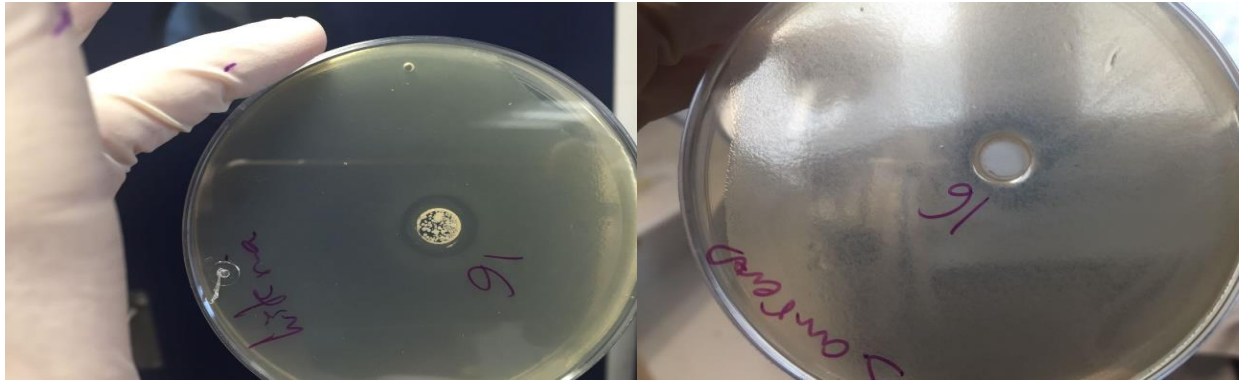


Figura 6. Fotografía en la que se muestra el halo de inhibición frente a *Listeria innocua* y *S. aureus*.

#### 6.4. Selección e identificación preliminar de microorganismos de interés.

Los microorganismos productores de sustancias antimicrobianas aislados del kéfir de leche se identificaron mediante la tinción sencilla y la tinción de Gram (Figuras 7 y 8).

##### 6.4.1. Microorganismos identificados tras la tinción clásica:

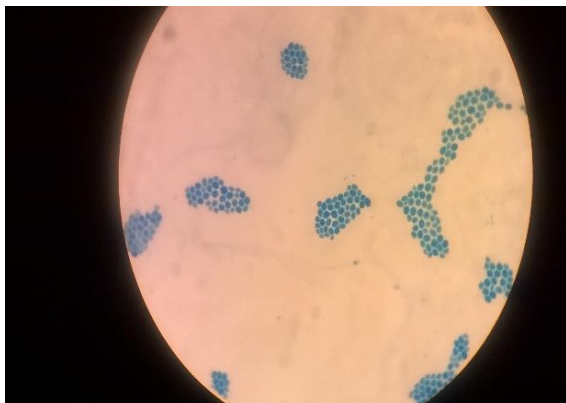


Figura 7. Imagen de Levaduras al microscopio.

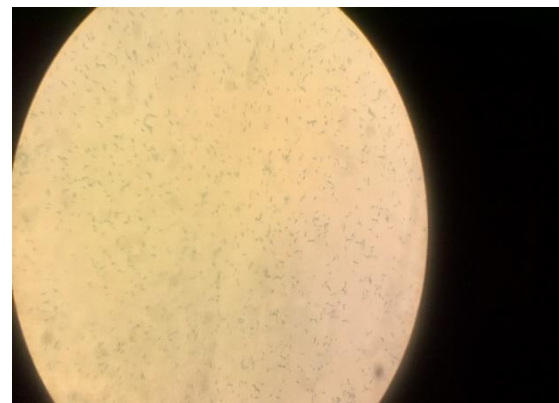


Figura 8. Imagen de Bacterias al microscopio.

Los microorganismos identificados son:

- Colonia 6: bacteria.
- Colonia 7: levadura.
- Colonia 15: levadura.
- Colonia 16: bacteria.
- Colonia 18: bacteria.
- Colonia 17: levadura.

*6.4.2. Diferenciación de las bacterias, identificadas en la tinción clásica, mediante la tinción de Gram:*

- Colonia 16: Bacilos Gram positivos.
- Colonia 18: Mezcla de bacilos y cocos Gram positivos.
- Colonia 6: Bacilos Gram negativos

## 7. DISCUSIÓN.

Hoy en día, la sociedad está interesada en consumir alimentos, que además de aportar nutrientes esenciales y necesarios, sean claves en el proceso de prevención de enfermedades. Es por ello, que los probióticos son un gran objetivo de desarrollo para múltiples empresas en la actualidad. Un ejemplo de este tipo de alimentos es el kéfir, objeto de estudio de este trabajo (Edelia et al., 2003)

El kéfir siempre ha sido relacionado con muchas ganancias nutricionales y con muchos aspectos beneficiosos sobre la salud humana. Uno de esos aspectos más importantes es su actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y hongos. (Van Wyk, 2001) Es por ello, que la principal finalidad de este trabajo es conocer la comunidad microbiana del kéfir, con el fin de obtener cepas de interés antimicrobiano.

Además de querer comprobar la posible actividad antimicrobiana, también se ha querido comprobar si esta posible acción varía entre las tres variedades de kéfir; de agua, de té y de leche, el más conocido popularmente.

En cuanto al estudio de la comunidad microbiana constitutiva de cada tipo, podemos concluir que el kéfir de leche es el único con presencia de bacterias ácido lácticas, el único que no contiene ningún tipo de enterobacteria y el que contiene mayor cantidad de levaduras. Dato significativo y distintivo con respecto a los otros dos tipos de kéfir, agua y té.

Esta composición bacteriana, propia del kéfir de leche, podría ser la responsable de proporcionarle la capacidad inhibitoria observada en este trabajo. Hablamos de una inhibición resultante frente a bacterias indicadoras como *Salmonella*, *Bacillus cereus* LWL1, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Comprobándose frente a *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus* un halo de inhibición mayor o igual a 15 mm de diámetro.

Un dato interesante de este estudio es que sólo se puede comprobar actividad antimicrobiana en el caso del kéfir de leche. Ya que las colonias procedentes de las muestras de kéfir de té y de agua no produjeron ningún tipo de inhibición, a pesar de que se siguió el mismo procedimiento que en el caso del kéfir de leche. Además, para estos dos tipos de kéfir se realizó un segundo ensayo con mayor número de réplicas para verificar que no producían actividad inhibitoria frente a bacterias.

## **8. CONCLUSIÓN.**

Con este ensayo, se puede entender el auge actual de los probióticos en las industrias y comercios actuales; ya que cada vez es mayor su presencia en nuestros alimentos cotidianos. El kéfir es un claro ejemplo de este tipo de alimentos. Éste es ya un indudable constituyente de algunos yogures o derivados lácteos comercializados en grandes cadenas de supermercados, en el caso del kéfir de leche. Aunque este tipo sea el más conocido, también se puede encontrar el kéfir de té formando parte de infusiones naturales, o el kéfir de agua enriqueciendo con sus propiedades a la bebida más esencial e importante nuestro organismo, el agua. Es por ello, que en este ensayo se ha trabajado con estos tres tipos de kéfir para ver posibles diferencias entre ellos. Después de múltiples ensayos y resultados se puede definir el kéfir como producto natural reconocido por sus múltiples beneficios descritos y estudiados (producción de sustancias bactericidas), siendo este estudio un perfecto aliado en su consumo, sobre todo para el kéfir de leche ya que es el único en el que se ha podido comprobar actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos comunes. Por último, se ha de decir que este ensayo podría dotar de mayor confianza al consumidor sobre las ayudas que otorga dicho producto natural sobre nuestro organismo.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, M., Carvajal, M., Ruisánchez, N. et Rojo, F. 2000. Aductos AND-Aflatoxina como bioindicadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. Rev Cubana Oncol 16, 35-39.
- Blasco, M. kéfir, un yogurt para rejuvenecer, op cit, 101 p.
- Boldrini, G. 2009. Consumo de kéfir y frecuencia evacuatoria. Tesis de licenciatura. Universidad Fasta, Facultad de Ciencias de la Salud.
- Edelia, B., Gómez, M., Jiménez-Salas, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. Facultad de Salud Pública y Nutrición. Universidad Autónoma de Nuevo León. Vol 4 No. 2.
- Garrote, G. 1999. Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kéfir. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de química, Departamento de Ciencias Biológicas. 168 p.
- Helander et al. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gramnegative bacteria, Trends in Food Science and Technology I, 8: 146–150.
- <http://buenasiembra.blogspot.com>. El kéfir de té, kombucha.
- <http://fundacionqinti.blogspot.com>. Fundación Q'inti. Organización Promotora de Actividades Educativas, Desarrollo y Bienestar Social sin fines de lucro.
- [http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_bebida.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_bebida.html). La bebida del kéfir de leche.
- [http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_cultivo.html](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_cultivo.html). El cultivo del kéfir.
- [http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir\\_leche.htm](http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefir_leche.htm). Kéfir, un cultivo de la leche, introducción al kéfir de leche.
- <http://perso.wanadoo.es/nutriobiota/kefiragua.htm>. Refresco probiótico reconstituyente, la bebida kéfir de agua.
- <http://www.botanical-online.com/kefir.htm>
- <http://www.ecoaldea.com/alimentacion/kefir.htm>. Beltran, J. Fitoterapia para cada dolencia, el kéfir.
- <http://www.fagella.com.ar>. Fagella, R. Alguien nos habla del kéfir.
- <http://www.ifeelmaps.com>. 2012. El kéfir una bebida curativa, sus propiedades y trucos para cuidarlo.
- <https://es.wikipedia.org>. 2012. Kéfir.
- <https://nutriendo-jl.blogspot.com.es/2014/05/kefir-de-agua.html>
- <https://www.alimentacion-sana.com.ar>. 2012. El kéfir, hongo curativo.



-<https://www.comprarkefir.com>

-Ricardo et al. 2009. Efecto Antagónico del Kefir sobre Endosporas y Células Vegetativas de *Bacillus Cereus* y *Clostridium Perfringens*. Depto. de Ciencias Básicas. Depto. de Tecnología. Buenos Aires, Argentina.

-Said, G. 2014. Influencia del fotoperiodo sobre algunos parámetros demográficos y calidad de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*). Capítulo: Caracterización e identificación molecular de bacterias aisladas del kéfir. Vol 7.

-Velasco, M. 2012. Evaluación de quesos semimaduros con la utilización de fermento casero (kéfir). Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuarias. Escuela superior politécnica de Chimborazo.

-Yang, Y., Shevchenko, A., Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Xingjun, H., Changsui, X., Wang, Ch. et Shevchenko, A. 2014. Proteomics evidence for kéfir dairy in Early Bronze Age China. *J.Archaeol Sci* 45, 178-186.

-Zudaire, M. 2011. El kefir refuerza las defensas.