



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

LEVADURAS AISLADAS DE ATOLE AGRIO
DE MAÍZ ELABORADO EN SAN ANDRÉS
TZICUILAN, CUETZALÁN, PUEBLA, MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)**

P R E S E N T A

GRACIELA ARCE ROCHA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MIGUEL ARMANDO ULLOA SOSA

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me otorgó durante 23 meses para la realización de esta tesis (No. de becario: 189056).

Agradezco a los miembros del Comité tutorial por su constante paciencia, enseñanza, estímulo y corrección:

Tutor principal: Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa.

Miembro del comité tutorial: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Miembro del comité tutorial: M. en C. Miguel Ángel Martínez Alfaro.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y autoridades del Instituto de Biología por brindarme el espacio y los materiales para la realización de mi trabajo profesional.

A la Dra. Patricia Esther Lappe Oliveras por su constante enseñanza y corrección durante el aislamiento, identificación y conservación de los microorganismos obtenidos y por la revisión de esta tesis.

A los miembros del jurado que revisaron este trabajo:

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco.

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte.

Dr. Miguel Armando Ulloa Sosa.

Dr. Teófilo Herrera Suárez.

M. en C. Miguel Ángel Martínez Alfaro.

A la M. en C. Laura Márquez por la obtención de las secuencias de pares de bases de nucleótidos de cada uno de los aislados de levaduras seleccionados.

Al Biól. Samuel Aguilar Ogarrio por su valiosa colaboración en la toma de fotografías de las colonias gigantes de levaduras.

A la Biól. Concepción León Cano por su inapreciable ayuda en la digitalización de fotografías y formato de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la UNAM y en general a todos los que de una u otra forma colaboraron conmigo.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Antecedentes	3
I. 1. Características del atole agrio.....	3
I. 1. 1. Definición, origen y tradición.....	3
I. 1. 2. Forma de preparación del xokoatol y el axokot.....	5
I. 1. 3. Microorganismos presentes en el atole agrio.....	7
I. 2. Clasificación e identificación de levaduras.....	8
I. 2. 1. Criterios tradicionales.....	8
I. 2. 2. Identificación molecular de levaduras.....	9
II. Objetivos	10
III. Materiales y métodos	10
III. 1. Elaboración del atole agrio.....	13
III. 2. Obtención de muestras.....	16
III. 3. Medición de parámetros fisicoquímicos.....	16
III. 4. Aislamiento de la micobiota.....	18
III. 5. Identificación de los aislamientos de levaduras.....	19
IV. Resultados y Discusión	21
V. Conclusiones	32
6. Literatura citada	51

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Mapa 1. San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Sierra Norte del Estado de Puebla....	14
Diagrama de flujo 1. Proceso de elaboración del atole agrio estudiado.....	15
Cuadro 1. Fases muestreadas del proceso de elaboración y fermentación del atole agrio, técnicas y medios de cultivo utilizados en el estudio de su micobiota.....	17
Cuadro 2. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras (Yarrow, 1998).....	20
Cuadro 3. Recuento total de microorganismos (ufc/ml) aislados de atole agrio y de las materias primas con las que se elabora.....	33
Cuadro 4. Identificación morfofisiológica de aislados de levaduras obtenidos de nixtamal molido.....	34
Cuadro 5. Identificación morfofisiológica, molecular y polifásica de aislados de levaduras obtenidos de nixtamal molido.....	36
Cuadro 6. Identificación morfofisiológica, molecular y polifásica de aislados de levaduras obtenidos de atole agrio.....	37
Cuadro 7. Resultados de asimilación de algunos carbohidratos, compuestos de nitrógeno y tolerancia a 10% de NaCl en los aislados de <i>Candida pararugosa</i> diferentes a los presentados en las diagnósis de de las monografías de Barnett <i>et al.</i> , (2000) para <i>C. pararugosa</i> y <i>C. rugosa</i>	38
Cuadro 8. Resultados de asimilación de algunas carbohidratos y compuestos de nitrógeno en los aislados de <i>Candida intermedia</i> diferentes a los presentados en la diagnósis de las monografías de Barnett <i>et al.</i> , (2000).....	39
Cuadro 9. Resultados de asimilación de algunas carbohidratos en los aislados de <i>Candida parapsilosis</i> diferentes a los presentados en la diagnósis de las monografías de Barnett <i>et al.</i> , (2000).....	39
Cuadro10. Secuencias de bases de aislados de levaduras obtenidos a partir de maíz nixtamalizado molido y de atole agrio de maíz.....	40
Fig. 1-2. San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Puebla, México.....	47
Fig. 3-13. Elaboración del atole agrio de maíz estudiado.....	47

Fig. 14. Habitante de San Andrés Tzicuilan con la planta <i>Ageratum</i> <i>corymbosum</i>	48
Fig. 15. Cántaros con atole de maíz en proceso de fermentación.....	48
Fig. 16. Atole agrio de maíz servido en vasos.....	48
Fig. 17. <i>Candida pararugosa</i>	49
Fig. 18. <i>Candida famata</i> var. <i>famata</i>	49
Fig. 19. <i>Candida intermedia</i>	49
Fig. 20. <i>Candida parapsilosis</i>	49
Fig. 21. <i>Candida tenuis</i>	49
Fig. 22. <i>Pichia galeiformis</i>	49
Fig. 23. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
Fig. 24. <i>Cryptococcus curvatus</i>	49
Fig. 25,27. <i>Cryptococcus curvatus</i>	50
Fig. 26,28. <i>Trichosporon cutaneum</i>	50
Fig. 29. <i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	50
Fig. 30. <i>Cryptococcus</i> sp.....	50
Fig. 31. <i>Kloeckera apiculata</i>	50
Fig. 32. <i>Cryptococcus albidus</i>	50

Resumen.

El atole agrio de maíz es una bebida ceremonial que se elabora por la población náhuatl y mestiza en San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, en la Sierra Norte del estado de Puebla. El principal objetivo de este trabajo fue cuantificar, aislar, identificar y conservar las especies de levaduras presentes en cada una de las etapas de elaboración y fermentación del atole agrio, utilizando los métodos tradicionales, así como corroborar, mediante la secuencia de bases del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr, la identidad de algunos aislados seleccionados. Se determinó la microbiota presente en las materias primas utilizadas para elaborar el atole (pasta de hierba con cal y maíz nixtamalizado molido) así como en tres muestras de atole en diferentes tiempos de fermentación. En la pasta de hierba con cal no se encontraron microorganismos. De nixtamal molido se obtuvieron 1.04×10^4 ufc/g, de las cuales se aislaron 51 cepas que correspondieron a: *Candida pararugosa* (26), *Candida famata* var. *famata* (1), *Candida intermedia* (3), *Candida parapsilosis* (3), *Candida* sp. afín a *C. tenuis* (1), *Pichia galeiformis* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Cryptococcus curvatus* (2), *Trichosporon cutaneum* (3), *Cryptococcus* sp. afín a *Cr. curvatus* (1) y 9 aislados de mohos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium*. El atole que se preparó en el cántaro 1 (muestra 1) no fermentó adecuadamente, el pH alcalino de 9.5 se mantuvo por 34 h, hasta que después de 48 h disminuyó a 7.5. Esto posiblemente se debió a un exceso de cal en la preparación, además la olla utilizada era nueva, lo que produjo el desarrollo de una escasa diversidad de especies de levaduras. Se recolectaron muestras de este atole a las 0, 3, 6, 9, 11, 24, 34 y 48 h de fermentación. Por otro lado, de los atoles de los cántaros 2 (muestra 2) y 3 (muestra 3) se tomaron muestras hasta las 72 h de fermentación, con un pH ácido de 4.3. De la muestra 1 se aislaron 5 especies de levaduras: 2 cepas de *Cryptococcus usbekistanensis*, un aislado del tiempo 0, esto es, del atole recién agregado a la olla de fermentación (4×10^2 ufc/ml) y el otro aislado del tiempo 2, después de 6 h de fermentación (1.1×10^3 ufc/ml), *Candida parapsilosis* (3×10^3 ufc/ml) y *Cryptococcus* sp. (4×10^2 ufc/ml) durante el tiempo 4, después de 11 h de fermentación, *Cr. albidus* (9×10^3 ufc/ml) del tiempo 5, después de 24 h de fermentación, y 52 aislados de mohos pertenecientes a los géneros arriba mencionados obtenidos a lo largo de las 48 h de fermentación. Después de 72 h de fermentación, de la muestra 2 se aislaron dos cepas de la levadura *Kloeckera apiculata* (4×10^2 ufc/ml) y 29 aislados de mohos que correspondieron a los géneros anteriormente citados y de la muestra 3, se obtuvieron 18 cepas de mohos, también de los géneros antes mencionados. No se conoce aún de donde provengan los microorganismos responsables de la fermentación de la bebida; ya que la temperatura a la que se termina de cocinar el atole y es agregado al cántaro es de 80°C. Es posible que el inóculo inicial provenga de la olla, pudiendo servir de protección para los microorganismos en contra de la temperatura y de las hojas de plátano que cubren la boca del cántaro. En general, en las muestras de atole se obtuvieron pocos aislados de levaduras, correspondiendo a las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , posiblemente porque el pH del medio de cultivo utilizado, PDA (papa-dextrosa-agar), fue de 3.0, lo que inhibió el crecimiento de microorganismos. Además en el cántaro 1, utilizado por primera vez, (muestra 1) se mantuvo un pH alcalino (pH 9.5-8.5).

Abstract

The consumption of sour maize gruel in México is widely spread among the indigenous and mestizo people in rural areas. Because of the shortage of potable water, this beverage is sometimes consumed as a substitute for water in San Andrés Tzicuilan, small village located in municipality of Cuetzalan, in the northern part of the state of Puebla, México and it is prepared as follows:

Maize is boiled for 1h in water in the presence of 1% calcium hydroxide, thus producing the "nixtamal", which is left overnight. Maize grains are then washed and ground until a dough is obtained. One kilogram of dough is dissolved in 1 lt of water, and is added to the 20 lt of boiling water. The mixture is stirred with a wood stick about 15 min until a thick mixture is obtained. Meantime, is elaborated a paste made with calcium hydroxide and leaves of a weed *Ageratum corymbosum* Zucc. ex Pers. that is dissolved in little water. When the gruel mix is ready, it is poured into the clay container, a bunch of firing charcoal and the paste of a weed and lime is added, and the top of the clay pot is covered with banana-like leaves. After 48 h of fermentation the gruel loses its thick consistency and an alcoholic and refreshing taste is obtained.

The main objectives of this work were the quantification, isolation, identification and conservation of yeasts present in different stages of the sour gruel fermentation using traditional methods, and corroborated through rDNA sequencing of D1/D2 motif of the 26S gene the identity of some selected strains.

The dough and paste of weed and lime were analysed. Not isolated obtained from paste. Fiftyone strains (1.04×10^4 cfu/g), were identified from dough as *Candida pararugosa* (26), *Candida famata* var. *famata* (1), *Candida intermedia* (3), *Candida parapsilosis* (3), *C. tenuis* (1), *Pichia galeiformis* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Cryptococcus curvatus* (2), *Trichosporon cutaneum* (3), *Cryptococcus* sp. relation by affinity with *Cr. curvatus* (1) and 9 strains of molds belonging *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Cladosporium* genera. Samples of the gruel fermentation were taken at 0, 3, 6, 9, 11, 24, 34 and 48 h from clay pot one. The species identified were *Cryptococcus usbekistanensis* (4×10^2 and 1.1×10^3 cfu/ml), *Candida parapsilosis* (3×10^3 cfu/ml), *Cryptococcus* sp. (4×10^2 cfu/ml), *Cr. albidus* (9×10^3 cfu/ml) and 52 strains of molds belonging the similar genera mentioned above. After 72 h of fermentation, was isolated *Kloeckera apiculata* (4×10^2 cfu/ml) and 29 strains of molds from clay pot two. From clay pot three, were isolated 18 strains of molds. It is not clear yet where the microorganisms, which conduct the fermentation, come from because a high temperature is maintained during the first hour of fermentation. It is possible that the initial inoculum may come from the clay pot that could be a shelter for the microorganisms against high temperatures and banana-like leaves who covered the top of the clay pot.

I. ANTECEDENTES

I. 1 CARACTERÍSTICAS DEL ATOLE AGRIO

I.1.1 Definición, origen y tradición

Desde hace varios milenios el maíz no sólo ha sido el principal alimento de las culturas mesoamericanas sino también parte fundamental de su vida espiritual. Hasta el momento, este cereal sigue siendo el alimento básico de la mayoría de los países latinoamericanos y sus grupos indígenas. En México, para los nahuas, el **teozintli**, “maíz de los dioses”, es una planta alimentaria, vinculada con su vida social y cultural , representa un alimento sagrado dentro de su religión y refleja la manera en como perciben el mundo (Lappe, 1988; Viniegra, 1993; Castillo, 2000). En localidades de la Sierra Norte del estado de Puebla el maíz se siembra y consume por todos los grupos indígenas, cosechándolo dos veces al año. Los nahuas identifican cuatro variedades de maíz: **istaktaol**, maíz blanco; **kostiktaol**, maíz amarillo; **yawuitaol**, maíz azul o morado, y **cikataol**, maíz rojo, cada una con distinta importancia y usos diversos, como el maíz rojo, que está relacionado con el mito del origen del maíz y se usa como medicina para curar “el mal de orín” y “los calambres” (CEPEC, 1994; Castillo, 2000). Con el maíz se elaboran infinidad de alimentos y bebidas, por ejemplo en el municipio de Cuetzalan, y sus comunidades aledañas, se preparan las tortillas de masa (**taskal**), los tamales (**tamal**), los diferentes tipos de atoles de masa (**tisti**), el pinole, que se hace con maíz tostado, pulverizado y endulzado, las galletas de maíz con panela (**totopoc**) y bebidas fermentadas como los atoles agrios (**xokoatol** y **axokot**), consumidos

con fines alimentarios, religiosos, estimulantes y medicinales. El atole agrio es una bebida refrescante de consumo diario, sobre todo en sustitución del agua potable, cuando ésta escasea. Principalmente se elabora en diversas festividades con propósitos ceremoniales. En náhuatl se emplea la palabra **xokok** para designar cualquier producto agrio o ácido. Igualmente, este término se usa para nombrar los alimentos fermentados o la acción misma de “poner algo a agriar” (**xokoltia**). Por eso, la palabra **xokok** se usa como raíz para nombrar los dos tipos de atoles fermentados que se preparan en estas comunidades de la Sierra Norte Poblana (Cruz Ulloa y Ulloa, 1973; Valderrama y Ramírez, 1993; CEPEC, 1994; Castillo, 2000; Nava-Guzmán *et al.*, 2000). El **xokoatol** se prepara en comunidades de la Sierra Norte de Puebla como Zacapoaxtla, Xochitlán de Vicente Suárez, San Miguel Tzinacapan y Santiago Yancuitalpan; en San Andrés Tzicuilan, que es una localidad perteneciente al municipio de Cuetzalan, se prepara el **axokot**. En Zapotitlán de Méndez, que es una comunidad principalmente totonaca, se prepara el atole agrio, que en su idioma se llama **xcu'talhtu'quit**. En Zacatlán de las Manzanas no se ha registrado la preparación de ninguna de las dos bebidas. Para algunos grupos culturales la fermentación es la destrucción de algo vivo para crear nueva vida, y para muchas etnias las bebidas fermentadas son algo valioso para ofrecer, pues la mayoría de las veces se consumen en condiciones de ritual o fechas especiales. La textura suave del líquido fermentado es algo que agrada, el sabor dulzón y el olor seco son también importantes. Entre curanderos tepehuas, totonacos y otomíes de la Sierra Norte de Puebla se han recabado datos vagos y esporádicos sobre los productos fermentados como un vehículo ideal para entrar en un estado cercano a lo divino (Martínez, 1993).

I. 1. 2 Forma de preparación del **xokoatol** y el **axokot**

En 1993, Valderrama y Ramírez mencionan que en Cuetzalan el **xokoatol** se elabora con maíz martajado en metate y fermentado en una olla durante una noche cerca del fogón (15 horas aproximadamente). Esta pasta fermentada se repasa en el metate y se agrega a una olla que contiene atole de masa; enseguida la mezcla se endulza con piloncillo, se calienta y se mueve constantemente hasta que espese. Su sabor es agridulce, parecido al del tamarindo. En San Miguel Tzinacapan, el **xokoatol** se prepara con maíz seco, que le confiere mejor sabor a la bebida (comunicación personal de Teresa Domínguez, San Miguel Tzinacapan), el cual se machaca en el metate; la pasta obtenida se disuelve en un poco de agua y se deja agriar de 12 a 24 horas. Posteriormente la masa agria se muele finamente, se disuelve en agua, se hierve y se endulza con piloncillo. En Zapotitlán de Méndez la masa que se deja agriar se hace con granos frescos de elote. El **xokoatol** se toma frío o tibio, en cualquier día, pero sobre todo se acostumbra en la celebración de la Semana Santa. El mayordomo de “la muerte de Cristo” reparte el atole entre quienes representan a los doce apóstoles el jueves santo y además convida con esta bebida a los muchos visitantes que pasan por su casa (CEPEC, 1994). En Cuetzalan, el **axokot** es de color verdoso, ya que el fermentado de maíz se mezcla con una hierba conocida como **axokoxiuit**, “la hierba del **axokot**” o **sopelikxiuit**, “hierba dulce” (*Lippia dulcis*), la cual da un sabor dulce a la bebida. La preparación comienza con la nixtamalización del maíz (de la etimología náhuatl **nixte** = ceniza, y **tamalli** = masa cocida). Se hierve el maíz en agua por 1 h, con un poco de cal, después se

enjuaga y se deja reposar en agua limpia durante toda la noche. Posteriormente los granos de maíz son lavados para eliminar el exceso de cal y el hollejo, y molidos hasta obtener una masa. Un kg de masa se disuelve en 1 lt de agua, se añaden 20 lt de agua hirviendo y se cocina durante 15 min hasta obtener un atole de consistencia espesa. Previamente se unta el interior de un cántaro de barro de boca ancha, que sólo se destina para este fin, el **axokokomit**, con una pasta hecha con “hierba dulce” y cal. Cuando el atole de masa está listo se vacía en el cántaro, se agregan 4 brazas de carbón ardiendo, con el fin de evitar que le “hagan ojo” al **axokot**, y se tapa con hojas verdes de plátano. El cántaro se coloca sobre una cama de hojas secas y costales, que cubren los costados formando una cubierta térmica. Después de 48 h de fermentación el atole ha perdido su consistencia espesa y adquiere un sabor ácido, alcohólico y refrescante. Algunas familias cubren el cántaro con las enaguas de lana negra de la señora de la casa, ya que así “agarra” más sabor el fermentado. Existe la creencia de que durante el tiempo que dura la fermentación la persona que lo elaboró no debe ir al baño, pues de lo contrario el **axokokomit** toma el sabor a excremento (Valderrama y Ramírez, 1993; Nava-Guzmán *et al.*, 2000). Por otro lado, el **axokot** que se consume en San Andrés Tzicuilan y Zacatipan, se prepara con la hierba *Ageratum corymbosum*, la cual es molida en metate y mezclada con un poco de cal; esta pasta se disuelve en agua, una parte se vierte en las paredes interiores del cántaro y otra se reserva para después agregarla al atole. Posteriormente se muele en el metate 1 kg de maíz nixtamalizado y enjuagado, el cual se cocina de 15 a 20 min, mezclándose con 10 lt de agua; se calientan hasta formar un atole de masa, se vierte en el cántaro, se le adiciona la pasta de la hierba disuelta en agua

y brasas de carbón ardiente, se tapa con hojas verdes de plátano y saúco, y después se coloca sobre una cama de aserrín, cubierto totalmente con prendas de vestir. Se deja fermentar 48 h en la esquina de una habitación. Más que un atole se dice que es una “agua agria”; la Sra. Rosa María López, de San Andrés Tzicuilan, comenta que también se le llama a esta bebida “axocopedos”, por su olor característico a excremento. La bebida es consumida en las fiestas del 30 de noviembre, de San Andrés Apóstol, altamente apreciada por los danzantes, y elaborada por la familia cuyo miembro funge como mayordomo en ese año.

I. 1. 3 Microorganismos presentes en el atole agrio

En el atole agrio, durante el tiempo de fermentación se desarrolla una microbiota mixta que incluye levaduras, mohos, bacterias lácticas y lácticas amilolíticas, que realizan una fermentación láctica – alcohólica – acética. A la fecha, de la compleja microbiota existente en esta bebida, se han caracterizado especies de bacterias lácticas, *Lactobacillus confusus* y *Weisella confusa*, el bacilo esporulado *Bacillus halodurans*, y especies de levaduras; *Candida oleophila*, *C. pararugosa* y *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* (Nava-Guzmán *et al.*, 2000), que la mayoría de las veces producen, por medio de enzimas, cambios favorables en el producto final, como variación en la textura, el olor y el sabor, aumentos en el tiempo de almacenamiento (preservación) y el mejoramiento de las propiedades nutritivas, debido al incremento de proteínas y vitaminas (Lappe y Ulloa, 1989). La masa o maíz agriado sufre una fermentación tipo láctica, esto es, los azúcares del maíz se convierten en ácido láctico por el efecto enzimático de los

microorganismos. Este tipo de fermentación preserva el alimento porque evita el desarrollo de microorganismos patógenos o que provoquen la descomposición del mismo (Valderrama y Ramírez, 1993). Sin embargo, hasta ahora hay poca información concerniente a los aspectos microbianos, químicos y nutricionales del atole agrio, por lo que no ha podido establecerse cuál es la importancia de las bacterias lácticas, lácticas amilolíticas, levaduras y mohos durante la fermentación, y el papel que juega cada uno de estos grupos microbianos en los cambios químicos que se realizan en la bebida durante la fermentación (Cruz Ulloa y Ulloa, 1973; Valderrama y Ramírez, 1993; Nava-Guzmán *et al.*, 2000).

Es importante estudiar los alimentos tradicionales fermentados mexicanos, prontos a desaparecer, desde los puntos de vista taxonómicos, microbiológicos, químicos, nutricionales, médicos y antropológicos. Del resultado de dichas investigaciones se podrían implementar procesos de fermentación controlados para la industrialización de alimentos higiénicos y de buena calidad. Así como la obtención de sustancias útiles derivadas de las fermentaciones o de los microorganismos responsables de las mismas.

I. 2 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

I. 2. 1 Criterios tradicionales

Para la identificación de levaduras se realizaron las pruebas señaladas en la metodología de van der Walt y Yarrow, (1984) y Yarrow, (1998). Se siguieron las claves taxonómicas y se cotejaron las descripciones de cada una de las especies

en los tratados de Kreger-van Rij, (1984), Barnett *et al.*, (1990); Kurtzman y Fell, (1998) y Barnett *et al.*, (2000).

I. 2. 2 Identificación molecular de levaduras

Entre cepas de levaduras de una misma especie pueden presentarse variaciones morfológicas o diferencias fisiológicas en las pruebas de fermentación y asimilación de diferentes fuentes de carbono y de nitrógeno (Vaughan-Martini *et al.*, 2000, citado por Moreno-Terrazas, 2005). Por ello para corroborar los resultados morfo-fisiológicos, y para minimizar el tiempo utilizado en la identificación, actualmente se han implementado diversos métodos moleculares de tipificación genética. Entre ellos destaca la secuenciación de regiones conservadas de genes específicos como las 5.8S, 18S, 26S e ITS, además de las similitudes o diferencias entre otras macromoléculas de las células (ARN, proteínas, polisacáridos y lípidos) para identificar y conocer las relaciones evolutivas entre diferentes especies (Ludwig y Schleifer, 1994, citado por Moreno-Terrazas, 2005).

II. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son:

1. Establecer en detalle las fases de elaboración del atole agrio de maíz **axokot**, que en náhuatl significa agua agria.
2. Cuantificar, aislar e identificar las especies de levaduras aisladas de cada una de las etapas de elaboración de esta bebida, utilizando los métodos tradicionales.
3. Corroborar mediante la secuencias de bases del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr la identidad de las especies de levaduras aisladas.

III. METODOLOGÍA

Antes de realizar el muestreo *in situ* del atole agrio y determinar su proceso de elaboración, se aplicó la siguiente metodología etnobotánica:

Trabajo de campo. Se visitaron localidades de la Sierra Norte de Puebla (Zacapoaxtla, Xochitlán de Vicente Suárez, Zapotitlán de Méndez, Zacatlán de las Manzanas, Cuetzalan del Progreso, San Miguel Tzinacapan, San Andrés Tzicuilan y Santiago Yancuitlalpan).

Se entrevistaron a informantes no conocidos con anterioridad, estableciendo un único y primer contacto, y a otros informantes ya conocidos, algunos de los cuales nos refirieron con familiares y amigos intracomunales o extracomunales. Se aplicó la entrevista abierta, registrada en grabadora de cintas magnetofónicas y la encuesta como un tipo de interrogatorio formal con el fin de obtener información sobre la elaboración, fermentación, usos e importancia del atole agrio para las personas que lo consumen (Gispert *et al.*, 1976; Hernández, 1985; Martínez-Alfaro, 1993). Se estableció contacto con una familia de San Andrés Tzicuilan, que en una segunda visita nos permitió observar el proceso de elaboración del atole agrio, así como realizar el muestreo en los tiempos de fermentación establecidos. Se colectó material botánico (planta con la que se elabora el atole agrio) al cual hicieron referencia los informantes en las entrevistas, para su conservación y posterior determinación.

Trabajo de gabinete. Se transcribieron las entrevistas, realizando un análisis preliminar seleccionando aspectos particulares en los que se necesitó ahondar, para realizar preguntas específicas a los informantes ya contactados, Se llevó a

cabo la búsqueda bibliográfica de la zona bajo estudio y se determinó el material botánico colectado.

Zona de muestreo. La Sierra Norte de Puebla limita al norte con la región del declive del Golfo de México, al sur con la región de los llanos de San Juan, al este con el estado de Veracruz, al oeste con el estado de Hidalgo, y al suroeste con el estado de Tlaxcala. Forma parte de la Sierra Madre Oriental y se extiende en la zona norte del estado, desde Metlatoyuca hasta Tetela de Ocampo, limitando la llanura costera del Golfo de México. Esta sierra es notable por su escabrosidad, por sus profundas depresiones y por sus numerosos saltos y cascadas. Su altitud varía de 1 000 a 3 000 metros sobre el nivel del mar. La Sierra Norte conforma, a su vez, las serranías de Teziutlán, Tlatlauquitepec, Zacapoaxtla, Tetela, Chignahuapan, Zacatlán y Huauchinango. El clima es frío en sus partes más altas y templado lluvioso, todo el año, en verano o en otoño por la influencia de los ciclones del Golfo de México en las partes medias bajas. La vegetación es variada, desde bosques de pino-encino, bosques caducifolios, bosques de enebro-encino a exuberante vegetación semitropical, donde la neblina frecuentemente invade el ambiente (Ruiz, 1991, Castillo, 2000). No obstante que la Sierra Norte de Puebla posee una gran riqueza de recursos naturales y que en ella se concentra una buena parte de la actividad agrícola, también es una de las regiones con más altos índices de marginación (Castillo, 2000). Los indígenas, en su mayoría nahuas y totonacos, destinan su fuerza de trabajo a la producción de maíz, frijol, chile, tomate, café, pimienta, naranja, plátano, mamey, mandarina, limón, cacahuete y caña de azúcar (Martínez *et al.*, 1995). A excepción de este último producto, que utilizan para elaborar bebidas alcohólicas, los demás son

parte de su alimentación básica y cuando pueden los venden en el mercado local o a los intermediarios, quienes obtienen los mejores beneficios económicos. En las comunidades del municipio de Cuetzalan, donde la lluvia es abundante, los campesinos indígenas siembran y cultivan el maíz dos veces al año. De las plantas que cultivan, el café abarca casi la mitad de las tierras del municipio y es uno de los productos económicos más importantes. La Sierra Norte está conformada por 58 municipios, 1 430 comunidades, 10,109.40 km², lo que sería el 33% de la superficie del estado, y, de acuerdo con el XII Censo de Población y Vivienda de 1990 (INEGI, 1993), cuenta con una población total de 1, 003, 600 habitantes, de los cuales 457, 849 son indígenas: 362, 991 nahuas; 86, 793 totonacos; 7, 688 otomíes y 377 tepehuas. Cuetzalan cuenta con 45, 010 habitantes, de los cuales 21, 217 son náhuas (SEGOB, 2000).

III. 1 ELABORACIÓN DEL ATOLE AGRIO

El atole agrio estudiado en la presente investigación fue elaborado en abril de 2005 en San Andrés Tzicuilan, localidad situada en la Sierra Norte de Puebla, a unos 6 km al sureste de Cuetzalan (Mapa 1). La bebida fue preparada de acuerdo a la manera tradicional acostumbrada por los indígenas náhuas de la región, siguiendo un proceso general semejante al ya descrito por varios autores (Valderrama y Ramírez, 1993; Nava-Guzmán *et al.*, 2000); dicho proceso se explica e ilustra a continuación, y se resume en el Diagrama de flujo 1. La preparación comenzó con la nixtamalización del maíz, que consistió en hervir en

20 lt de agua, 15 kg de maíz con un puño de cal durante 1 h. Posteriormente, el maíz se enjuagó y se dejó reposar en agua limpia durante toda la noche. Al día siguiente, los granos de maíz se lavaron para eliminar el exceso de cal y el hollejo, y se molieron en metate hasta obtener una masa. Un kg de masa se disolvió en 4 lt de agua, se añadieron a 15 lt de agua hirviendo y se coció durante 15 min, mezclando constantemente, hasta obtener un atole de consistencia espesa. Previamente se humedeció el interior de un cántaro de barro de boca ancha, con la mitad de la mezcla de una pasta hecha con 30 hojas de *Ageratum corymbosum* Zucc. ex Pers., 30 g de cal y un poco de agua. Cuando el atole de masa estuvo listo se vació en el cántaro (que para la muestra uno, era nuevo) se añadió el resto de la pasta de la planta disuelta en agua con cal y cuatro brazas de carbón ardiendo. Se tapó con hojas verdes de plátano atadas con tiras de hojas de maíz; también se colocaron hojas de saúco sobre la tapa. El cántaro se puso sobre una cama de aserrín, cubierto totalmente con prendas de vestir para formar una cubierta térmica, y se dejó fermentar 48 h.



Mapa 1. San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Sierra Norte del Estado de Puebla.

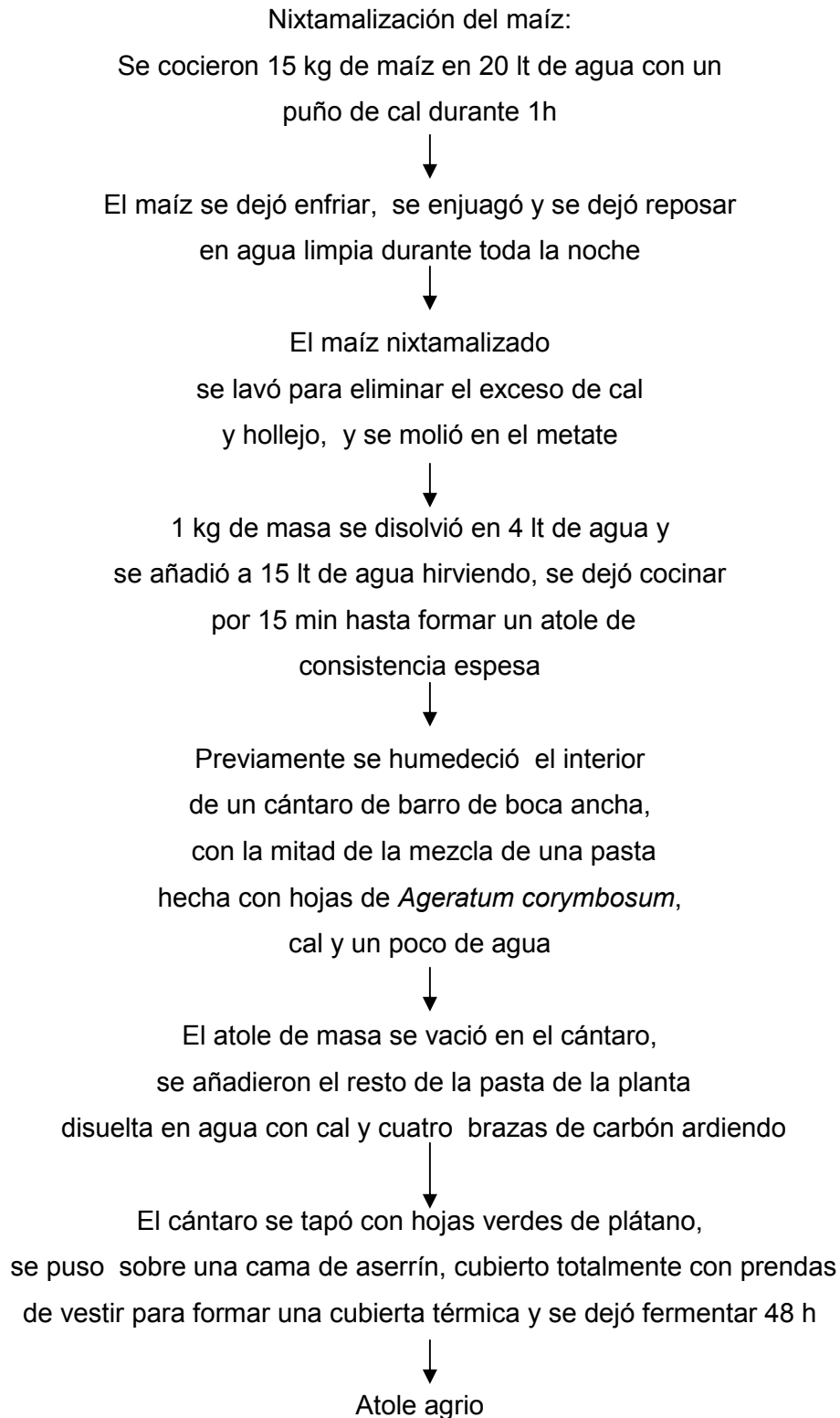


Diagrama de flujo 1. Proceso de elaboración del atole agrio estudiado.

En cada una de las fases de elaboración y fermentación del atole agrio se hicieron muestreos y se registraron los parámetros fisicoquímicos del sustrato (temperatura y pH). Las muestras consideradas son las que se enlistan en el Cuadro 1, y con ellas se realizaron los estudios microbianos siguiendo la metodología que se describe a continuación.

III. 2 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La obtención de las muestras se realizó bajo condiciones semiasépticas pero utilizando material esterilizado. El cántaro 1 (muestra 1) correspondió al atole que se preparó ese mismo día, del cual se observó todo el proceso de elaboración. Para esta muestra se acondicionó un sifón de plástico para tomar 100 ml de atole a las 0, 3, 6, 9, 11, 24, 34 y 48 h, que se vaciaron en botellas de polietileno rígido previamente esterilizadas. Los cántaros 2 y 3 (muestras 2 y 3) fueron preparados 24 h antes que el cántaro 1 y sólo se tomaron muestras hasta las 72 h de fermentación. También se tomaron muestras de las materias primas utilizadas: 100 g de la pasta de hierba con cal, 100 g de nixtamal recién molido, además de 100 ml de atole recién hervido antes de vaciarse al cántaro.

III. 3 MEDICIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

Durante todo el tiempo de elaboración y fermentación del atole agrio se determinó la temperatura y el pH de las muestras líquidas recién obtenidas y homogeneizadas, tomadas a las 0, 3, 6, 9, 11, 24, 34 y 48 h para el cántaro 1 y a

Cuadro 1. Fases muestreadas del proceso de elaboración y fermentación del atole agrio, técnicas y medios de cultivo utilizados en el estudio de su microbiota.

Fases muestreadas durante la elaboración y fermentación del atole agrio	Determinación de la microbiota
Pasta de hierba con cal	Dilución; siembra de 0.1ml en agar ^{ab} de la dilución 1:10 ¹
Nixtamal molido	idem
Atole recién hervido antes de vaciarlo al cántaro	Dilución; siembra de 0.1ml en agar ^{ab} de las diluciones 1:10 ¹ , 1:10 ² y 1:10 ³
Cántaro 1	
Atole recién agregado a la olla (Tiempo 0)	idem
Atole de 3 h de fermentación (Tiempo 1)	idem
Atole de 6 h de fermentación (Tiempo 2)	idem
Atole de 9 h de fermentación (Tiempo 3)	Dilución; siembra de 0.1ml en agar ^{ab} de las diluciones 1:10 ¹ , 1:10 ² , 1:10 ³ , 1:10 ⁴
Atole de 11 h de fermentación (Tiempo 4)	idem
Atole de 24 h de fermentación (Tiempo 5)	idem
Atole de 34 h de fermentación (Tiempo 6)	idem
Atole de 48 h de fermentación (Tiempo 7)	idem
Cántaro 2	
Atole de 72 h de fermentación	Dilución; siembra de 0.1ml en agar ^{ab} de las diluciones 1:10 ¹ -1:10 ⁸
Cántaro 3	
Atole de 72 h de fermentación	idem

^a PDA (papa-dextrosa-agar) pH 3, RBDCA (Rosa de Bengala-dicloran-cloranfenicol-agar marca Difco)

^b se sembraron 3 placas de agar de cada medio de cultivo por cada dilución hecha

72 h para los cántaros 2 y 3. El pH se midió con tiras de papel indicador (Acilit pH 0-6, Neutralit pH 5-10, Alkalit pH 7-14, Merck), con sensibilidad de 0.5 unidades de pH, las cuales fueron sumergidas en las muestras. También se determinó con un potenciómetro (Corning, pH 320) previamente calibrado con soluciones reguladoras de pH: buffer de referencia pH 4.10±0.01 (solución de biftalato ácido de potasio, J. T. Baker) y buffer de referencia pH 7.00±0.01 (solución de fosfatos de sodio y potasio, Sigma). La temperatura se obtuvo con un termómetro con bulbo de mercurio (250°C Brannan).

III. 4 AISLAMIENTO DE LA MICROBIOTA

Se diluyó 1 g de cada una de las materias primas en 99 ml de agua peptonada al 0.1%. Se hicieron suspensiones seriadas, y de las suspensiones $1:10^{-1}$ y $1:10^{-2}$ se sembraron por triplicado alícuotas de 0.1 ml, por el método de extensión en placa en dos medios de cultivo: PDA (papa-dextrosa-agar: se hizo una infusión con 300 g de papa pelada y cortada en cuadros en 1000 ml de agua, se filtró y se añadieron 20 g de glucosa y 20 g de agar, aforando a 1000 ml) acidificado con ácido clorhídrico a pH 3, y RBDCA (Rosa de Bengala-dicloran-cloranfenicol-agar marca Difco). De cada muestra del cántaro 1 se diluyeron 0.5 ml en 4.5 ml de agua peptonada al 0.1%. Se hicieron suspensiones seriadas: $1:10^{-1}$ hasta $1:10^{-3}$ para 0, 3 y 6 h de fermentación; $1:10^{-1}$ hasta $1:10^{-4}$ para 9, 11, 24, 34 y 48 h y $1:10^{-1}$ hasta $1:10^{-8}$ para los cántaros 2 y 3), a partir de las cuales se sembraron por triplicado alícuotas de 0.1 ml en los mismos medios de cultivo mencionados arriba. De las colonias de levaduras con morfología colonial diferente, se hicieron

resiembras por el método de siembra en estrías múltiples en medios de GELPA diluido (glucosa 10 g, extracto de levadura 2.5 g, peptona 5 g, agar 20 g, agua 1000 ml), acidificado a pH 3.7 con HCl, y en RBDCA con la finalidad de obtener cultivos libres de bacterias. Los cultivos puros se mantuvieron en tubos inclinados de GELPA y en tubos con agua destilada estéril a una temperatura de 4°C para su posterior identificación. Las colonias de mohos se resembraron en tubos inclinados de EMA (extracto de malta-agar: extracto de malta 20g, peptona 1g, glucosa 20g, agar 20 g, agua 1000 ml) y se mantuvieron también a una temperatura de 4°C para su posterior identificación.

III. 5 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS DE LEVADURAS

Para la identificación morfo-fisiológica tradicional de las levaduras se realizaron las pruebas señaladas en la metodología de Yarrow, (1998) (Cuadro 2). Se siguieron las claves taxonómicas y se cotejaron las descripciones de cada una de las especies en los tratados de Barnett *et al* (2000), Kurtzman y Fell (1998), y en la base de datos de la colección (Centraalbureau voor Schimmelculture (CBS), 2006). Con el fin de reducir el tiempo de identificación se utilizaron las galerías comerciales de identificación ID32C bioMérieux; siguiendo la metodología y especificaciones señaladas por el fabricante y el resto de las pruebas requeridas en la metodología de Yarrow, (1998) se realizaron en forma manual.

Cuadro 2. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras (Yarrow, 1998).

I. Características morfológicas	II. Características fisiológicas y bioquímicas
<p>A. Macromorfología o características culturales de los aislamientos</p> <p>1. Crecimiento en medio líquido GELP, formación de película o de anillo</p> <p>2. Crecimiento en medio sólido GELPA, desarrollo de colonia gigante para observar textura, color, superficie, elevación y margen</p> <p>B. Micromorfología</p> <p>1. Características de las células vegetativas</p> <p>a) morfología en medio sólido GELPA b) morfología en medio líquido GELP c) formación de seudomicelio y micelio verdadero en placa de Dalmau en HMA (Difco), AA y PDA</p> <p>2. Características de la reproducción asexual o vegetativa en los medios GELPA, EMA, AML (Difco) y AML</p> <p>3. Características de la reproducción sexual</p> <p>a) Proceso de formación de ascas y ascosporas b) características de las ascas y ascosporas en GELPA, EMA, AML (Difco), AML, GWA, FWA y McClaryA</p>	<p>1. Utilización de compuestos de carbono</p> <p>a) fermentación de 6 carbohidratos b) asimilación de 42 compuestos de carbono</p> <p>2. Asimilación de compuestos de nitrógeno</p> <p>a) nitrato de potasio b) nitrito de sodio c) cadaverina d) etilamina e) lisina f) creatina g) creatinina h) D-glucosamina</p> <p>3. Resistencia al antibiótico cicloheximida (100 y 1000 ppm)</p> <p>4. Crecimiento en medios de alta presión osmótica</p> <p>a) tolerancia a 50% y 60% de glucosa b) 10% NaCl/5% glucosa</p> <p>5. Crecimiento a 37, 40 y 42°C en GELP</p> <p>6. Reacción al colorante azul B de diazonio (DBB)</p> <p>7. Producción de almidón extracelular</p> <p>8. Hidrólisis de urea</p> <p>9. Liquefacción de gelatina</p>

Abreviaturas:

GELPA (glucosa-extracto de levadura-peptona-agar): glucosa 20 g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **GELP(glucosa-extracto de levadura-peptona):** glucosa 20 g, extracto de levadura 5g, peptona 10 g; **AML (Difco) (agar para morfología de levaduras marca Difco); AML (agar para morfología de levaduras):** extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona 5 g, glucosa 10 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **AA (arroz-agar):** infusión con 20g de arroz en 1000 ml de agua, filtrada, aforada a 1000 ml, más 20 g de agar; **PDA (papa-dextrosa-agar):** infusión con 300 g de papa pelada y cortada en cuadros en 1000 ml de agua, filtrada, más 20 g de glucosa y 20 g de agar, aforada a 1000 ml; **GWA (Gorodkova-agar):** glucosa 1g, peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **FWA (Fowell-agar):** acetato de sodio 5g, agar 20 g, agua 1000 ml; **EMA (extracto de malta-agar):** extracto de malta 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **HMA (Difco) (harina de maíz-agar marca Difco):** harina de maíz Difco 20 g, peptona 20 g, dextrosa 20 g, agar 20 g, agua 1000 ml, **McClaryA (McClary-agar):** glucosa 1 g, cloruro de potasio 1.8 g, acetato de sodio 8.2 g, extracto de levadura 2.5 g, agar 15 g, agua 1000 ml

La identificación molecular se realizó por secuenciación de pares de bases de nucleótidos del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr. La extracción de ADN se hizo según la metodología propuesta por Tapia-Tussell *et al.*, 2006. La amplificación por PCR (termociclador Applied Biosistem 9700) se llevó a cabo con los iniciadores (primers) universales NL-1 (5'-GCA-TAT-CAA-TAA-GCG-GAG-GAA-AAG-3') y NL-4 (GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G-3') como avance (forward) y reversa, respectivamente, de acuerdo con los protocolos de Kurtzman y Robnett, 1998, y Tapia-Tussell *et al.*, 2006. Las secuencias de nucleótidos se obtuvieron con el secuenciador automático Applied Biosistem 3100. El análisis y la edición de las secuencias obtenidas se hizo con el programa Bioedit 7. La búsqueda y comparación de las secuencias parciales obtenidas con las existentes en el GenBank se llevaron a cabo con el programa Blast (Altschul *et al.*, 1997). La identificación polifásica se realizó utilizando la base de datos del Centraalbureau voor Schimmelculture, de Holanda (CBS, 2006), conjuntando las características morfo-fisiológicas y la secuencia de bases de nucleótidos obtenidas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se determinó la temperatura y pH de la pasta hecha con hierba y cal y del nixtamal molido. En el atole que se preparó en el cántaro 1 (muestra 1) la temperatura fue disminuyendo paulatinamente, de 80°C del tiempo cero, esto es, del atole recién agregado a la olla de fermentación hasta 20°C en el tiempo siete, después de 48 h. El pH disminuyó lentamente, de 9.6 hasta 7.5 manteniéndose alcalino (9.1) después de 34 h por lo que no fermentó adecuadamente. Esto posiblemente se debió a un exceso de cal en la preparación de la pasta, ya que se trataba de un cántaro nuevo que no había sido previamente curado y que no presentaba adheridos a sus paredes residuos de fermentaciones previas, suponiendo que el inóculo inicial provenga de la olla (Nava-Guzmán *et al.*, 2004), lo que produjo el desarrollo de una escasa diversidad de especies de levaduras (Lisichkina *et al.*, 2003). Además es posible, que conforme se va enfriando el atole se establezca una microbiota proveniente de las hojas de plátano, de maíz y de saúco que cubren la boca del cántaro y de la pasta de hierba con cal. En el atole de los cántaros 2 y 3 (muestras 2 y 3) la temperatura fue de 28 y 29°C con un pH de 4.31 y 4.36 respectivamente. El recuento total de microorganismos (ufc/ml) aislados se presenta en el Cuadro 3, en donde se observa que el total de aislados obtenidos a partir de todas las muestras fue 114 cepas de mohos y 50 cepas de levaduras. La micobiota presente en nixtamal molido desapareció con la cocción del atole y se restablece teniendo como fuentes de inóculo sedimentos en la olla de fermentación y las hojas de plátano, saúco y maíz que cubren la boca del cántaro. De las materias primas utilizadas para elaborar el atole agrio se asilaron

las siguientes levaduras y mohos: de nixtamal molido se obtuvieron 1.04×10^4 ufc/ml, de las cuales se aislaron 51 cepas que correspondieron a: *Candida pararugosa* (26), *C. famata* var. *famata* (1), *C. intermedia* (3), *C. parapsilosis* (3), *Candida tenuis* (1), *Pichia galeiformis* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (1), *Cryptococcus curvatus* (3), *Trichosporon cutaneum* (3), y 9 aislados de mohos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium*. De la pasta preparada con la planta *Ageratum corymbosum* y cal no se obtuvieron aislados. Se recolectaron muestras de atole del cántaro 1 (muestra 1) a las 0, 3, 6, 9, 11, 24, 34 y 48 h de fermentación aislándose 5 especies de levaduras: dos cepas de *Cryptococcus usbekistanensis*, un aislado del tiempo 0 (80°C, pH 9.6), esto es, del atole recién agregado a la olla de fermentación (4×10^2 ufc/ml) y el otro aislado del tiempo 2 (43°C, pH 9.5), después de 6 h de fermentación (1.1×10^3 ufc/ml), una aislado de *Candida parapsilosis* (3×10^3 ufc/ml) y otro de *Cryptococcus* sp. (4×10^2 ufc/ml) durante el tiempo 4 (37°C, pH 9.5), después de 11 h de fermentación, una cepa de *Cr. albidus* (9×10^3 ufc/ml) del tiempo 5 (24°C, pH 9.35), después de 24 h de fermentación, y 52 aislados de mohos pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cladosporium*, obtenidos a lo largo de las 48 h de fermentación. Por otro lado, de los atoles de los cántaros 2 (muestra 2) y 3 (muestra 3) se tomaron muestras hasta las 72 h de fermentación. De la muestra 2 (28°C, pH 4.31) se aislaron dos cepas de la levadura *Kloeckera apiculata* (4×10^2 ufc/ml), un aislado de una levadura que no se pudo purificar para su identificación por encontrarse altamente contaminado con bacterias y 29 aislados de mohos que correspondieron a los

géneros anteriormente citados. De la muestra 3 (29°C, pH 4.36) se obtuvieron 18 cepas de mohos, también de los géneros antes mencionados.

De cada especie de levadura identificada por medio de taxonomía tradicional, se seleccionaron algunos aislados, en total 29, de los que se obtuvo la secuencia de pares de bases de nucleótidos de la región D1/D2 del gene 26S del ADNr (Cuadro 10) para corroborar su identidad. Los resultados de la identificación tradicional (morfofisiológica) y polifásica, en donde se conjuntron las características morfofisiológicas con las secuencias de nucleótidos obtenidas se presentan en los Cuadros 4, 5 y 6.

Levaduras aisladas a partir de nixtamal molido. Se obtuvieron 26 aislados, que identificados por medio de taxonomía tradicional (morfofisiológica), correspondieron a *Candida rugosa*, representando 50.9 % del total de los aislados. Las cepas con características morfo-fisiológicas diferentes a las descritas en las diagnosis de las monografías de Barnett *et al.*, (2000), Kurtzman y Fell (1998), o de la base de datos del CBS (2006), se agruparon en 2 biotipos, tomando como base aquellos que asimilaron o no manitol y glucitol (Cuadro 7). Se seleccionaron 7 cepas (4 con asimilación negativa y 3 con asimilación positiva para manitol y glucitol), de las que se obtuvo la secuencia de bases de nucleótidos de la región D1/D2 del gene 26S del ADNr. Las secuencias obtenidas fueron similares con *C. pararugosa*, 4 presentaron 100% de similitud con la cepa gb. DQ377637 VTT C-04522, y 3, tuvieron 99% de similitud con el aislado gb. AF335972 UWFP-348, de la base de datos del GenBank. En la identificación polifásica los aislados que no asimilaron glucitol y manitol presentaron un porcentaje de similitud menor (97.2%-97.9%), aunque aceptable, con *C. pararugosa* (Cuadro 5). Las secuencias

obtenidas para estos aislados fueron iguales entre si, lo que significa que son coespecíficos. Las diferencias entre los biotipos pueden deberse a polimorfismos o falta de expresión génica (Lachance, 1995). El perfil de asimilación de compuestos de carbono y nitrógeno registrada en las diagnosis de las monografías de Barnett *et al.*, (2000) para la especie *C. rugosa* presenta mas variabilidad que el descrito para *C. pararugosa* (Cuadro 6) por ello, al realizar la identificación tradicional, en la base de datos CBS, los resultados se inclinan con un mayor porcentaje de similitud para *C. rugosa* que para *C. pararugosa*. *Candida pararugosa* asimila manitol y glucitol y no es capaz de crecer en 10% de NaCl, por otro lado *C. rugosa* asimila de manera positiva o débilmente glucitol y manitol y crece en 10% NaCl. Por tanto se deduce que los 19 aislados que correspondieron a *C. rugosa*, identificados por los métodos tradicionales, pertenecen más bien a la especie *C. pararugosa*. Además cabe mencionar, que ninguno de los 26 aislados presentó un crecimiento positivo en 10% de NaCl, que es positivo para *C. rugosa*. La especie *Candida pararugosa* ha sido aislada de alimentos como la malta (cebada germinada para la producción de cerveza) (Laitila *et al.*, no publicado), leche cruda (Spanamberg *et al.*, 2004) y fue aislada de atole agrio con de 24 h de fermentación (Nava-Guzmán *et al.*, 2004). También ha sido aislada de heces. Se obtuvo un aislado de *Candida famata* var. *famata*, estado asexual de *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, correspondiendo a 1.96% del total de los aislados. Esta especie tuvo las mismas características morfológicas y fisiológicas con la diagnosis de las especies descrita en las monografías de Barnett *et al.*, (2000) y Kurtzman y Fell (1998). La comparación de la secuencia obtenida del aislado de *C. famata* var. *famata* con las secuencias depositadas en el GenBank reveló 100% de similitud

con la secuencia gb. DQ365396 CECT 10661. La identificación polifásica en la base de datos CBS, 2006, presentó 99.9% de similitud con *D. hansenii* var. *hansenii*. Esta es una especie osmotolerante, aislada de muy diversos sustratos, entre ellos, varios alimentos fermentados tradicionales elaborados con granos de sorgo (Kisra, Aceda, Enjera) de África (Sulma *et al.*, 1991), Kefir dulce, hongo del té (Herrera y Calderón-Villagómez, 1989), maíz (Nout *et al.*, 1997), masa de maíz fermentada (Jespersen *et al.*, 1994; Sauni *et al.*, 2002) y algunos alimentos fermentados mexicanos como el pozol de maíz (Calderón-Villagómez y Herrera, 1989; Wachter *et al.*, 2000), tepache de granos de tибicos (Armijo *et al.*, 1991) y atole agrio de maíz después de 24 h de fermentación (Nava-Guzmán *et al.*, 2004).

Otra de las especies obtenidas de nixtamal martajado fue *C. intermedia*, con 3 cepas que correspondieron al 5.8% del total de los aislados. Se encontró la asimilación positiva de D-arabinosa, débil para DL-lactato y negativa de lisina (solo para dos aislados) (Cuadro 8), diferente al perfil de asimilación presentado en las diagnósis descritas en las monografías de Barnett *et al.*, (2000) y Kurtzman y Fell (1998). Por medio de taxonomía tradicional se identificaron los tres aislados como *C. intermedia* con 92.2%, 93.3% y 95.6% de similitud. La comparación de las dos secuencias obtenidas de los aislados seleccionados de *C. intermedia* con las secuencias presentes con la base de datos del GenBank reveló 99% de similitud con la secuencia de *C. intermedia* gb. DQ377635 VTT C-04520. La identificación polifásica reveló un 98.6% (cepa NM 5 con asimilación negativa de lisina) y 99.10% (cepa NM 11 con asimilación positiva de lisina) de similitud para *C. intermedia*. Esta especie ha sido aislada de diversos alimentos como cerveza, frutas, uva, salmuera (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman y Fell ,1998), leche cruda

(Spanamberg *et al.*, 2004), malta (Laitila *et al.*, no publicado) y de bebidas fermentadas como Kistrá elaborada a partir de granos de sorgo (Sulma *et al.*, 1991) y tepache, bebida tradicional mexicana (Moreno-Terrazas, 2005). También ha sido aislada de otros sustratos como heces, garganta y piel humanas. Se obtuvieron tres aislados de la levadura *Candida parapsilosis* correspondiendo al 5.8% del total de los aislados. Comparando los perfiles de asimilación de compuestos de carbono y nitrógeno de las cepas obtenidas con la diagnosis presentada en las monografías de Barnett *et al.*, (2000) para *C. parapsilosis* se encontró que: en la cepa con clave inicial NM 23 fue diferente la asimilación de xilosa, trehalosa y gluconato, en NM 13 la asimilación de xilosa y gluconato y en NM 14 no se encontraron diferencias (Cuadro 9). Las dos secuencias obtenidas para *C. parapsilosis* (NM 23 y NM 14) presentaron 99% de similitud con la secuencia gb. AY894827 EXOC16. La identificación polifásica reveló 98.9% (NM 23) y 100% (NM 14) de similitud para *C. parapsilosis*. Esta especie ha sido aislada de muy diversos sustratos como aceitunas, vegetales en estado de descomposición (Barnett *et al.*, 2000), de extracto cocido del henequén *Agave fourcroydes* (Tapia-Trussell *et al.*, 2006), miel (Calhelha *et al.*, no publicado), además de alimentos fermentados como pulque (Sánchez-Marroquín, 1962 citado por Lappe y Ulloa, 1993), yogurt (Kosse *et al.*, 1997) y fermentaciones etanólicas (Ceccato-Antonini *et al.*, 1999). También ha sido aislada de piel sana, uñas infectadas, y vejiga de vaca con mastitis (CBS, 2006). *Candida parapsilosis* está considerada como una especie de seguridad biológica nivel 1 por producir micosis de importancia clínica en pacientes inmunodeprimidos (Barnett *et al.*, 2000). Se obtuvo una cepa de *Candida tenuis* correspondiendo al 1.9% del total de aislados.

La secuencia de pares de bases obtenida de este aislado presentó 100% de similitud con la cepa *Candida* sp. gb. AY559041 CBS 7880 de la base de datos de secuencias del GenBank. La identificación polifásica reveló 95.3% de similitud con *C. tenuis*, con la asimilación de melibiosa, succinato, citrato y lisina diferente a la registrada en las monografías de Barnett *et al.*, (2000) y Kurtzman y Fell (1998). Aunque se observaron al microscopio verticilos de blastoconidios ovoidales característicos de esta especie. *Candida tenuis* se ha encontrado en escarabajos, larvas de escarabajos, suelo, líquido azucarado y desechos de pino (Barnett *et al.*, 2000; CBS, 2006) pero también ha sido aislada de alimentos fermentados (Middelhoven, W. J., 2002) y de vino (Deák, 2002). Se obtuvo una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, representando 1.9% del total de los aislados. La asimilación positiva de la ribosa fue diferente al dato registrado en las diagnosis de Barnett *et al.*, (2000) y Kurtzman y Fell (1998). El análisis de la secuencia de esta especie reveló 99% de similitud con *S. cerevisiae* (gb. AJ746340 ESAB9). En la identificación polifásica se encontró 98.8% de similitud con *S. cerevisiae*. Esta especie ha sido aislada de alimentos fermentados como cerveza, vino, kefir (CBS, 2006), pulque (Gabiño, 1910 y Sánchez-Marroquín, 1962, citados por Lappe y Ulloa, 1993; Lappe *et al.*, 1989), cacao (Sánchez *et al.*, 1993), tepache de tibicos (Rubio *et al.*, 1993), cerveza de sorgo (Konlani *et al.*, 1996), masa de maíz (Jespersen *et al.*, 1994; Hayford y Jespersen, 1999), alimentos fermentados amiláceos no alcohólicos, bebidas alcohólicas y leches fermentadas elaborados en África (Jespersen, 2003). También se ha encontrado asociada a la mosca de fruta, al hombre y otros mamíferos (CBS, 2006). Un aislamiento de *Pichia galeiformis* se encontró también en nixtamal, correspondiendo a 1.9% del total de los aislados.

La comparación de la secuencia de *P. galeiformis* con las secuencias depositadas en el GenBank mostró 99% de similitud con la secuencia de *P. galeiformis* (gb. AJ749826 ESAB5). La identificación polifásica indicó un 98.8% de similitud debido a la asimilación positiva de glucosamina y negativa de lisina. Esta especie ha sido aislado de alimentos fermentados como cocoa (Jaspersen *et al.*, 2004 citado por Nielsen *et al.*, 2005) y masa agria de arroz (Meroth *et al.*, 2004), además de aceituna y heces (Barnett *et al.*, 2000). De *Cryptococcus curvatus* se obtuvieron tres aislados (5.8% del total de los aislados). De los aislados NM 2 y NM 10 no se realizó la secuencia de pares de bases de nucleótidos porque dejaron de crecer y no se pudieron revitalizar. Al introducir los datos morfológicos y fisiológicos de estos aislados a la base de datos del CBS (CBS 2006), la identificación tradicional indicó 94% de similitud con *Cr. curvatus*, difiriendo en la asimilación de celobiosa, lactosa, melibiosa y citrato. La comparación de 3 secuencias del aislado NM 9 reveló 99% de similitud con *Cryptococcus* sp. (gb. AB260936 IFM54862) del GenBank. La identificación polifásica mostró 94.6% de similitud con *Cr. curvatus*, por diferencias en la asimilación de melibiosa, lactosa, lactato, citrato y N-glucosamina, aunque presenta células curvas características de esta especie. El perfil de asimilación de carbohidratos de esta cepa con el de los aislados anteriores, a los que no se les realizó la secuencia de bases de nucleótidos, difirió en la asimilación de lactato y manitol, además de las características morfológicas de la colonia gigante. *Cryptococcus curvatus* ha sido aislada de leche cruda (Orberá, 2004), así como de esputo, orina y heces (Kurtzman y Fell 1998). De *Trichosporon cutaneum* se obtuvieron 3 aislados a partir de nixtamal, que correspondieron a 5.7% de los aislados totales. La comparación de las 3

secuencias obtenidas con las secuencias presentes en el GenBank reveló 98% de similitud con la secuencia de *T. cutaneum* aislada de alimentos (gb. AJ749837 ESAB19). La identificación polifásica mostró 96%, 97.7% y 97.9% de similitud, por diferir en la asimilación de almidón, lactato, succinato, citrato e inositol, aunque es evidente la reproducción vegetativa por fisión y la presencia de hifas septadas con artroconidios. Esta especie ha sido aislada de alimentos fermentados elaborados con maíz como el pozol (Herrera y Ulloa, 1971) y “kenkey” (Jaspersen *et al.*, 1994), además se ha encontrado asociada a arroz (Lima *et al.*, 2000), maíz (Nout *et al.*, 1997) y carne fermentada de embutidos (McCarthy y Damoglou, 1996), entre otros sustratos.

Levaduras aisladas de la muestra 1 de atole agrio. Se obtuvieron dos aislados de *Cryptococcus uzbekistanensis* (2.94% del total de los aislados), uno del atole recién hervido y agregado a la olla de fermentación, y el otro a las 6 h de fermentación. La comparación de la secuencia de estas cepas con las secuencias del GenBank mostró 99% de similitud con *Cr. uzbekistanensis* (gb. AF181508 CBS8683). La identificación polifásica mostró 96.7% de similitud con *Cr. uzbekistanensis* debido a diferencias en la asimilación de almidón y en la hidrólisis de urea negativa. Es una levadura que fue descrita por Fonseca *et al.*, (2000), aislada de suelo en el desierto de Uzbekistán. Su presencia en el atole agrio posiblemente esté asociada al suelo adherido a la olla de fermentación o en las hojas de plátano que cubren la boca del cántaro. Se obtuvo un aislado de *Cryptococcus* sp. a partir de atole de 11 h de fermentación, correspondiendo al 1.47% del total de los aislados. El análisis de la secuencia presento 99% de

similitud con la secuencia de *Cryptococcus* sp. aislada de Malta (gb. DQ377668 VTTC-04547). La identificación polifásica señaló 90% similitud para la forma asexual levaduriforme de *Holtermannia corniformis*, y 88.3% para *Cr. nyarrowii*. Las características morfológicas y fisiológicas obtenidas para este aislado fueron muy diferentes para las registradas en las diagnósticas de *H. corniformis* y *Cr. nyarrowii* (Barnett *et al.*, 2000; CBS, 2006). Para poder esclarecer la identidad de los aislados de *Cryptococcus* sería necesario obtener la secuencia de bases de los nucleótidos de los espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2), que permite distinguir y separar especies de levaduras basidiomicetes estrechamente relacionadas (Fell *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2000), pues su identificación y posición filogenética no es fácil de establecer, en parte por la naturaleza polifilética del grupo (Moreno-Terrazas, 2005). También se obtuvo un aislado de *Candida parapsilosis* (cepa T4-1) a partir de atole de 11 h de fermentación, representando el 1.47% del total de los aislados. Esta cepa no presentó diferencias con los resultados encontrados en las monografías de Barnett *et al.*, (2000). La secuencia obtenida de este aislado presentó un 100% de similitud con la secuencia de *C. parapsilosis* gb. AJ749821 ESAB2. La identificación polifásica reveló un 100% de similitud con *C. parapsilosis*. Un aislado de *Cryptococcus albidus* se obtuvo a las 24 h de fermentación, correspondiendo a 1.47% de los aislados totales. El análisis de la secuencia de *Cr. albidus* con las secuencias de la base de datos del GenBank mostró 100% de similitud con la secuencia de *Cr. albidus* gb. AY296054 Y52. La identificación polifásica reveló 99.4% de similitud con *Cr. albidus*, sin diferencias con la diagnóstico de Barnett *et al.*, (2000). Esta levadura ha sido aislada de varios alimentos fermentados, como sake, vino, (Kurtzman y Fell 1998),

tepache de tibicos (Rubio *et al.*, 1993), así como de quesos conservados, trigo (Orberá, 2004) y maíz (Nout *et al.*, 1997).

Levaduras aisladas de la muestra 2 de atole agrio. Tres aislados de *Kloeckera apiculata*, estado asexual de *Hanseniaspora uvarum*, se encontraron en la muestra 2 de atole agrio después de 72 h de fermentación, representando el 8.57% de los aislados obtenidos. No se presentaron diferencias en el patrón de asimilación de carbohidratos y compuestos de nitrógeno, sólo el crecimiento fue positivo en medio líquido (glucosa-extracto de levadura-peptona) a 37°C (para *H. uvarum* es negativa) (Barnett *et al.*, 2000 y Kurtzman y Fell, 1998). La comparación de la dos secuencia de *K. apiculata* con las secuencias presentes en el GenBank mostró 99% y 100% de similitud con la secuencia de *H. uvarum* (gb. AMI60628 HA1670). El análisis de la identificación polifásica reveló 99.3% de similitud con la especie. Esta levadura ha sido frecuentemente aislada de alimentos fermentados, como tepache (Moreno-Terrazas, 2005), cidra, salmuera, masa agria, mosto de frutas, (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman y Fell 1998), café (Masoud *et al.*, 2004), yogurt (Kosse *et al.*, 1997), cacao (Sánchez, *et al.*, 1993), vino (Torija *et al.*, 2001), agua ardiente (Schwan *et al.*, 2001).

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a la discusión anterior, se puede concluir que:

1. Las especies de levaduras aisladas representan una importante contribución al estudio de la microbiota del atole agrio de maíz, sin embargo el pH alcalino (9.5-8.5) de la muestra 1 de atole, impidieron el mayor desarrollo y por tanto aislamiento de especies de levaduras.
2. Las especies de levaduras identificadas, con excepción de *Cr. uzbekistanensis*, han sido aisladas de diferentes alimentos fermentados, incluso de los elaborados con materias primas que contienen almidón como el maíz, sorgo y arroz lo cual justifica su presencia en el atole agrio de maíz.
3. En los aislados de levaduras NM 9 y T4-0 pertenecientes al género *Cryptococcus* así como el aislado NM 2c, del género *Candida*, la secuenciación de bases del dominio D1/D2 del gene 26S del ADNr no fue resolutive para identificarlos a especie, por lo que se recomienda realizar la secuencia de bases de los espaciadores internos de la transcripción (ITS1 e ITS2) para corroborar así su identidad.
4. Se requieren de más estudios en los que se determinen la microbiota asociada al atole agrio de maíz para poder dilucidar cual es su participación en el complejo proceso de fermentación de esta bebida.

Cuadro 3. Recuento total de microorganismos (ufc/ml) aislados de atole agrio y de las materias primas con las que se elabora.

Muestra	Temperatura y pH de la muestra	Diluciones	ufc/ml	Aislados	Especies identificadas y aislados no identificados
Pasta hierba con cal	nd	10 ⁻²	0	0	0
Nixtamal molido	nd	10 ⁻²	1.04X10 ⁴	51	<i>Candida pararugosa</i> (26), <i>C. famata</i> var. <i>famata</i> (1) <i>C. intermedia</i> (3), <i>C. parapsilosis</i> (3) <i>Candida tenuis</i> (1) <i>Pichia galeiformis</i> (1) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1) <i>Cryptococcus curvatus</i> (3) <i>Trichosporon cutaneum</i> (3) y mohos (9) nd
Atole agrio (Muestra 1)					
T	80°C, pH 9.6	10 ⁻²	1X10 ²	1	moho (1) nd
T0 (0 h)	80°C, pH 9.57	10 ⁻² 10 ⁻³	4X10 ² 0	4 0	<i>Cr.uzbekistanensis</i> (1), mohos (3) nd
T1 (3 h)	45°C, pH 9.5	10 ⁻² 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	9X10 ² 0	9 0	mohos (2) nd, bacterias (7) nd
T2 (6 h)	43°C, pH 9.5	10 ⁻² 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	1.1X10 ³ 0	11 0	<i>Cr.uzbekistanensis</i> (1), mohos (10)nd
T3 (9 h)	38°C, pH 9.5	10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	0	0	0
T4 (11 h)	37°C, pH 9.45	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	4X10 ² 3X10 ³ 2X10 ⁴ 2X10 ⁵	4 3 2 2	<i>Cryptococcus</i> sp. (1), mohos (3) nd <i>C. parapsilosis</i> (1), mohos (2) nd mohos (2) nd mohos (2) nd
T5 (24 h)	24°C, pH 9.35	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	7x10 ² 9X10 ³ 4X10 ⁴ 4X10 ⁵	7 9 4 4	mohos (7) nd mohos (8) nd, <i>Cr. albidus</i> (1) mohos (4) nd mohos (4) nd
T6 (34 h)	20°C, pH 9.1	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	4X10 ² 1X10 ³ 3X10 ⁴ 0	4 1 3 0	mohos (4) nd moho (1) nd mohos (3) nd
T7 (48 h)	20°C, pH 7.5	10 ⁻² , 10 ⁻³ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	0	0	0
Atole agrio (Muestra 2) (72 h)					
	28°C, pH 4.31	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁹	5X10 ² 9X10 ³ 2X10 ⁴ 4X10 ⁵ 2X10 ⁶ 7X10 ⁷ 3X10 ⁸ 3X10 ⁹	5 9 2 4 2 7 3 3	<i>Kloeckera apiculata</i> (3), mohos (2) nd mohos (9) nd mohos (2) nd mohos (4) nd levadura (1) nd, moho (1) nd mohos (7) nd mohos (3) nd mohos (3) nd
Atole agrio (Muestra 3) (72 h)					
	29°C, pH 4.36	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁸ 10 ⁻⁹	3X10 ² 1X10 ³ 3X10 ⁴ 5X10 ⁵ 1X10 ⁶ 1X10 ⁷ 1X10 ⁸ 3X10 ⁹	3 1 3 5 1 1 1 3	mohos (3) nd moho (1) nd mohos (3) nd mohos (5) nd moho (1) nd moho (1) nd moho (1) nd mohos (3)nd

nd: no determinado.

Cuadro 4. Identificación morfofisiológica de aislados de levaduras obtenidos de nixtamal molido.

AISLADO (clave inicial)	MÉTODO	IDENTIFICACIÓN	CBS % similitud
NM 6op	Morfofisiológico	<i>Candida rugosa</i>	93.1% <i>Candida rugosa</i>
NM 4	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	93% <i>C. rugosa</i>
NM 8	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	96.2% <i>C. rugosa</i>
NM 21	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	93.6% <i>C. rugosa</i>
NM 20	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	91.4% <i>C. rugosa</i>
NM 17	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	95.9% <i>C. rugosa</i>
NM 3	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	94.8% <i>C. rugosa</i>
NM 1a	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	96.0% <i>C. rugosa</i>
NM 1c	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	95.8% <i>C. rugosa</i>
NM 1b osc	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	97.2% <i>C. rugosa</i>
NM 1b cla	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	94.8% <i>C. rugosa</i>
NM 16 osc	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	95.2% <i>C. rugosa</i>
NM 16 cla	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	97.0% <i>C. rugosa</i>
NM 15 osc (1) y (2)	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	97.0% <i>C. rugosa</i>
NM 15 cla	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	97.0% <i>C. rugosa</i>
NM 25	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	97.0% <i>C. rugosa</i>

CBS: Base de datos Centraalbureau voor Schimmelculture de Holanda (CBS, 2006)

Cuadro 4. Continuación.

AISLADO (clave inicial)	MÉTODO	IDENTIFICACIÓN	CBS % similitud
NM 22 cla	Morfofisiológico	<i>Candida rugosa</i>	95.9% <i>Candida rugosa</i>
NM 6a	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	96.9% <i>C. rugosa</i>
NM 18	Morfofisiológico	<i>C. rugosa</i>	97.1% <i>C. rugosa</i>
NM 6b	Morfofisiológico	<i>C. intermedia</i>	93.3% <i>C. intermedia</i>
NM 13	Morfofisiológico	<i>C. parapsilosis</i>	94.8% <i>C. parapsilosis</i>
NM 2	Morfofisiológico	<i>Cryptococcus curvatus</i>	94% <i>Cr. curvatus</i>
NM 10	Morfofisiológico	<i>Cr. curvatus</i>	94% <i>Cr. curvatus</i>

CBS: Base de datos Centraalbureau voor Schimmelculture de Holanda (CBS, 2006)

Cuadro 5. Identificación morfofisiológica, molecular y polifásica de aislados de levaduras obtenidos de nixtamal molido.

AISLADO (clave inicial)	MÉTODO	IDENTIFICACIÓN	CBS % similitud	GenBank % similitud
NM 2b osc NM 2b cla	Morfofisiológico Molecular	<i>Candida pararugosa</i>	97.9% <i>Candida pararugosa</i>	100% <i>Candida pararugosa</i>
NM 22a	Morfofisiológico Molecular	<i>C. pararugosa</i>	97.2% <i>C. pararugosa</i>	100% <i>C. pararugosa</i>
NM 7	Morfofisiológico Molecular	<i>C. pararugosa</i>	99.5% <i>C. pararugosa</i>	100% <i>C. pararugosa</i>
NM 2e	Morfofisiológico Molecular	<i>C. pararugosa</i>	98.7% <i>C. pararugosa</i>	99% <i>C. pararugosa</i>
NM 24	Morfofisiológico Molecular	<i>C. pararugosa</i>	97.6% <i>C. pararugosa</i>	99% <i>C. pararugosa</i>
NM 17a	Morfofisiológico Molecular	<i>C. pararugosa</i>	97.7% <i>C. pararugosa</i>	99% <i>C. pararugosa</i>
NM 2c (1)	Morfofisiológico Molecular	<i>Candida tenuis</i>	94.6% <i>C. tenuis</i>	99% <i>Candida sp.</i>
NM 2c (3)	Morfofisiológico Molecular	<i>Candida tenuis</i>	95.3% <i>C. tenuis</i>	100% <i>Candida sp.</i>
NM 2d	Morfofisiológico Molecular	<i>C. famata var. famata</i>	99.9% <i>Debaryomyces hansenii var. hansenii</i>	100% <i>D. hansenii</i>
NM 11	Morfofisiológico Molecular	<i>C. intermedia</i>	99.10% <i>C. intermedia</i>	99% <i>C. intermedia</i>
NM 5	Morfofisiológico Molecular	<i>C. intermedia</i>	98.6% <i>C. intermedia</i>	99% <i>C. intermedia</i>
NM 23	Morfofisiológico Molecular	<i>C. parapsilosis</i>	98.9% <i>C. parapsilosis</i>	99% <i>C. parapsilosis</i>
NM 14	Morfofisiológico Molecular	<i>C. parapsilosis</i>	100% <i>C. parapsilosis</i>	99% <i>C. parapsilosis</i>
NM 12	Morfofisiológico Molecular	<i>Pichia galeiformis</i>	98.8% <i>P. galeiformis</i>	99% <i>P. galeiformis</i>
NM 1	Morfofisiológico Molecular	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98.8% <i>S. cerevisiae</i>	99% <i>S. cerevisiae</i>

CBS: Base de datos Centraalbureau voor Schimmelculture de Holanda (CBS, 2006)

Cuadro 5. Continuación.

AISLADO (clave inicial)	MÉTODO	IDENTIFICACIÓN	CBS % similitud	GenBank % similitud
NM 9	Morfofisiológico Molecular	<i>Cryptococcus curvatus</i>	94.6% <i>Cr. curvatus</i>	99% <i>Cryptococcus</i> sp.
NM 19	Morfofisiológico Molecular	<i>Trichosporon cutaneum</i>	96% <i>T. cutaneum</i>	98% <i>T. cutaneum</i>
NM 2a lis y rug	Morfofisiológico Molecular	<i>T. cutaneum</i>	97.9% <i>T. cutaneum</i>	98% <i>T. cutaneum</i>

CBS: Base de datos Centraalbureau voor Schimmelculture de Holanda (CBS, 2006)

Cuadro 6. Identificación morfofisiológica, molecular y polifásica de aislados de levaduras obtenidos de atole agrio.

AISLADO (clave inicial)	MÉTODO	IDENTIFICACIÓN	CBS % similitud	GenBank % similitud
T0-0	Morfofisiológico Molecular	<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	96.7% <i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	99% <i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>
T2-0	Morfofisiológico Molecular	<i>Cr. uzbekistanensis</i>	96.7% <i>Cr. uzbekistanensis</i>	99% <i>Cr. uzbekistanensis</i>
T4-0	Morfofisiológico Molecular	<i>Cryptococcus</i> sp.	90% <i>Holtermania corniformis</i>	99% <i>Cryptococcus</i> sp.
T4-1	Morfofisiológico Molecular	<i>C. parapsilosis</i>	100% <i>C. parapsilosis</i>	100% <i>C. parapsilosis</i>
T5-1a	Morfofisiológico Molecular	<i>Cr. albidus</i>	99.4% <i>Cr. albidus</i>	100% <i>Cr. albidus</i>
M2-0a, b y c	Morfofisiológico Molecular	<i>Kloeckera apiculata</i> (estado asexual de <i>H. uvarum</i>)	99.3% <i>Hanseniaspora uvarum</i>	100% <i>H. uvarum</i>

CBS: Base de datos Centraalbureau voor Schimmelculture de Holanda (CBS, 2006)

Cuadro 7. Resultados de asimilación de algunos carbohidratos, compuestos de nitrógeno y tolerancia a 10% de NaCl en los aislados de *Candida pararugosa*

diferentes a los presentados en las diagnosis de de las monografías de Barnett *et al.*, (2000) para *C. pararugosa* y *C. rugosa*.

Carbohidratos	aislados (clave inicial)																											
	<i>C. pararugosa</i> Barnett	<i>C. rugosa</i> Barnett	16,osc	16,cla	15,osc	15,cla	2b,osc	2b,cla	22,cla	22a	1a	1c	3	17	17a	25	1b,osc	1b,cla	2e	4	6a	6op	7	8	18	20	21	24
glucosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+d	+	+	+	+	+d	+	+	+	+	+	+d	+	+	+	+
galactosa	+	+ ₂ d	+	-	-	-	+d	-	+d	+	+	+d	+d	+d	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+d	+	-d	+	+
D-xilosa	+	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+d	-	-	-	-	-
glicerol	+	v	d	+d	+	+	+d	+	+d	+d	+	+	+d	+d	+d	+d	+	d	+d	-	+d	-d	+	+	+d	-	-	+
ribitol	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+d	+d	-d	-	-	-	-	-d	-	-	-	-
galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+ ₂ d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucitol	+	+ ₂ d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-lactato	+ ₂ d	v	-	-	-	-	-	-	-d	-d	+	-	-	-	-d	-	-	-	-d	-	-	-d	-d	-	-d	-	-	-
citrato	- ₂ d	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
xilitol	+	v	+d	+d	+d	+d	+d	+d	+	+	+	+	+d	+	+	+d	+	+	+	+	+	+d	+	+	+	+	+	+d
Etilamina	+	+ ₂ d	+d	+d	+d	+d	+d	+d	+d	+d	+d	+	-	+d	+d	+d	+d	+d	+	-	-	-	+d	-	+d	-	+	-
Lisina	+	+	+d	+	+d	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+d	-d	+	+	+	-	+	-	+d	-	-	-	-	-
Tolerancia al 10% NaCl	-	+	-	-	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-d	-	-	-

(+), asimilación positiva; (-), asimilación negativa; (v), asimilación variable; (d), asimilación débil.

Nota. Los aislados señalados en negritas fueron seleccionados para obtener su secuencia de pares de bases de nucleótidos del dominio D1/D2 del gene 26S del ADNr.

Cuadro 8. Resultados de asimilación de algunas carbohidratos y compuestos de nitrógeno en los aislados de *Candida intermedia* diferentes a los presentados en la

diagnosis de las monografías de Barnett *et al.*, (2000).

Compuestos de carbono y nitrógeno	<i>Candida intermedia</i> Barnett <i>et al.</i> , (2000).	Aislados (clave inicial)		
		NM 6b	NM 5	NM 11
D-arabinosa	d,-	+	+	+
DL-lactato	-	d+	d+	d+
Lisina	+	-	-	+

Cuadro 9. Resultados de asimilación de algunas carbohidratos en los aislados de *Candida parapsilosis* diferentes a los presentados en la diagnosis de las monografías de Barnett *et al.*, (2000).

Compuestos de carbono	<i>Candida parapsilosis</i> Barnett <i>et al.</i> , (2000).	Aislados (clave inicial)		
		NM 13	NM 14	NM 23
Trehalosa	+	+	+	-
D-xilosa	+	-	+	-
D-gluconato	+,d	-	+	-

Cuadro 10. Secuencias de bases de aislados de levaduras obtenidos a partir de maíz nixtamalizado molido y de atole agrio de maíz.

1A aislada de nixtamal martajado (NM 1)

Saccharomyces cerevisiae

617 (616/617), 99 % *S. cerevisiae* aislado ESB9 26SrRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaacccaaccgggattgccttagtaacggcgagtgaaagcgcaaaagctcaaattgaaatctggtaccttcggtgcccg
agttgtaatttggagagggaactttggggccgttccttgcctatgttcccttggaaacaggacgtcatagagggtgagaatcccgtgtggcgaggagtgcggtt
ctttgtaaagtgcttcgaagagtcgagttggttgggaatgcagctctaagtggtggtaaatccatctaaagctaaatattggcgagagaccgatagcgaa
caagtacagtgatggaaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaagtagctgaaattggtgaaagggaaagggcattgatcagacatggtggtttgtg
ccctctgctccttggggtaggggaatctcgcatcttctgctggccagcatcagtttgggtggcaggataaatccataggaatgtagcttgctcggttaagat
tatagcctgtgggaatactgccagctgggactgaggactgcgacgttaagtaaggatgctggcataatggttatatgccgcccgtcttgaacacggacca

2A aislada de nixtamal martajado (NM 2b,osc)

Candida pararugosa

587 (587/587) 100% *C. pararugosa* aislado VTT- C-04522 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaacccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaacgggaaaagctcaaattgaaatctgccaacaggccgagttg
taattttagatggctacactgcataatagtagatgctcaagttctttggaaaagacatcatggagggtgacaatcccgtgagggcatggtactaggagcgta
tagtgggctttctaagagtcgagttggttgggaatgcagctcaaagtgctggtgaaatccatgtaaagctaaatattggacgagagaccgatagcgaaacaag
actgtgaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagctgaaattggttaaagtggaagggcttgagatcagaattggtagtttgggttcca
cgtcctctgggggctgactcccttccgaccgggcccagcgggagtttgtctcttgggttaaagcagtggaatgtagcagcttgctgtattatagcctct
gttcatacaagacgtcgggactcgatttgggtggcgaatgatctctagccaccocgtcttgaacacggacca

3A aislada de nixtamal martajado (NM 2b, cla)

Candida pararugosa

587 (587/587) 100% *C. pararugosa* aislado VTT- C-04522 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaacccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaacgggaaaagctcaaattgaaatctgccaacaggccgagttg
taattttagatggctacactgcataatagtagatgctcaagttctttggaaaagacatcatggagggtgacaatcccgtgagggcatggtactaggagcgta
tagtgggctttctaagagtcgagttggttgggaatgcagctcaaagtgctggtgaaatccatgtaaagctaaatattggacgagagaccgatagcgaaacaag
actgtgaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagctgaaattggttaaagtggaagggcttgagatcagaattggtagtttgggttcca
cgtcctctgggggctgactcccttccgaccgggcccagcgggagtttgtctcttgggttaaagcagtggaatgtagcagcttgctgtattatagcctct
gttcatacaagacgtcgggactcgatttgggtggcgaatgatctctagccaccocgtcttgaacacggacca

4A aislada de nixtamal martajado (NM 2c,1)

Candida tenuis

Candida sp.

577 (573/573) 100% *Candida* sp. aislado CBS 7880 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaacccaacagggattgccttagtagcggcgagtgaaagcgcaaatagctcaaattgaaatctggcgcccttcggtgtccg
agttgtaatttgaagaaggtatctttgggtttggctctgtctatgttcccttggaaacaggacgtcatagagggtgagaatcccgtgagataagatgcccaatt
ccatgtaaagttccttcgacgagtcgagttggttgggaatgcagctctaagtggtggtaaatccatctaaagctaaatattggcgagagaccgatagcgaa
caagtacagtgatggaaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaagtagctgaaattggtgaaagggaaagggcttgaggtcagactcggtttaccggg
ccagcatcagtttgaacggcaggataatggcgtaggaatgtggctccacttcggtggagtggtatagactgcgttgatactgctgttttagactgaggactgc
gtcctttgactaggatgctggcataatgaccttaagccgcccgtctggaanaaccacggacca

5A aislada de nixtamal martajado (NM 2c, 3)

Candida tenuis

Candida sp.

574 (573/573) 100% *Candida* sp. aislado CBS 7880 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattgccttagtagcggcgagtgaaagcggcaaatagctcaaattgaaatctggcgcttcggtgtc
cgagttgtaatttgaagaaggtatctttgggtttggctcttgtctatgttccttggaaacaggacgctcatagaggggtgagaatcccgtgagataagatgccc
aatccatgtaaaagttccttcgacgagtcgagttggttgggaatgcagctctaagtgggtggtaaattccatctaaaagctaaatattggcgagagaccgat
agcgaacaagtagcagtgatggaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaaagtagcgtgaaattggtgaaagggagggtttaggtcagactcggg
ttaccgggccagcatcagtttgaacggcaggataatggcgtaggaatgtggctccacttcggtggagtggttagactgcggtgatactgcctggttagac
tgaggactgcgctcttgactaggatgctggcataatgaccttaagccgccctcttgaaacacggacca

6A aislada de nixtamal martajado (NM 2d)

Candida famata var. *famata*

616 (614/614), 100% *D. hansenii* aislado CECT 10661 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattgccttagtaacggcgagtgaaagcggcaaaagctcaaattgaaatctggcaccttcggtgtc
cgagttgtaatttgaagaaggttaactttggagttggctcttgtctatgttccttggaaacaggacgctcacagaggggtgagaatcccgtgagataagatgccc
aatctctatgtaaaagtgctttcgaagagtcgagttggttgggaatgcagctctaagtgggtggtaaattccatctaaaagctaaatattggcgagagaccgat
agcgaacaagtagcagtgatggaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaaagtagcgtgaaattggtgaaagggagggtttagatcagacttggg
atcttgcgatccttctctcttgggttgggttccctcgcagcttactggccagcatcgggttggatggttaggataatgactaaggaatgtggctctacttcg
gtggagtggtatagccttgggtgatactgcctgtctagaccaggactgcgctctttgactaggatgttggcataatgatcttaagccaccctcttga
cacggacca

7A aislada de nixtamal martajado (NM 2e)

Candida pararugosa

587 (584/586) 100% *C. pararugosa* aislado UWFP 348 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaacgggaaaagctcaaattgaaatctgccaacaggccgagt
tgtaattttagatggctacactgcataatagtagatgctcaagttctttgaaaagacatcatgggggtgacaatcccgtgagcatgttactaggag
catatagtgggctttcctaagagtcgagttggttgggaatgcagctcaaagtcggtggtgaataccatgtaaaagctaaatattggacgagagaccgatagcga
acaagtagctgtgaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagcgtgaaattggttaaagtggaagggtttagatcagaattggtagttt
gggttccacgctccttggggcgtgtactcctttccaccgggccagcggaggttctgctctcttgggtaaaagcagtggaatgtagcagcttgtctgtat
tatagcctctgttcatacaagacgctcgagactcgatgttggcgtaatgatcttagccaccctcttgaaacacggacca

8A aislada de nixtamal martajado (NM 5)

Candida intermedia

565 (560/563) 99% *C. intermedia* aislado VTT C-04520 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattgcctcagtaacggcgagtgaaagcggcaaaagctcaaattgaaatccttcgggagttgtaat
ttgtaggttgggagaccgccggttagtgccaccaagtccttggaaacaggcgccttagaggggtgagagcccgttaggtaccacgacgcccgtcttgtgt
ctcctctccaaagagtcgagttggttgggaatgcagctcaaagtggtggtaaattccatctaaaagctaaataccggcgagagaccgatagcgaacaagta
cagtgatggaagatgaaaagcactttgaaaagagagtgaaacagtagcgtgaaattggtgaaagggagggttgcagcagacacggccttcgtgcccggg
ccagcatcgggttctaggggtgataaggaacaaggaatgtagctcctcggagtattatagccttgccgatacacccactggcgaccgaggtcctgcgga
ttctttacctaggatgctggcgtaatggttgaacggccctcttgaaacacggacca

9A aislada de nixtamal martajado (NM 7)

Candida pararugosa

588 (586/586) 100% *C. pararugosa* aislado VTT C-04522 26S rRNA

gcataatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatctgccaacaggccga
gttgaattttgtagatggctacactgcataatagtagatgctcaagttctttggaaaagacatcatggagggtgacaatcccgtgagcatgttacta
ggagcgtatagtggttcttaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtcggtggaataccatgtaaaagctaaatattggacgagagaccga
tagcgaacaagtagctgtgaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagctgaaattgttaaagtggaagggttgagatcagaatt
ggtagtttgggttccacgtcctcttggggcgtgtaactccctttcgaccgggcccagcgggagttttgtctcttgggtaaaagcagtggaatgtagcagc
ttgtctgtattatagcctctgttcatacaagacgtcgggactcgatttgttggcgtaatgatctctagccaccctctgaaacacggaccaa

10A aislada de nixtamal martajado (NM 11)

Candida intermedia

564 (560/563) 99% *C. intermedia* aislado VTT C-04520 26S rRNA

gcataatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattgcctcagtaacggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatccttcgggagttgta
at ttgtaggttgggagaccccgggctagtgccaccaagtcctttggaacagggcgcttagagggtagagaccccgtaggtaccacgacgcccgtcttt
gtgtctcctctccaaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtcggtggaataatccatctaaagctaaataccggcgagagaccgatagcga
caagtagcagtgatggaagatgaaaagcactttgaaaagagagtgaaacagtagctgaaattgttgaaagggaagggttgcaagcagacacggcctc
gtgccggccagcatcggttgctaggggtggataaggaaacaaggaatgtagctcctcgggagttatagccttgccgataaccactggcgaccgag
gcctgcggtattctttacctaggtgctggcgtaatggttgcaagcccccgtcttgaacacggacca

11A aislada de nixtamal martajado (NM 14)

Candida parapsilosis

590 (587/588) 99% *C. parapsilosis* aislado EXOC16 26S rRNA

gaggaggaaaagaaaccaacagggattgccttagtagcggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatctggcactttcagtgctccgagttgtaa
tttgaagaaggtatctttgggtctggctcttctgtctatgtttcttggaaacagacgtcacagagggtagaatacccgtgagatgagatgtcccagacccta
tgtaaagttccttcgaagagtcgagttgtttgggaatgcagctctaagtcggtggaataatccatctaaagctaaatattggcgagagaccgatagcga
acaagtagcagtgatggaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaaagtagctgaaattgttgaaagggaagggttgagatcagacttggtatt
ttgtatgttactctctcgggggtggcctctacagtttaccgggcccagcatcagtttggggcgtaggacaattgcaaagaaatgtggcactgcctcggt
gtgtgttatagctcttctgcgatactgccagcctagactgaggactgcggcttcggcctaggatgttggcataatgatcttaagtcgccctctgg

12A aislada de nixtamal martajado (NM 17a)

Candida pararugosa

589 (578/579) 99% *C. pararugosa* aislado VTT C-04522 26S rRNA

gcataatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatctgccaacaggccga
gttgaattttgtagatggctacactgcataatagtagatgctcaagttctttggaaaagacatcatggagggtgacaatcccgtgagcatgttacta
ggagcgtatagtggttcttaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtcggtggaataccatgtaaaagctaaatattggacgagagaccga
tagcgaacaagtagctgtgaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagctgaaattgttaaagtggaagggttgagatcagaatt
ggtagtttgggttccacgtcctcttggggcgtgtaactccctttcgaccgggcccagcgggagttttgtctcttgggtaaaagcagtggaatgtagcagc
ttgtctgtattatagcctctgttcatacaagacgtcgggactcgatttgttggcgtaatgatctctagccaccctctgaaacacggaccaa

13A aislada de nixtamal martajado (NM 22a)

Candida pararugosa

580 (575/575) 100% *C. pararugosa* aislado VTT C-04522 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatctgccaacaggccg
agttgtaattttagatggctacactgcataatagtagatgctcaagtctcttggaaaagacatcatggagggtgacaatcccgtagggcatgttac
taggagcgtatagtggtcttctaagagtcgagttgttgggaatgcagctcaaagtgcggtggaataccatgtaaagctaaatatggacgagagac
cgatagcgaacaagtagtggaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagctgaaatgttaaagtggaaggccttgagatcag
aatggtagtttgggttccacgctcctctgggggctgtactcccttccgaccgggcccagcgggagtttctctcttgggtaaaagcagtggaatgta
gcagcttctgtattatagcctctgttcatacaagacgctcgggactcgatttgttggcgtaatgatctctagccaccgctcttgaaaa

14A aislada de nixtamal martajado (NM 23)

Candida parapsilosis

606 (599/600) 99% *C. parapsilosis* aislado EXOC16 26SrRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattgccttagtagcggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatctggcacttctcagt
gtccgagttgtaatttgaagaaggtatcttgggtctggctctgtctatgttcttggaaacagaacgctcacagagggtgagaatcccgtagcgatgag
atgtcccagaccatgtaaaagtctctcgaagagtcgagttgttgggaatgcagctctaagtggtgtaaatccatctaaagctaaatatggcg
agagaccgatagcgaacaagtagtggaagatgaaaagaacttggaaagagagtgaaaaagtagctgaaatgttgaaggggaaggccttga
gatcagacttggatattttagtactctctcgggggctcctcagcttaccgggcccagcagctcagtttgggctaggacaattgcaaaagaaat
gtggcactgcctcggtagtggttatagcttctgctgatactgccagcctagactgaggactcgggctcggcctaggatgttggcataatgatctta
agtcgcccgtctgaaaa

15A aislada de nixtamal martajado (NM 24)

Candida pararugosa

578 (576/578) 99% *C. pararugosa* aislado UWFP-348 26SrRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacagggattcccttagtaacggcgagtgaaaccgggaaaagctcaaatttgaaatctgccaacaggccg
agttgtaattttagatggctacactgcataatagtagatgctcaagtctcttggaaaagacatcatggagggtgacaatcccgtagggcatgttac
taggagcgtatagtggtcttctaagagtcgagttgttgggaatgcagctcaaagtgcggtggaataccatgtaaagctaaatatggacgagagac
cgatagcgaacaagtagtggaaggaaagatgaaaagcactccgaaaggagagtgaaatagtagctgaaatgttgaaggggaaggccttgagatcag
aatggtagtttgggttccacgctcctctgggggctgtactcccttccaccgggcccagcgggagtttctctcttgggtaaaagcagtggaatgta
gcagcttctgtattatagcctctgttcatacaagacgctcagactcgatttgttggcgtaatgatctctagccaccgctcttgaaaa

16A aislada de atole agrio, muestra 2, 72 h de fermentación (M2-0a)

Kloeckera apiculata

608 (607/607) 100% *Hanseniaspora uvarum* aislado HA 1670 ITS1,5.8S rRNA, ITS2 y 26S rRNA

gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaactgggattaccttagtaacggcgagtgaaaccgggtaaaagctcaaatttgaaatctggtacttctcagt
gcccagagttgtaattttagaatttcttctttagtaggtccttctgtctatgttcttggaaacaggacgctcatagagggtgagaatcccggttggcgagg
ataccttttctttagtaagacttttccgaagagtcgagttgttgggaatgcagctcaaagtggtgtaaatccatctaaagctaaatatggcgag
agaccgatagcgaacaagtagtggaagatgaaaagaacttggaaagagagtgaaaaagtagctgaaatgttgaaggggaaggcatttga
tcagacatgggtgttttctgcatgcactcgcctctcgtgggcttgggctctcaaaaatttcaactgggccaacatcaattctggcagcaggataaatca
ttaagaatgtagctactcggtagtggttatagcttttggaaactgttagccgggattgaggactgcgcttccggcaaggatgttggcataatggtta
aatgcccacatctgaaaa

17A aislada de atole agrio, muestra 2, 72 h de fermentación (M2-0b)

Kloeckera apiculata

608 (607/607) 100% *H. uvarum* aislado HA 1670ITS1,5.8S rRNA, ITS2 y 26S rRNA

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaactgggattaccttagtaacggcgagtgaaagcgtcaaatttgaaatctggtactttcagt
gcccagagttgtaattttagaatttgtctttgattaggtccttgtctatgttccttggaaacaggacgctcatagagggtgagaatcccgtttggcgagg
ataccttttctttgtaagactttttcgaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtggtgtaaatccatctaaagctaaatattggcgag
agaccgatagcgaacaagtacagtgatggaaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaaagtagctgaaattgttgaaaggggaagggcatttga
tcagacatggtgtttttgcatgcactcgcctctcgtgggcttgggctctcaaaaatttctactgggccaacatcaattctggcagcaggataaatca
ttaagaatgtagctacttcggtagtggttatagcttttggaaactgttagccgggattgaggactgcgcttcggcaaggatggtggcataatggtta
aatgcccggccttggaaa
```

18A aislada de atole agrio, muestra 1, 11h de fermentación (T4-1)

Candida parapsilosis

600 (600/600) 100% *C. parapsilosis* aislado ESAB2 26S rRNA

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaaccaacaggattgccttagtagcggcgagtgaaagcgtcaaatttgaaatctggcactttcagt
gtccgagttgtaatttgaagaaggtatctttgggtctggctctgtctatgtttcttggaaacagaacgctcacagagggtgagaatcccgtgcatgag
atgtcccagaccatgtaaaagttccttcgaagagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtggtgtaaatccatctaaagctaaatattggcg
agagaccgatagcgaacaagtacagtgatggaaagatgaaaagaactttgaaaagagagtgaaaaagtagctgaaattgttgaaaggggaagggcttga
gatcagacttggtattttgtatgttactctctcgggggtggcctctacagtttaccgggccaacatcaattctggcagcaggataaatgcaaaagaaat
gtggcactgcttcggtagtggttatagcttttgcgataactgccagcttagactgaggactgcggcttcggcctaggatggtggcataatgatctta
agtcgcccgtct
```

19B aislada de atole agrio, muestra 1, tiempo cero, 0h de fermentación (T0-0)

Cryptococcus uzbekistanensis

631 (620/622) 99% *Cry. uzbekistanensis* aislado CBS8683 26S rRNA

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaactaacaaggattccccttagtaacggcgagtgaaagcgggaagagctcaaatttgaaatctggtagccttcgg
ctgcccagagttgtaacttagagaaggtgttttccgtgcccgcctatgtacaagtccttggaaacaggcgtcatagagggtgagaatcccgtccttgac
atggacccccgggtgctttgtgatacactttcaacgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtgggtggtgaattccatctaaagctaaatattg
gcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaaagagagtgaaacagtagctgaaattgttgaaagggaaacgat
tgaagtcagtcagctctttggattcagccgttctgcggtgtatttccattgagtggggtcaacatcagttttgaccgctggataaaggcactaggaa
ggtagcactctcgggtgaaacttatagcctagcgtcatatacagtggttgggactgaggaacgcagcatgcctttatggccgggattcgtccacgtaca
tgcttaggatggtgacataatggctttaaagcaccctccttga
```

20B aislada de atole agrio, muestra 1, tiempo 2, 6h de fermentación (T2-0)

Cryptococcus uzbekistanensis

635 (624/626) 99% *Cry. uzbekistanensis* aislado CBS8683 26S rRNA,

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaactaacaaggattccccttagtaacggcgagtgaaagcgggaagagctcaaatttgaaatctggtagccttcgg
ctgcccagagttgtaacttagagaaggtgttttccgtgcccgcctatgtacaagtccttggaaacaggcgtcatagagggtgagaatcccgtccttgac
atggacccccgggtgctttgtgatacactttcaacgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaagtgggtggtgaattccatctaaagctaaatattg
gcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaaagagagtgaaacagtagctgaaattgttgaaagggaaacgat
tgaagtcagtcagctctttggattcagccgttctgcggtgtatttccattgagtggggtcaacatcagttttgaccgctggataaaggcactaggaa
ggtagcactctcgggtgaaacttatagcctagcgtcatatacagtggttgggactgaggaacgcagcatgcctttatggccgggattcgtccacgtaca
tgcttaggatggtgacataatggctttaaagcaccctccttga
```

21B aislada de atole agrio, muestra 1, tiempo 5, 24h de fermentación (T5-1a)

Cryptococcus albidus

619 (618/618) 100% *Cry. albidus* aislado ATCC 10666 26S rRNA gene,

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaactaacaaggattcccctagtaacggcgagtgaaagcgggaagagctcaaatttgaaatctggtagcct
tcggttgcccagattgtaaatctagagaagtgtttccgctgcccggccatgtacaagtcccttggaaacagggcgctcatagagggtgagaatcccg
tccttgacatggacccccgggtgctttgtgatacactttcaacgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtaattccatctaa
agctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagagagttaaacagtcagtgaaattg
ttgaaagggaaaacgattgaagtcagtcagtcgctctgggacttacctcccttgagtggggtcaacatcagttttgatcgatggaataaagcagcg
ggaaggtagcactctcgggtgaaacttatagcctcgctcatatcattgatgggactgaggaacgcagcatgccttatggccgggattcgtcc
acgtacatgcttaggatggtgacataatggctttaaacgaccctcttgaaacac
```

22B aislado de atole agrio, muestra 1, tiempo 4, 11h de fermentación (T4-0)

Cryptococcus sp.

636 (635/636) 99% *Cryptococcus* sp. aislado VTT C-04547 26S ribosomal RNA

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaactaacaaggattcccctagtaacggcgagtgaaagcgggatgagctcaaatttgtaaatctggtagcct
cagttcatcccgaattgtaaatctatagaaaagtgtttccgctgcccggccatgtacaagtcccttggaaacaggggtgctcagagagggtgagaatcccg
tgcttgatacgcaccaccagtgctatgtgatacacttttcaacgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtaaatccatctaaa
gctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagagagttaaacagtcagtgaaattgt
taaaagggaaaacgattgaagtcagtcgctctctagtagcagccagttctctgggtgatttccctagtgcaggggtcaacatcagtttagat
cgctggataaaggtcattaggaatgtggctcccctcgggagtggttatagcctagtgtcgcatacagtggttttagactgaggaacgcagctcgctt
tatggccggggttcgcccacgtgcccagcttaggatggtgacataatggctttaaacgaccctcttgaaac
```

23B aislado de nixtamal martajado (NM 2a, lis)

Trichosporon cutaneum

634 (626/634) 98% *T. cutaneum* aislado ESAB19 26S rRNA

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaactaacaaggattcccctagtaacggcgagtgaaagcgggaagagctcaaatttgaaatctggctgtct
tcgatagtcggagttgtaaatctatagacgtgtttccgctgctggaccgtatctaagtcccttggaaacaggggtatcaaagaggggtgacaatcccg
tgcttgatacgcaccaccagtgctctgtgatacagctctacgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtaaatccatctaaa
gctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagagagttaaacagtcagtgaaattgt
tgaaagggaaaacgattgaagtcagtcgctgttctcagattcagctggttctccagctcactctctgttgaaacgggtcaacatcagttttgtccg
gtggataaaggtagtaggaatgtgacttctccggaagtggtatagcctattatgcatacactgggtgagactgaggactgcagctcgctctt
ggccggccctcgggacgttcgagcttaggatggtgacataatggctttaaacgaccctcttgaaacac
```

24B aislado de nixtamal martajado (NM 9 rug)

Cryptococcus curvatus

Cryptococcus sp.

636 (630/636), 99% *Cryptococcus* sp. aislado IFM 54862 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 26S rRNA

```
gcatatcaataagcggaggaaaagaaactaacaaggattcccctagtaacggcgagtgaaagcgggaagagctcaaatttgtaagctggcagctct
tcgattgtccgcaattgtaaatctatagacgtgtttccgctgctggatcgatctaagtcccttggaaacaggggtatcaaagaggggtgataatcccg
tacttgatacacaaccaccagtgctctgtgatacagttctacgagtcgagttgtttgggaatgcagctcaaaatgggtggtaaatccatctaaa
gctaaatattggcgagagaccgatagcgaacaagtaccgtgagggaaagatgaaaagcactttggaaagagagttaaacagtcagtgaaattgt
tgaaagggaaaacgattgaagtcagtcgctgttcatggattcagctagctctgctagctcacttcccttgaacgggtcaacatcagttttgtcca
gtggataaagatggtaggaatgtgacttccctcgggaaagtggttatagcctgctattgcatacactgggtgagactgaggactgcagctcgctt
ttggccgggtcttcggacagttcagcttaggatggtgacataatggctttaaacgaccctcttgaaacac
```

Cuadro 10. Continuación.

25B aislado de nixtamal martajado (NM 9 rug)

Cryptococcus curvatus

Cryptococcus sp.

636 (630/636) 99% *Cryptococcus* sp. aislado IFM 54862 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA ITS2, 26S rRNA



Fig 1-2. San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Puebla, México. **Figs. 3-8.** Elaboración del atole agrio de maíz estudiado: **3.** Molienda de maíz nixtamalizado. **4-6.** Dilución y cocción de la masa de nixtamal en agua. **7.** Hojas de *Ageratum corymbosum*. **8.** Pasta hecha con hojas de *Ageratum corymbosum*, cal y un poco de agua.



Fig 9-13. Elaboración de atole agrio de maíz: **9-10.** Atole de masa cocido, vaciado en cántaro de barro con la pasta de hierba con cal añadida. **11.** Brazas de carbón ardiendo colocadas en el atole. **12.** Cántaro tapado con hojas de plátano, maíz y saúco colocado sobre aserrín. **13.** Cántaro cubierto con prendas de vestir y con sifón adaptado para la colecta de muestras. **Fig. 14.** Habitante de San Andrés Tzicuilan con la planta *Ageratum corymbosum*. **Fig. 15.** Cántaros con atole de maíz en proceso de fermentación. **Fig. 16.** Atole agrio de maíz servido en vasos.

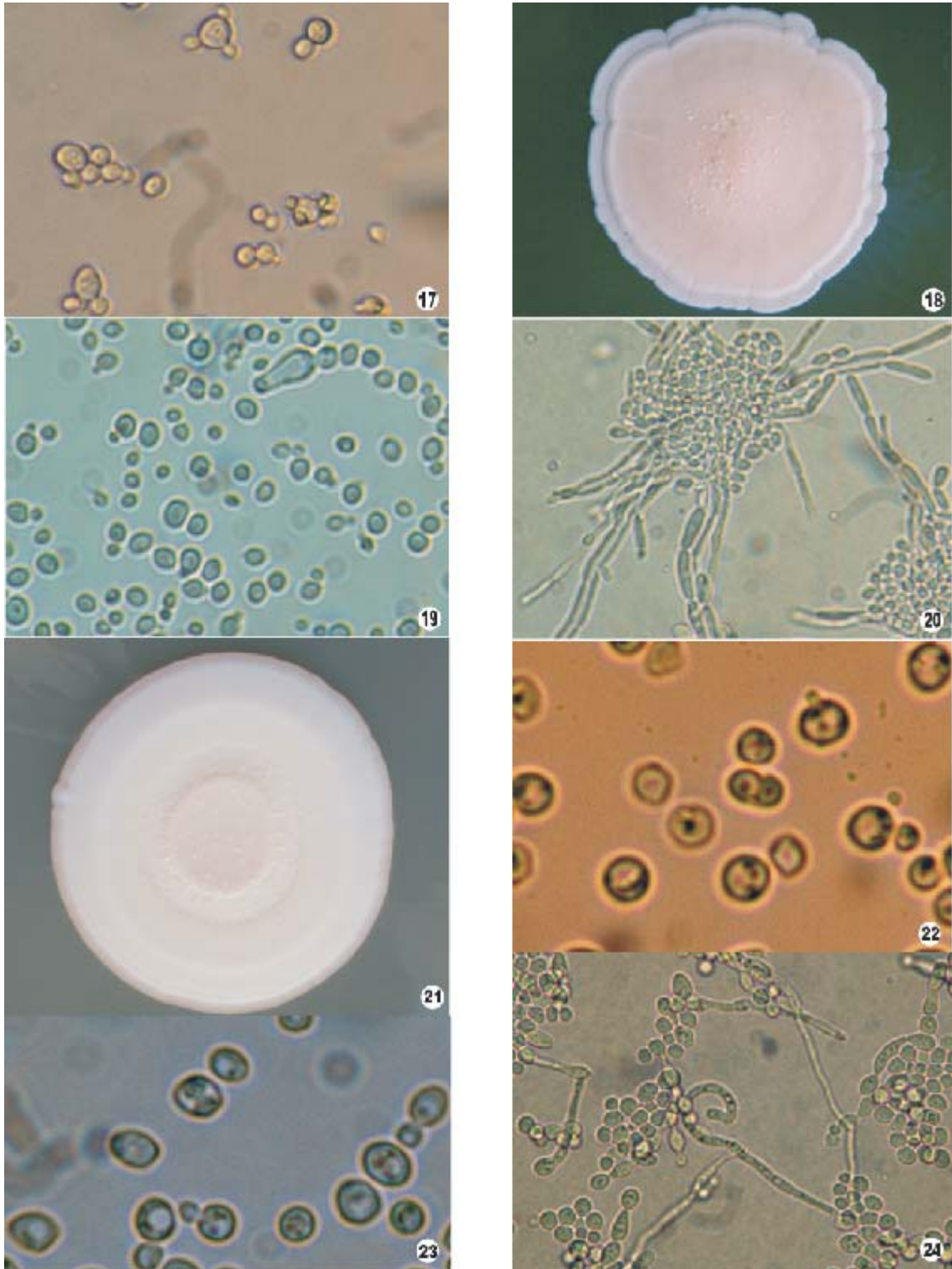


Fig 17. *Candida pararugosa*. Células vegetativas, después de 3 días de incubación en PDA a 25°C, X800. **Fig. 18.** *C. famata* var. *famata*. Colonia gigante después de 1 mes de incubación en GELPA a 25°C, X1.0. **Fig. 19.** *C. intermedia*. Células vegetativas, después de 3 días de incubación en placa de Dalmou de PDA a 25°C, X800. **Fig. 20.** *C. parapsilosis*. Seudomicelio después de 3 días de incubación en placa de Dalmou de PDA a 25°C, X800. **Fig. 21.** *C. tenuis*. Colonia gigante después de 1 mes de incubación en GELPA a 25°C, X1.0. **Fig. 22.** *Pichia galeiformis*. Asca después de 3 días de incubación en McClary-agar a 25°C, X800. **Fig. 23.** *Saccharomyces cerevisiae*. Asca después de 3 días de incubación en McClary-agar a 25°C, X800. **Fig. 24.** *Cryptococcus curvatus*. Seudomicelio después de 3 días de incubación en placa de Dalmou de PDA a 25°C, X800.

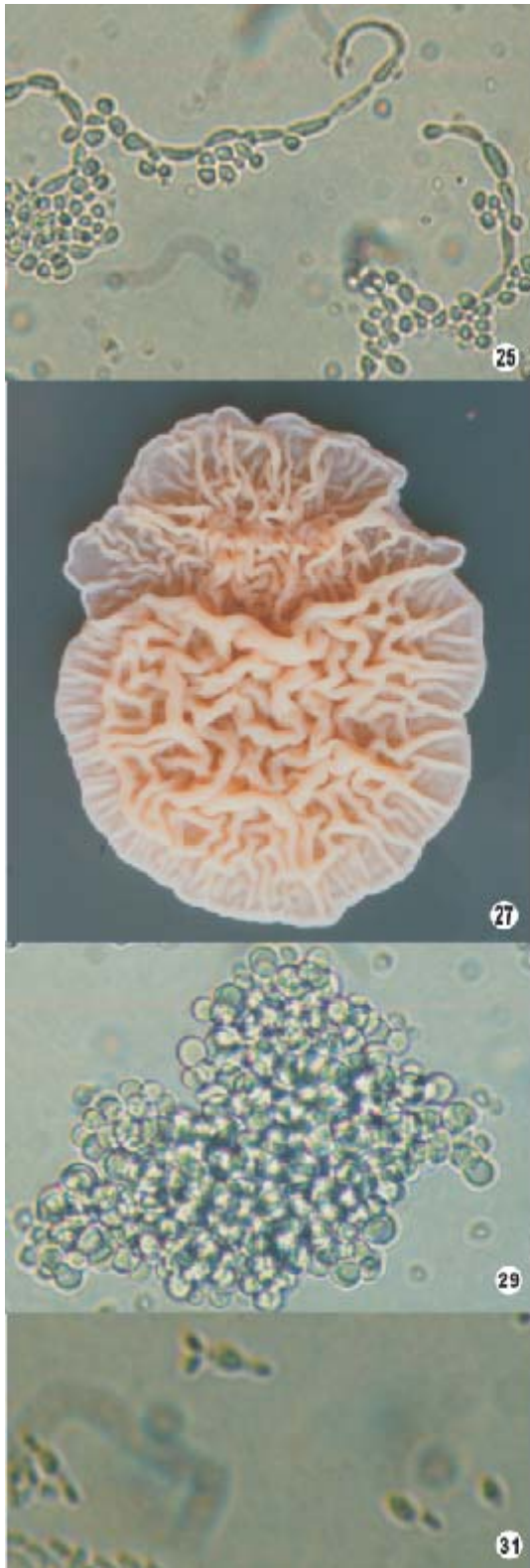


Fig 25,27. *Cr. curvatus*: **25.** Seudomicelio después de 3 días de incubación en placa de Dalmau de PDA a 25°C, X800. **27.** Colonia gigante después de 1 mes de incubación en GELPA a 25°C, X1.0. **Fig. 26,28.** *Trichosporon cutaneum*:**26.** Colonia gigante después de 1 mes de incubación en GELPA a 25°C, X1.0. **28.** Hifas desarticuladas en artroconidios después de 3 días de incubación en placa de Dalmau de PDA a 25°C, X800. **Fig. 29.** *Cr. uzbekistanensis*. Células vegetativas después de 3 días de incubación en placa de Dalmau de PDA a 25°C, X800. **Fig. 30.** *Cryptococcus* sp. Colonia gigante, después de 1 mes de incubación en GELPA a 25°C, X1.0. **Fig. 31.** *Kloeckera apiculata*. Células vegetativas después de 3 días de incubación en PDA a 25°C, X800. **Fig. 32.** *Cr. albidus*. Colonia gigante, después de 1 mes de incubación en GELPA a 25°C, X1.0.

LITERATURA CITADA

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI_BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acid Research* 25:3389-3402.

Armijo de Vega, C., Taboada, J., Lappe, P. y Ulloa, M. 1991. Productos de fermentación por tибicos y levaduras asociadas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 33(1):17-23.

Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow. 2000. *Yeasts: Characteristics and identification*. 3a ed. University Press, Cambridge.

Calderon-Villagómez A. y Herrera, T. 1989. Levaduras del pozol blanco y del pozol de mamey de la zona lacandona de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Micología* 5:211-215.

Castillo H. A. 2000. El mundo del color en Cuetzalan, un estudio etnocientífico en una comunidad nahua. Colección Científica, Serie Etnología, INAH, México.

(C.B.S.) Centraalbureau voor Schimmelculture, 2006. Base de datos para la identificación de levaduras, Holanda. Página web. <http://www.cbs.knaw.nl/>.

Ceccato-Antonini, S., Moreira, L., Regenfuss, Ch. 1999. "Killer" character of yeasts isolated from ethanolic fermentations. *Scientific Agriculture* 56(3): 124-128. <http://www.scielo.br/scielo.php>.

CEPEC (Centro de estudios y promoción educativa para el campo), 1994. Taller de Tradición Oral de la Sociedad Agropecuaria, Les oímos contar a nuestros abuelos, etnohistoria de San Miguel Tzinacapan, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Colección de Divulgación, México.

Cruz Ulloa, S. y Ulloa, M. 1973. Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y en otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 34:423-457.

Deák, T. 2002. Application of molecular techniques in wine microbiology. *Akadémiaim Journal of Kiadó* 31(1): 37-44.

Fell, J. Boekhout, T. Fonseca, A. Scorzetti, G. y Statzell-Tallman, A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1351-1371.

Fonseca, A. Scorzetti, G. y Fell, J. W. 2000. Diversity in the yeasts *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 46(1): 7-27.

Gispert, M., N. Diego, J. Jiménez, A. Gómez, J. M. Quintanilla y L. García. 1976. Un nuevo enfoque en la metodología etnobotánica en México, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Hayford, A., Jespersen, L. 1999. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation, chromosome polymorphism, PCR and MAI genotyping. *Journal of Applied Microbiology* 56: 2, 284-294.

Herrera, T. y Calderón-Villagómez, A. 1989. Especies de levaduras aisladas en México del hongo del té. *Revista Mexicana de Micología* 5:205-210.

Herrera, T. y Ulloa, S. 1971. Study of *Candida krusei* and *Trichosporon cutaneum* isolated from pozol. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 13(4): 255-261

Hernández, E. 1985. Exploración etnobotánica y su metodología. *En*. Obras de Efraim Hernández Xolocotzi, Revista de Geografía Agrícola, Vol. 1, Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, XI Censo de Población y Vivienda, 1990, México 1993.

Jespersen, L., Halm, M., Kpod, K., Jakobsen, M. 1994. Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for “kenkey” production. *International Journal of Food Microbiology* 24 (1-2) : 239-248.

Jespersen, L. 2003. Occurrence and taxonomic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in african indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Research* 3(2): 191-200

Konlani, S., Delgenes, J., Moletta, R. Traore, A. Doh, A. 1996. Isolation and physiological characterization of yeasts involved in sorghum beer production. *Food Biotechnology* 10 (1): 29-40.

Kosse, D., Seiler, H., Amann, R., Ludwig, W., Sherer, S. 1997. Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Systematic and Applied Microbiology* 20 (3): 468-480.

Kreger-van Rij, N. J. W. 1984. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 3a ed. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C.P. 1998. Nuclear DNA hybridization: Quantitation of close genetic relationships. En Kurtzman, C.P. y J. W. Fell. Eds. 1998. *The Yeasts: A taxonomic Study*, 4a ed. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C.P. y J. W. Fell. 1998. *The Yeasts: A taxonomic Study*, 4a ed. Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman , C. P. y C. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from análisis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(4): 331-371.

Lachance, M. A. 1995. Yeasts communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 68:151-160.

Lappe, P. y Ulloa, M. 1989. Estudios microbianos y químicos del tesquino tarahumara, Publicación especial, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, p.9.

Lappe, P., Ulloa, M. Herrera, T. 1989. Estudio de cinco especies de levaduras del pulque y comparación de la microbiota de esta bebida con la de otras semejantes del mundo. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Series de Botánica* 59(1): 31-48

Lappe, P., Ulloa, M. 1993. Microbiología del pulque. *In*: Wachter, C. y P.Lappe (Eds.), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., pp. 75-79.

Lima, C. Orsi, R., Dilkin, P. Correa, B. 2000. Mycoflora and aflatoxigenic species in derivatives of milled rice. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 20(1): 37-39

Lisichkina, T., Babeva, C., y Sorokin, S. 2003. Alkalitolerant yeast from natural biotyps. *Mikrobiologiya* 72(5): 695-698.

Ludwig, W. y Schleifer, K. H. Bacterial phylogeny base on 16S and 23S rRNA sequence análisis. *FEMS Microbiology Reviews* 15:155-175.

Martínez-Alfaro, M. A. 1993. Notas etnobotánicas sobre las plantas alimenticias y fermentaciones en la Sierra Norte de Puebla, México. En: Wachter, C. y P. Lappe (Eds.), *Alimentos fermentados indígenas de México*, Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., pp. 43-45.

Martínez, A. M., Evangelista, O. V., Mendoza, C. M., Morales, G. G., Toledo, O. G. y Wong, L. A. 1995. Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. Cuadernos del Instituto de Biología, No. 27, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Masoud, W., Bjorg, L., Jaspersen, L., Jakobsen, M. 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East África determinen by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21(7): 549-556

McCarthy, S. y Damoglou, A. 1996. The effect of the substrate on the radiation resistance of yeast isolated from sausage meat. *Letters of Applied Microbiology* 22(1): 80-84

Meroth, C., Hammes, W., Hertel, C. 2004. Characterization of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 27(1-2): 151-159

Middelhoven, W. J. 2002. Identification of yeasts present in sour fermented foods. *Molec. Biotechnology* 21 (3): 279-292.

Moreno-Terrazas, C. R. D. 2005. Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.

Nava-Guzmán, A., Lappe, P., Wachter, C., Vázquez, R. y F. Ruiz-Terán. 2000. Microbial and biochemical changes during the fermentation of a sour maize gruel prepared in Cuetzalan, Puebla, México. En: Van Dijken, J. P. and W. A. Scheffers (Eds.), *Abstracts of the Tenth International Symposium on Yeasts, ISY 2000, The Rising Power of Yeasts in Science and Industry*. Delft University Press, Papendal, Arnhem, The Netherlands.

Nielsen, D., Honholt, S., Tano-Debrah, K., Jaspersen, L. 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast* 22(4): 271-284

Nout, P., Platis, T., Wicklow, A. 1997. Biodiversity of yeasts from Illinois maize. *Canadian Journal of Microbiology* 43(4): 362-367

Orberá, T. 2004. Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Rev. Cubana de Salud Pública* 30(3), www.redalyc.org

Rubio, T., Lappe, P. Wachter, C. 1993. Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos. En: Wachter, C. y P. Lappe (Eds.), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., pp. 93-101.

Ruíz, L. A. 1991. Cafecultura y economía en una comunidad totonaca. Colección Presencias, Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Instituto Nacional Indigenista, México, D. F.

Sánchez, J., Flores, S., Escobar, O. 1993. La fermentación del cacao. *En*: Wachter, C. y P.Lappe (Eds.), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad

Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., pp. 81-85.

Sauni, A., Sefa-Dedeh, S., Sakyi-Dawson, E., Asiedu, M. 2002. Microbiological evaluation of Ghanaian maize dough co-fermented with cowpea. *International Journal of Food Science Nutrition* 53 (5): 367-373

Schwan, T. Mendonca, S., De Silva, J. 2001. Microbiology and physiologic characterization of Cachaca (aguardiente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek* 79 (1): 89-96

Secretaría de Gobierno (SEGOB), 2000. Sistema Nacional de Información Municipal. México

Spanemberg, A., Hartfelder, C., Meneghello, A., Valente, P. 2004. Diversity and enzyme production by yeasts isolated from milk in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae* 32(3): 195-199.

Sulma M., Steenson, L., Kirleis, A. 1991. Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese Kisra. *Applied and Environmental Microbiology* 57(9): 2529-2553.

Tapia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M. Larqué-Saavedra, A. y D. Pérez-Brito. 2006. A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* 33:67-70.

Torija, M., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J., Mas, A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4): 345-352.

Valderrama Rouy, P. y C. Ramírez-Suárez. 1993. Alimentos de maíz y fermentados en Cuetzalan, Puebla. En: Wachter, C. y P. Lappe (Eds.), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., pp. 63-67.

Vaughan-Martini, P., Angelini, D. y Cardinali, G. 2000. Use of conventional taxonomy electrophoretic karyotyping and DNA-DNA hybridization for the classification of fermentative apiculate yeasts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:1665-1672.

Viniegra, G. 1993. Oportunidades para las fermentaciones indígenas del maíz. En: Wachter, C. y P. Lappe (Eds.), *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., 29-33.

Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M. y Owens, D. 2000. Microbiology of indian and mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology* 17: 251-256.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. En. Kurtzman, C. P. and J. W. Fell (Eds.), *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 4a ed. Elsevier, Amsterdam.