



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LAS LEVADURAS DE LOS TIBICOS
Y DE LA MADRE DEL VINAGRE

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

LAURA AURORA ESTRADA CUELLAR

MEXICO, D. F.

1 9 8 5



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 está 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.

C O N T E N I D O

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIALES Y MÉTODOS	
Origen de las muestras de típicos y de madre del vinagre estudiadas	16
Aislamiento de las cepas de levaduras	17
Metodología usada para determinar las caracte- rísticas morfológicas y fisiológicas de las levaduras estudiadas	18
RESULTADOS Y DISCUSION	
Características morfológicas de las especies de levaduras identificadas: <u>Brettanomyces</u> <u>intermedius</u> y <u>Saccharomyces cerevisiae</u> (de típicos); <u>Zygosaccharomyces bailii</u> y <u>Pichia membranaefaciens</u> (de madre del vina- gre)	38
Características fisiológicas y bioquímicas de las especies de levaduras identificadas	40
LITERATURA CITADA	45

RESUMEN

Esta tesis se refiere al aislamiento, estudio e identificación de varias especies de levaduras que forman parte de dos asociaciones biológicas distintas, conocidas en México como tибicos y madre del vinagre, utilizadas popularmente para elaborar bebidas fermentadas (tepache, vinagre) o para otros fines que se indican en el presente trabajo. En estas asociaciones también están involucradas diversas especies de bacterias, que no fueron objeto del presente estudio.

Los tибicos están constituidos químicamente de dextranas, producidas por bacterias; la madre del vinagre está compuesta principalmente por celulosa, que también es sintetizada por bacterias.

De los tибicos se aislaron dos especies de levaduras: Brettanomyces intermedius y Saccharomyces cerevisiae. De la madre del vinagre se aislaron Zygosaccharomyces bailii y Pichia membranaefaciens. Se incluyen los resultados del estudio de las características morfológicas y fisiológicas mediante las que se logró la identificación. B. intermedius se cita por primera vez para los tибicos y Zygosaccharomyces bailii para la madre del vinagre.

También se incluyen comentarios sobre algunas otras asociaciones de microorganismos semejantes a las tratadas en este trabajo, como son la llamada nata filipina (nata de piña y nata de coco) y el "té hongo" de varios países europeos y orientales.

I N T R O D U C C I Ó N

Los objetivos del presente trabajo fueron aislar, estudiar e identificar las levaduras que constituyen parte de las asociaciones biológicas conocidas en México como tíbicos y madre del vinagre, usadas popularmente en la elaboración de diversas bebidas fermentadas, cuyo consumo no se restringe sólo a México, sino que se extiende a muchos otros países del mundo.

T í b i c o s

Los tíbicos son zoogreas o masas gelatinosas, compactas, de color blanquecino o amarillento, translúcidas u opalescentes, atravesadas irregularmente por vetas muy finas, de forma irregular y de tamaño variable, desde unos pocos milímetros hasta uno o dos centímetros que se desarrollan en artículos y frutos de nopales (Opuntia spp.), en jugos de frutas, como la piña, y en agua endulzada con piloncillo o azúcar morena (Ulloa y Herrera, 1981).

Microbiológicamente, los granos de tíbicos están compuestos por bacterias y levaduras, cuya asociación ha sido interpretada como una simbiosis mutualista (Moinas et al., 1980) o como una forma de sinergismo (Holman y Meekelson, 1926, citado por Mascott y Terrés, 1952). Esta asociación es muy estable y, al fermentar los diferentes sustratos donde se desarrollan, no permite el crecimiento de otros microorganismos, o por lo menos su desarrollo no es favorecido. Aparentemente las levaduras oxidan el azúcar y producen el alcohol, que las bacterias oxidan para dar ácido acético, además de otros productos secundarios (op. cit.).

Si los tíbicos se desarrollan en sustratos azucarados como el jugo de piña, al dejar el líquido en reposo y a la intemperie se forma una nata blanca y delgada en la superficie, que al engrosarse, durante el transcurso de la fermentación, se sedimenta y forma en el fondo los granos de tíbicos. Cuando el líquido azucarado se deja fermentar durante uno o dos días se obtiene el llamado tepache de tíbico, que es una bebida refrescante de sabor agradable, con un contenido alcohólico muy bajo, pero si se prolonga el tiempo de fermentación, dicho contenido se incrementa y la bebida se vuelve alcohólica y después acética, aunque de una concentración menor que la que se obtiene de bacterias acéticas (Acetobacter spp.) (Ruiz Oronoz, 1932; Moreno y Díaz, 1932; Mascott y Terrés, 1952; Ulloa y Herrera, 1981).

El consumo de los tíbicos en México se hace generalmente a nivel doméstico, de manera similar al que se les da a los búlgaros que fermentan la leche, aunque el uso de los primeros es más limitado. Según la conseja popular, algunas personas ingieren el líquido fermentado por los tíbicos con la intención de reducir de peso (Ulloa y Herrera, 1981); no obstante, hasta el momento no hay ninguna evidencia basada en conocimientos científicos que avale o refute esta supuesta propiedad.

A estas zoogreas se les conoce popularmente como "algas marinas", "búlgaros de agua" o como "granillo" (este último nombre en Oaxaca).

Para el desarrollo de los tíbicos, en México se utilizan piloncillo, azúcar morena o jugo de piña, de naranja, de guayaba o de manzana. En Europa le agregan higos, dátiles, pasas, raíces de jengibre y limón al líquido azucarado, probablemente para proveer factores de crecimiento y mejorar el sabor de la bebida, que en este caso denominan tibi (Horisberger, 1968; Molinas et al., 1980). En ambos casos la fermentación se realiza a temperatura ambiente y sin llevar a cabo alguna medida higiénica

especial.

A finales del siglo pasado se realizaron en México los primeros intentos para esclarecer qué microorganismos participaban en la estable asociación que constituye los tísticos y cuya actividad genera la fermentación del sustrato donde se desarrollan.

Lutz (1898, 1899a, 1899b) realizó un estudio microbiológico de las zoogreas que él denominó "tísti" y que describió como: "zoogreas o masas blancas, globulosas, translúcidas, semejantes a los granos de arroz cocido, que crecen sobre los artículos o sobre los frutos de diversas especies de nopales". De estas zoogreas aisló una bacteria que denominó Bacillus mexicanus, y una levadura que determinó como Saccharomyces radaisii; propuso que B. mexicanus era aerobia y Gram +, y que al desarrollarse creaba un medio anaerobio para la levadura S. radaisii. También supuso que estos microorganismos eran los responsables del proceso de fermentación del colonche, bebida autóctona de México que se obtiene por fermentación del jugo de tunas, al que se le agrega colonche viejo, o cáscaras de tunas en las que se encuentran las zoogreas, para acelerar la fermentación (Ulloa y Herrera, 1978).

Después de Lutz vinieron otros investigadores que continuaron estudiando la naturaleza de los tísticos; todos ellos coincidieron en afirmar que estas zoogreas son originarias de México, que crecen sobre diferentes especies de Opuntia, y que fermentan el sustrato que se les suministra (sobre todo si tiene sacarosa).

En 1932, Ruiz Ornoz consideró que la parte micológica de los trabajos de Lutz sobre los tísticos fue incompleta e inició un estudio al respecto. Hizo una descripción de las zoogreas similar a la de Lutz e indicó que "puesto el tístico en presencia de agua azucarada determina una fermentación activa del medio, produciendo un líquido de olor pene-

trante, sabor ácido y color amarillento, conocido con el nombre de vinagre de tibico, y que dejando el líquido fermentado en reposo durante cierto tiempo se nota la formación en su superficie de zoogreas de color blanco puro, que encierran enormes cantidades de bacilos y, en número menor, células de levaduras". Como resultado de este estudio Ruiz Oronoz describió las características morfológicas y fisiológicas de Pichia radaisii (Lutz) Ruiz Oronoz.

En 1932, Moreno y Díaz realizó, como tema de su tesis profesional, un estudio bacteriológico y químico del vinagre que produce el tibico. Definió el tibico como "un producto biológico constituido por una reunión de microorganismos que viven en simbiosis". Como resultado de su estudio microbiológico aisló y describió cinco bacterias (Escherichia coli (Migula) Castellani y Chalmers, Proteus vulgaris Hauser, Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn, B. graveolens Meyer et Gottheil, Acetobacter peroxydans Visser 't Hooft y una levadura (Saccharomyces ellipsoideus Meyen ex Hansen). La autora de este estudio consideró que los microorganismos que aisló, y que viven en simbiosis, contaminan el grano, a excepción de A. peroxydans, que en combinación con la levadura aumenta la acidez del vinagre.

En 1952, Mascott y Terrés también estudió las levaduras de los tibicos ("del arroz"), como tema de su tesis profesional y describió estas zoogreas como masas blancas translúcidas y de consistencia gelatinosa, semejante a granos de arroz cocidos, pero más compactas, con vetas finísimas que las atraviesan irregularmente, y que fermentan jugos de frutas como la piña. Mencionó que al microscopio observó levaduras y bacterias envueltas en una sustancia viscosa. Aisló y describió dos especies de levaduras: Saccharomyces oviformis Osterwalder y Pichia chodatii (Zender) Dekker var. trumpyi (Zender et Bevan) Dekker. Mencionó haber encontrado

varias formas de Corynebacterium, que en combinación con las levaduras y en su medio acostumbrado bajaban el pH hasta 3, y que por medio de la reacción de Legal detectó la presencia de ácido acético. Esta autora indicó que la bacteria aislada de los tибicos por Lutz no podía pertenecer al género Bacillus, porque éste es Gram -, y Lutz la describió como Gram +. Aparentemente, Mascott y Terrés los nombró tибicos del arroz, no porque hayan sido obtenidos a partir de arroz, sino porque su apariencia es semejante a los granos de arroz cocido.

En 1981, Ulloa y Herrera publicaron un estudio de Pichia membranaefaciens Hansen y Saccharomyces cerevisiae Meyen ex Hansen, levaduras que aislaron de los tибicos y que identificaron y describieron siguiendo la metodología moderna (Lodder, 1970; Barnett et al., 1979).

Posteriormente, el aspecto bacteriológico fue nuevamente abordado en México; Herrera et al. (1984) publicaron un estudio sobre bacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas de los tибicos. Los autores presentaron las pruebas bioquímicas y culturales que les permitieron identificar dichas bacterias como Klebsiella oxytoca (Flügge) Lautrop; citaron que las cepas aisladas fueron capaces de crecer en medios libres de nitrógeno; demostraron su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico por medio de la técnica de reducción del acetileno, que verifica la actividad de la nitrogenasa, y la compararon con dos cepas bacterianas de colección, fijadoras de nitrógeno (Bellerinckia indica (Starkey and De) Derx y Azotobacter sp.).

Como se mencionó, los tибicos son originarios de México; sin embargo, en este país su estudio había sido esporádico y limitado al análisis microbiológico, en especial a las levaduras, ya que en relación con la matriz donde se encuentran embebidos los microorganismos

sólo se había descrito que "bacterias y levaduras se observan envueltas en una substancia viscosa" (Mascott y Terrés, 1952). Por ello resulta interesante tener conocimiento de que en Europa, particularmente en Suiza, los tíbicos son usados, como en México, para elaborar una bebida refrescante, pero en este caso es a partir de un líquido azucarado al que se le agregan higos, pasas y jugo de limón. Además, se han realizado estudios que abarcan aspectos químicos y microbiológicos, y recientemente estructurales por medio de técnicas muy finas de microscopía.

En 1965 Hesseltine citó que el tíbi era una bebida ácida, moderadamente alcohólica, que se preparaba en Suiza. Según este autor, esta bebida se obtiene adicionando al agua sacarosa, higos, pasas y rebanas de cidra e inoculando con 1-2 decilitros de granos de tíbi. Después de 48 horas, al completarse la fermentación, el líquido queda listo para ser embotellado. Señaló también que los tíbi son granos translúcidos de 1 cm de diámetro, cerosos y de consistencia flexible. Además indicó que esta fermentación es similar a la de la cerveza de jengibre que se consume en Inglaterra, y reportó la bacteria encapsulada Betabacterium vermiforme (Ward) Mayer y la levadura Saccharomyces intermedius Hansen, en los granos de tíbi.

En 1969, Horisberger publicó sus estudios sobre la estructura de las dextranas, polisacáridos que constituyen la matriz donde se encuentran embebidas las especies de bacterias identificadas como Lactobacillus brevis (Orla-Jensen) Bergey et al. y Streptococcus lactis (Lister) Löhnis, así como la levadura Saccharomyces cerevisiae, aunque señaló que el estudio mediante el que fueron identificados estos microorganismos como integrantes de los tíbicos, no había sido publicado. Como resultado de su estudio indicó que el "complejo tíbi" como el lo llamó, produce un polisacárido constituido solamente por D-glucosa.

Con respecto a sus resultados, Horisberger mencionó que Daker y Stacey (1938) estudiaron una dextrana del tibi, al que encontraron estar constituido principalmente por D(1→6) glucopiranosil; esta dextrana es insoluble y es producida por L. brevis, que fue aislada del "complejo tibi".

Además de lo anterior, el estudio de Horisberger permite tener conocimiento de algunos de los trabajos realizados sobre los tibicos en Europa durante los años anteriores a su estudio, pues menciona que Ward (1892) estableció cierta similitud entre la fermentación producida por los tibicos y la que se produce en la cerveza de jengibre de Inglaterra. Además señaló que el grano de tibiico ha sido descrito con varios nombres (Kebler, 1921) y que esta zooglea se diferencia de los granos de Kefir en que éstos acidifican y coagulan la leche (Hesseltine, 1965).

La estructura de los granos de tibicos fue dilucidada por Moinas, et al. (1980). Las microscopías de luz, de transmisión y de barrido les permitieron establecer que los granos están constituidos de una capa externa compacta y de una estructura interna esponjosa. La capa externa está densamente poblada por lactobacilos, streptococos y levaduras embebidos en la dextrana descrita por Horisberger en 1969 y que es generada por el lactobacilo. Un método especial de tinción mostró que las dextranas son más abundantes en la capa interna. Este análisis fue realizado durante el proceso de fisión de un grano de tibiico. La fisión está determinada por la presión interior de CO₂ que se forma durante la fermentación y cuya presencia en el interior ahueca los granos. En su estudio, Moinas cita que Porchet, 1934 y Stadelmann, 1957, señalan que los granos de tibicos son de forma irregular, con un diámetro máximo de 8 a 10 mm. La información anterior está apoyada por interesantes fotografías al microscopio de contraste de fases, de luz, electrónico de transmisión y de barrido, así como de fluorescencia, realizadas con modernas técnicas

de tinción y de congelación que permitieron una observación en detalle de la organización estructural de un grano de túbico, de las dextranas y de los microorganismos que constituyen esta asociación biológica (Moinas et al., 1980).

M a d r e d e l v i n a g r e

La madre del vinagre es una nata gruesa, fibrosa, insoluble en agua, de color moreno, rojizo, que se forma durante el proceso de fermentación del vinagre, generalmente a partir de vino de uva. Está constituida por agua (95%) y celulosa, esta última sintetizada por Acetobacter acetii subsp. xylinum (Brown) comb. nov. (Mendoza, 1961).

Parece ser que en México no se han realizado estudios para dilucidar la naturaleza química y microbiológica de esta nata, ni se sabe que se le dé otro uso, además del de producir vinagre. En 1932, Moreno y Díaz realizó un análisis bromatológico del vinagre producido por los túbicos y lo comparó con el producido a partir de vino, por ser éste el representante tipo de los vinagres y citó que: "vinagre sólo debía ser el proveniente del vino dado que su etimología significa vino agrio, pero el uso ha sancionado el que la palabra vinagre sea extendida a las demás bebidas ácidas, que sean producto de la fermentación, sólo que deberá explicarse la procedencia del vinagre: así por ejemplo, vinagre de túbico, de manzana, etc."

En 1976, Piedracruz-Carretero realizó un estudio comparativo de los dos principales métodos de producción de vinagre en México, y que son: a) sistema de acetificación sumergida y b) sistema de generadores de virutas, y mencionó que: "la adición de hidratos de carbono en cantidad excesiva tiene el inconveniente de favorecer el desarrollo de las bacterias del mucílago del vinagre". Él mismo mencionó el "mucílago del vinagre", que es muy probable equivalga a lo que se llama madre del vina-

gre, pues lo relaciona con Bacterium xylinum Brown (un sinónimo de Acetobacter acetii var. xylinum).

El vinagre, por ser el sustrato donde se desarrolla esta nata, tiene particular importancia; es un producto ácido que se obtiene por fermentación de carbohidratos contenidos en diferentes sustratos, como frutas (manzanas, uvas, peras, ciruelas, etc.), papas, maíz, melaza, jarabes azucarados, materias feculantes hidrolizadas, cerveza y vino o alcohol etílico obtenido por destilación fraccionada del petróleo. Tanto los tónicos como la madre del vinagre se utilizan para fermentar líquidos azucarados y obtener vinagre, aunque el de los primeros es de menor concentración que el que se obtiene con las bacterias acéticas de la madre del vinagre.

Aunque el vinagre se utiliza como producto medicinal, condimento o preservador, la madre del vinagre en nuestro país no se utiliza para otros fines, además del de producir vinagre. Sin embargo, en ciertos lugares la pulpa o nata de la madre del vinagre sí es objeto de ciertos usos peculiares. En las Islas Filipinas, la llamada nata filipina es consumida como un dulce o postre, en helados y ensaladas de frutas. Se producen dos tipos de nata: la de piña producida a partir de jugo de piña, y la de coco, para la que se usa agua o pulpa de coco como sustrato. La nata filipina ha sido estudiada por diversos autores, entre los que se encuentran Mendoza (1961) y Ramos (1977), quienes citaron que dicha nata y la madre del vinagre son producidas por el mismo microorganismo, Acetobacter acetii subsp. xylinum, y hacen referencia a diversos trabajos realizados sobre esta nata, que abarcan los aspectos físicos, químicos, microbiológicos y nutricionales, así como el proceso de elaboración de este dulce.

En 1931, Hibbert y Barsha demostraron que el polisacárido producido

por A. acetii subsp. xylinum se comportaba químicamente igual que la celulosa. En el mismo año Tarr y Hibbert establecieron que era necesario tener un medio ácido con azúcar y una pequeña cantidad de alcohol etílico para la síntesis de la pulpa o nata celulósica.

Muhlethaler (1949), mediante microscopía electrónica, mostró que las células bacterianas son cubiertas primero con una especie de lama, a la que sigue la formación de celulosa en cordones, que gradualmente se engruesan para diferenciarse las fibras de celulosa. Las fibras son formadas fuera de la célula, por lo que las células bacterianas no contienen celulosa. En 1951, Kaushal et al. estudiaron una muestra del producto bacteriano con difracción de rayos X y concluyeron que definitivamente era celulosa. Describieron que el material amorfo observado en un estado temprano es un carbohidrato de polimerización de un nivel más bajo que el de la celulosa. Hehre (1951) señaló que Acetobacter capsulatum (Hennenberg) Shimwell (cuyo nombre válido actual es Gluconobacter oxydans subsp. industrius (Hennenberg) comb. nov.) crece sobre dextrinas produciendo una dextrana consistente de D-glucopiranosas, y que las células no proliferantes de A. xylinum, activas sobre glucosa, sintetizan celulosa en presencia de oxígeno. Mendoza (1953) fue el primero en sugerir que el organismo que producía esta nata era A. acetii (Pasteur) Beijerinck.

Hestrin y Schramm (1954) comunicaron que la celulosa que constituye esta nata es celulosa típica cristalina, del tipo encontrado en el algodón, y que está libre de lignina; además demostraron que el material celular que puede contribuir con alguna proteína es lavado al preparar la nata, y que considerarla como fuente de calorías depende de la digestibilidad de la materia celulósica; en forma de dulce, la nata tiene un gran contenido de calorías. Asimismo comprobaron que las células no

contenían celulosa, sugiriendo que las enzimas de la superficie de la célula eran las responsables de la polimerización extracelular, y que 1 mg (10^9) de células liofilizadas pueden catalizar la polimerización de 0.25 μ moles de glucosa por hora. Esto significa que se polimerizan 1.5×10^8 moléculas de glucosa por hora.

Rao (1957) revisó la literatura sobre la síntesis de polisacáridos sintetizados por bacterias acéticas.

Mendoza (1961) describió la nata como una película gelatinosa gruesa, color blanco o crema, insoluble, que contiene células y polisacáridos que Acetobacter xylinum forma en la superficie de un medio ácido con azúcar, alcohol etílico y otros nutrimentos.

Hesseltine (1965) señaló que la nata filipina es consumida como postre, en helados y ensaladas de frutas. La nata se forma como producto de la fermentación del jugo de piña, agua o pulpa de coco; al jugo de fruta se le adiciona azúcar, para favorecer la fermentación con producción de ácido. Después de 15 días se forma una capa bacteriana y un polímero, con un grosor de 2 a 3 pulgadas, sobre la superficie del líquido. Esta capa es separada del líquido, se corta en pedazos, se lava y se hierve hasta que desaparece el olor de ácido acético; se adicionan como agentes saborizantes extracto de vainilla o de limón. Hesseltine citó que "aparentemente" Acetobacter sp. es la bacteria responsable de la síntesis de esta nata.

En 1967, Lapuz et al. concluyeron que el organismo causal de esta película era idéntico a A. xylinum (Brown) Bergey et al. Lo anterior fue confirmado por Saturnino-Dimagulla en el mismo año.

En la 8a. edición del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan and Gibbons, 1974) A. xylinum es clasificado como A. acetii subsp. xylinum.

Ramos en 1977 analizó los requerimientos de pH y temperatura para que A. acetii sintetizara celulosa y determinó que el pH óptimo era de 5 y la temperatura de $28^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Comprobó que A. acetii crece sobre glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, dextrina y galactosa, siendo la sacarosa la más usada en Filipinas para la obtención de la nata. Como fuente de nitrógeno utilizó nitrato de potasio y nitrito de sodio, con una concentración óptima de 0.5% de nitrato de potasio.

Mendoza (1961) y Ramos (1977) reportaron que la nata se forma a partir de una suspensión inicial sedosa, que desprende pelillos y flocula para formar largos cuerpos de gel que contienen células bacterianas; citaron que el principal componente de esta nata es agua (más del 95%) y el resto consiste de una red espaciosa de celulosa, que se forma a máxima velocidad a los 30 minutos después de que las células lavadas de A. acetii subsp. xylinum entran en contacto con glucosa y oxígeno. La película (madre del vinagre) producida por A. acetii durante la fermentación del vinagre es celulósica y muy fibrosa; si la película se separa durante la fermentación y se seca, al principio es correosa, semejante a papel resistente, desgarrado. La celulosa presenta una gran capacidad para absorber agua; 3 ó 4% de celulosa pueden retener más del 95% de agua en una estructura firme parecida a un gel.

El uso que en otros países se le da al líquido a partir del cual se forma la pulpa de la madre del vinagre, fue descrito por Hesseltine en 1965. El líquido sobre el que se forma la película es consumido en países como India, Rusia, Japón, Polonia, Bulgaria, Alemania, Manchuria, e Indonesia, y recibe nombres como Teeschwamm, té honggo, kombucha, wunderpils (honggo maravilloso), honggo, ca[ni], honggo japonés y teekwass; todos estos nombres son de acuerdo al lugar donde es consumida esta bebida. Este autor reportó que para obtener esta bebida en la India

utilizan hojas secas de té (Thea shinensis), las que son remojadas en agua para obtener un extracto al que se adiciona sacarosa y se esteriliza; se inocula con una porción de nata y se incuba a 25°C. En poco tiempo se forma una película sobre el sustrato; con el tiempo esta capa se va engrosando hasta alcanzar de 1 a 2 pulgadas. Después de 15 días el líquido se recolecta y es consumido; si se adicionan nuevos ingredientes nutritivos, la fermentación se repite. Respecto a la microbiología de esta bebida, mencionó la presencia de la bacteria Acetobacter sp. y de dos levaduras. Al determinar la actividad de cada uno de estos organismos en el proceso de fermentación, señaló que con los tres microorganismos en combinación se forma rápidamente una película, no se acumula gas y ocurre una fermentación típica normal. Cuando sólo se encuentra Acetobacter se produce gas y no se forma película; las levaduras usadas solas o en combinación no forman película. Además, se detectó la actividad de un antibiótico en contra de Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsend) Conn. En Rusia se han estudiado los efectos de este antibiótico, in vitro e in vivo, tanto en medicina humana como animal.

En 1972, Kozaki et al. reportaron que Acetobacter xylinum era el principal organismo involucrado en la formación de esta nata. Varios tipos de levaduras, como son Saccharomyces sp., Torulopsis famata (sinónimo de Candida famata (Harrison) Meyer et Yarrow), Pichia membranaefaciens Hansen y Candida guilliermondii (Castellani) Langeron et Guerra fueron aisladas del té hongo japonés; del té hongo de Formosa se aislaron Candida obtusa (sinónimo de Clavispora lusitaniae Rodríguez de Miranda) y Kloeckera apiculata (Reess Emend. Klöcker) Janke .

Después de los últimos estudios microbiológicos realizados en las zoogreas, se despertó el interés de algunos investigadores por encontrar alguna aplicación práctica a la investigación básica realizada hasta

ahora.

Saint-Phard Delva (1984), como tema de su tesis profesional, empleó algunas de las cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas por Herrera et al. en 1984, para enriquecer por fermentación sólida el contenido de proteínas de los desperdicios de plátano maduro con objeto de producir un alimento animal, destinado principalmente a monogástricos.

J. Taboada (del Instituto de Química de la UNAM), J. Díaz Garcés (de la Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco), y M. Ulloa y T. Herrera (del Instituto de Biología de la UNAM) se encuentran realizando investigaciones experimentales con tíficos y madre del vinagre para determinar su posible utilización en la alimentación de aves de corral (comunicación personal).

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras de tíbicos y de la madre del vinagre estudiadas

Las muestras de tíbicos de las que se aislaron las levaduras, objeto del presente estudio, son de diferente procedencia: tres son de la Ciudad de México y una de un mercado de la Ciudad de Xalapa, Ver.

Como los tíbicos son utilizados por amas de casa y otras personas para obtener tepache y vinagre, estas zoogreas se van pasando de una persona a otra, lo que hace difícil o imposible conocer el origen inicial de las muestras recibidas en el laboratorio para su estudio; debido a lo anterior, se desconocen las condiciones en las que se fueron reproduciendo estas zoogreas, aunque se puede suponer que el sustrato donde se desarrollaron fue piloncillo o el jugo de alguna fruta y sacarosa.

La pulpa de la madre del vinagre de la que se aislaron las otras dos especies de levaduras descritas en el presente estudio, se formó durante la producción casera de vinagre, a partir de vino de uva.

Aislamiento de las cepas de levaduras estudiadas

Se aislaron cinco cepas de levaduras, tres a partir de tíficos, una de la pulpa o nata de la madre del vinagre, y otra del líquido en el que se desarrolló esta nata.

Las tres cepas de levaduras de tíficos y la cepa de pulpa de madre del vinagre se aislaron por inoculación directa de un grano de tífico, o de un pequeño trozo de pulpa, en placas de medio de V8 agar (JV8 agar: jugo de 8 verduras, marca Campbell, 180 ml; carbonato de calcio, 2 g; agar, 20 g; agua destilada, 1000 ml), diluyendo el inóculo por medio de múltiples estrías en varias placas del medio de cultivo. La cepa del líquido en el que creció la madre del vinagre se aisló tomando una asada del mismo y diluyéndolo por estrías también sobre placas de JV8 agar.

Posteriormente, a partir de las colonias puras obtenidas de cada muestra, se hicieron resiembras a los medios de cultivo específicos sólidos y líquidos necesarios para el estudio y que se señalan en los cuadros 3-15. Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave (15 min a 15 lbs de presión) o por microfiltración, según el caso, y se cuidó de seguir condiciones asépticas en todos los procedimientos. Todos los cultivos se hicieron por duplicado.

Los criterios y métodos que se siguieron para identificar las levaduras aisladas están basados en los propuestos por van der Walt, descritos en el tratado "The Yeasts" de Lodder (1970), e incluyen el estudio de las características morfológicas, con las que se demarcan los taxa superiores (familias y géneros), y de las características fisiológicas y bioquímicas, con las que se determinan los taxa inferiores (especies).

La identificación se llevó a cabo siguiendo las claves de Lodder (1970), de Kreger-van Rij (1984), y de Barnett et al. (1970); esta última clave también está basada en las pruebas propuestas por van der Walt (In Lodder, 1970).

En el cuadro 1 se presentan, comparativamente, las características que consideran Lodder y Kreger-van Rij para la identificación y descripción de levaduras. El último autor ha reducido el número de fuentes de carbono para las pruebas de fermentación y de asimilación, e incluido otras pruebas más modernas.

En el cuadro 2 se indican las pruebas que se realizaron en el presente trabajo; como se puede apreciar, no son todas las que siguen Lodder y Kreger-van Rij, pero fueron suficientes para lograr la identificación de las especies de levaduras estudiadas, y, además, no hubiera sido posible hacerlas todas debido a las limitaciones de equipo y materiales que existieron. En los cuadros que describen la metodología y los resultados de esta tesis se siguió el mismo orden de la numeración utilizada en el cuadro 2.

En el cuadro 3 se citan las características morfológicas estudiadas. En el cuadro 4 se describe el método que se utilizó para preparar los inóculos de las levaduras en estudio. En el cuadro 5 se presenta el método que se usó para determinar el grado de asimilación de compuestos de carbono, de nitrógeno, de requerimientos vitamínicos para el crecimiento

y de resistencia a la cicloheximida.

La metodología para estudiar las características fisiológicas y bioquímicas, con la que se pudo identificar y describir las levaduras estudiadas, se presenta en forma resumida en los cuadros 6-15. En los cuadros 3 y 6-15 se indican las fórmulas de los medios de cultivo utilizados, los modos de preparación y métodos de incubación, así como las observaciones que se realizaron en cada una de las pruebas.

En el cuadro 16 se presentan los resultados del estudio morfológico de cada una de las levaduras identificadas.

Los compuestos de carbono que se utilizaron en las pruebas de fermentación y de asimilación están indicados en el cuadro 17, correspondiente a la sección de resultados.

Los cultivos para las pruebas de fermentación y de asimilación se mantuvieron en incubadoras diferentes, debido a que el alcohol etílico producido por las levaduras durante la fermentación podría interferir en las pruebas de asimilación y dar lugar a resultados positivos de asimilación falsos.

Cuadro 1. Principales características que se toman en consideración para la identificación y clasificación de levaduras, según la metodología propuesta por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984)

Lodder	Kreger-van Rij
<p>A. Características morfológicas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Características de la reproducción vegetativa 2. Características de las células vegetativas 	<p>A. Características de la reproducción vegetativa</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tipo de reproducción vegetativa 2. Características de las células vegetativas <ol style="list-style-type: none"> a) Morfología de células vegetativas creciendo en medio líquido y en medio sólido b) Formación de pseudomicelio y micelio verdadero c) Formación de endosporas asexuales d) Formación de clamidosporas e) Formación de tubos germinativos por <u>Candida albicans</u> f) Formación de ballistosporas g) Ultraestructura de la pared celular y de los septos
<p>R. Características culturales</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Crecimiento en medio líquido 2. Crecimiento en medio sólido 	<p>B. Características sexuales</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Características de la formación de ascosporas <ol style="list-style-type: none"> a) Características de ascas y ascosporas b) Métodos para aislamiento (purificación de tipos de apareamiento) 2. Características de la formación de basidiosporas 3. Técnicas de hibridación para propósitos taxonómicos
<p>C. Características sexuales</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Características de ascas y ascosporas 2. Interfertilidad de levaduras ascomicetes como criterio taxonómico 3. Características de telosporas y esporidios (basidiosporas) 	<p>C. Características fisiológicas y bioquímicas</p>
<p>D. Características fisiológicas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Utilización de compuestos de carbono <ol style="list-style-type: none"> a) Fermentación de 11 compuestos de carbono b) Asimilación de 31 compuestos de carbono c) Desdoblamiento de arbutina 2. Asimilación de 5 compuestos de nitrógeno 3. Crecimiento en medio libre de vitaminas 4. Crecimiento en medio de alta presión osmótica 5. Crecimiento a elevada temperatura 6. Producción de ácido 7. Producción extracelular de compuestos amiloides 8. Hidrólisis de urea 9. Desdoblamiento de grasa 10. Formación de pigmento 11. Producción de ésteres 12. Resistencia a la cicloheximida (actidione) 13. Licuefacción de gelatina 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilización de compuestos de carbono <ol style="list-style-type: none"> a) Fermentación de 6 compuestos de carbono b) Asimilación de 18 compuestos de carbono c) Desdoblamiento de arbutina 2. Asimilación de 5 compuestos de nitrógeno 3. Crecimiento en medio libre de vitaminas y/o requerimientos de vitaminas 4. Crecimiento en medios de alta presión osmótica 5. Crecimiento a 37°C; determinación de la máxima temperatura de crecimiento 6. Producción de ácido a partir de glucosa 7. Formación de compuestos amiloides extracelulares 8. Producción de amonio a partir de urea 9. Desdoblamiento de grasa 10. Producción de ésteres 11. Resistencia al antibiótico cicloheximida 12. Tolerancia a 1% de ácido acético 13. Licuefacción de gelatina 14. Tinción de pared celular con azul B de diazonio 15. Crecimiento en medio de canavanina-glicina-azul de bromotimol 16. Porcentaje molar de guanina-citosina en el ADN nuclear 17. Reasociación de ADN nuclear 18. Estructura de la coenzima Q 19. Tinción de núcleo con Giemsa 20. Síntesis de melanina 21. Crecimiento en medio con indicador de tetrazolio

Cuadro 2. Características morfológicas y fisiológicas consideradas por la autora para el estudio de las levaduras objeto del presente trabajo

I. Características morfológicas

A. Macromorfología o características culturales

1. Crecimiento en medio líquido
2. Crecimiento en medio sólido

B. Micromorfología

1. Características de la reproducción asexual o vegetativa

2. Características de las células vegetativas

- a) Morfología en medio sólido
- b) Formación de pseudomicelio y de micelio verdadero

3. Características de la reproducción sexual

- a) Proceso de formación de ascas y ascosporas
- b) Características de ascas y ascosporas

II. Características fisiológicas y bioquímicas

1. Utilización de compuestos de carbono

- a) Fermentación
- b) Asimilación
- c) Desdoblamiento de arbutina

2. Utilización de compuestos de nitrógeno

- a) Asimilación de KNO_3
- b) Asimilación de NaNO_2

3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento

- a) Crecimiento sin vitaminas
- b) Efecto de diferentes vitaminas

4. Resistencia al antibiótico cicloheximida

5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica

- a) Tolerancia a 50 y 60% de glucosa
- b) Tolerancia a concentraciones de 1-18% de cloruro de sodio

6. Producción extracelular de compuestos amiloides

7. Producción de ácido a partir de glucosa

8. Crecimiento a 37°C

Cuadro 3. Metodología usada para determinar las características morfológicas de las levaduras estudiadas

A. Macromorfología o características culturales

1. Crecimiento en medio líquido

Glucosa-extracto de levadura-peptona (GELP): glucosa, 20 g; extracto de levadura, 5 g; peptona, 10 g; agua destilada, 1000 ml

Se incubó a 25-28°C durante 3-4 días y se hicieron observaciones; después se dejó a temperatura ambiente y semanalmente se registraron las características del crecimiento durante 30 días

2. Crecimiento en medio sólido

Glucosa-extracto de levadura-peptona-agar (GELPA): glucosa, 20 g; extracto de levadura, 5 g; peptona, 10 g; agar, 20 g; agua destilada, 1000 ml

Idem

B.

1. Características de la reproducción asexual o vegetativa

GELPA

Idem

2. Características de las células vegetativas

a) Morfología en medio sólido

GELPA

Idem

b) Formación de pseudomicelio y de micelio verdadero en placa de Dalmau

Harina de maíz-agar (HMA Difco): harina de maíz, 17 g; agua destilada, 1000 ml

Se incubó a 25-28°C durante 6-8 días y se observó si hubo o no formación de pseudomicelio y de micelio verdadero

Placa de Dalmau: se inoculó la placa de agar con dos estrías paralelas y dos picaduras y se cubrieron con cubreobjetos estériles, el extremo de una de las estrías y una de las picaduras para crear condiciones anaerobias o microaerofílicas de cultivo

Cuadro 3 (continuación)

3. Características de la reproducción sexual

a) Proceso de formación de ascas y ascosporas

GELPA

Idem A.1

Acetato agar o medio de Fowel (FA): acetato de sodio, 5 g; agar, 20 g; agua destilada, 1000 ml

b) Características de ascas y ascosporas

Gorodkowa agar (GA): glucosa, 1 g; peptona, 10 g; cloruro de sodio, 5 g; agar, 20 g; agua destilada, 1000 ml

HMA

Papa-dextrosa-agar (PDA Difco): papa-dextrosa-agar, 39 g; agua destilada 1000 ml

Extracto de malta agar (EMA Difco): extracto de malta agar, 33.6 g; agua destilada, 1000 ml

Trozos de zanahoria (Z): trozos pequeños de zanahoria en tubos con un poco de agua (para prevenir la desecación)

Cuadro 4. Método utilizado para preparar el inóculo de la levadura por identificar, y que se usó para las pruebas de fermentación y asimilación de compuestos de carbono, de asimilación de compuestos de nitrógeno, de resistencia a la cicloheximida y de requerimientos de vitaminas para el crecimiento

Cultivo joven y vigoroso en GELPA

En un tubo de 12 x 160 mm con 3 ml de agua destilada estéril, se suspendieron varias asadas



Se diluyó la suspensión agregando 6 ml de agua destilada estéril



Se ajustó la turbidez de la suspensión, observándola contra una tarjeta blanca marcada con líneas negras de 3/4 mm, hasta obtener una concentración 3+ para las pruebas de fermentación y 2+ para las pruebas de asimilación de compuestos de carbono, de asimilación de compuestos de nitrógeno, de resistencia a la cicloheximida y de requerimientos de vitaminas para el crecimiento (ver cuadro 5)



Se inocularon los tubos con los distintos medios con una gota (0.05 ml) de esta suspensión (ver cuadros - 6, 7, 9, 10, 11, 12 y 14)

Cuadro 5. Metodología usada para apreciar la turbidez de los cultivos de levaduras sometidas a las pruebas de asimilación de compuestos de carbono y de nitrógeno, de requerimientos de vitaminas para el crecimiento y de resistencia a la cicloheximida (ver cuadros 6-7 y 9-12)

El grado de turbidez de los cultivos se determinó por observaciones realizadas durante un mes, agitando los tubos y colocándolos contra una tarjeta blanca marcada con líneas negras de 3/4 mm de grosor; el crecimiento de la levadura, que está directamente relacionado con el grado de visibilidad de las líneas, se interpretó de la siguiente manera:

- 3+ el crecimiento tapa completamente las líneas
- 2+ las líneas se ven difusas
- 1+ las líneas se distinguen, pero los bordes no se ven bien definidos
- las líneas se ven claramente

Para asimilación de compuestos de carbono

- 3+ y 2+ se consideraron como asimilación positiva
- 1+ se consideró como asimilación positiva débil o negativa, dependiendo de la comparación con el tubo testigo

Para asimilación de compuestos de nitrógeno

- 3+ y 2+ en la prueba realizada en el segundo tubo, se consideraron como asimilación positiva (ver cuadro 9)
- 1+ asimilación negativa

Para determinar los requerimientos de vitaminas para el crecimiento

- 3+ en MLV en el segundo tubo (ver cuadro 10) o en MLV más alguna de las vitaminas probadas se consideró como crecimiento positivo, lo que indica que la levadura sintetiza las vitaminas que requiere
- 2+ y 1+ se tomaron como crecimiento negativo, lo que indica que la levadura requiere de una fuente exógena de vitaminas (ver cuadro 11)

Para la resistencia a la cicloheximida

- 3+ y 2+ se tomaron como crecimiento positivo, lo que muestra que la levadura es resistente
 - 1+ ó - se consideró como crecimiento negativo, lo que indica que la levadura es inhibida
-

Cuadro 6. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

1. Utilización de compuestos de carbono

a) Fermentación

Medio basal de Wickerham

4.5 g extracto de levadura
7.5 g peptona
1000 ml agua destilada



2 ml/tubo de Durham*



Se esterilizó en autoclave

Soluciones de compuestos de carbono

6.0 g del compuesto de carbono
(para la rafinosa se usaron
12 g)
100 ml agua destilada



Se disolvió perfectamente y se esterilizó por microfiltración



1 ml/tubo con medio basal de Wickerham

Tubos de Durham con 3 ml de medio de cultivo para la prueba de fermentación



Se inoculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión densa (3+) procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)



Se incubó a 25-28°C



Se observó a los 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 y 24 días si hubo o no producción de CO₂ en los tubos de Durham, lo que implica fermentación positiva rápida, mediana o lenta, o fermentación negativa

* Tubos de cultivo, de 12 x 160 mm, con un tubo pequeño invertido en el fondo, que es en el que se acumula el CO₂, desplazando el líquido, si hay fermentación

Cuadro 7. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

1. Utilización de compuestos de carbono

b) Asimilación

Medio de cultivo

6.7 g base nitrogenada para levaduras (BNL)
5.0 g del compuesto de carbono
(para la rafinosa se usaron 10 g)
100 ml agua destilada

↓
Se disolvió perfectamente y se esterilizó por microfiltración

↓
Se transfirieron 0.5 ml del medio de cultivo a cada tubo de 12 x 160 mm con 4.5 ml de agua destilada estéril

↓
Tubos con 5 ml de medio para prueba de asimilación; los tubos testigos contuvieron solamente BNL.

↓
Se inculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión 2+; procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)

↓
Se incubó a 25-28°C, se agitó y observó periódicamente durante un mes

↓
Se evaluó el grado de asimilación con una tarjeta blanca marcada con líneas negras de 3/4 mm (ver cuadro 5)

Cuadro 8. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

. Utilización de compuestos de carbono

c) Desdoblamiento de arbutina

Medio de cultivo de arbutina agar (AA)

5.0 g arbutina
1.0 g extracto de levadura
20.0 g agar
1000 ml agua destilada

↓
Se disolvió perfectamente, se vertió en tubos de 10 x 100 mm y se esterilizó en autoclave

↓
Antes de que el medio de cultivo solidificara, se le adicionaron 2 ó 3 gotas de una solución estéril de citrato férrico de amonio al 1%

↓
Se agitó cuidadosamente para evitar la formación de espuma

↓
Se inoculó el medio sólido por estría, a partir de un cultivo vigoroso de la levadura en estudio

↓
Se incubó a 25-28°C; se hicieron observaciones periódicamente durante un mes

↓
Se observó si hubo o no producción de un color café en el medio de cultivo; (si lo hay indica desdoblamiento de arbutina) y se comparó con un tubo testigo con AA, pero no inoculado

Cuadro 9. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

2. Utilización de compuestos de nitrógeno

a) y b) Asimilación de KNO_3 y de NaNO_2

Medio de cultivo

11.7 g base carbonada para levaduras (BCL)
0.78 g KNO_3 ó 0.26 g NaNO_2
100 ml agua destilada

↓
Se disolvió perfectamente y se esterilizó por microfiltración

↓
Se transfirieron 0.5 ml del medio de cultivo a cada tubo de 12 x 160 mm con 4.5 ml de agua destilada estéril

↓
Tubos con 5 ml de medio para prueba de asimilación; los tubos testigos contuvieron solamente BCL

↓
Se inoculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión 2+, procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)

↓
Se incubó a 25-28°C durante 7 días; después se tomó una asada para inocular un segundo par de tubos con medio de cultivo, con objeto de asegurar la ausencia de trazas de nitrógeno en el medio y en el inóculo, y evitar así resultados positivos de asimilación falsos

↓
Se incubó a 25-28°C; se agitó y observó periódicamente durante un mes

↓
Se evaluó el grado de asimilación con una tarjeta blanca marcada con líneas negras (ver cuadro 5)

Cuadro 10. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento

a) Crecimiento sin vitaminas

Medio de cultivo libre de vitaminas (MLV)

16.7 g MLV
100 ml agua destilada

↓
Se calentó el agua para disolver perfectamente el medio y se esterilizó por microfiltración

↓
Se transfirieron 0.5 ml del MLV a cada tubo de 12 x 160 mm con 4.5 ml de agua destilada estéril

↓
Tubos con 5 ml del medio para la prueba

↓
Se inoculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión 2+, procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)

↓
Se incubó a 25-28°C durante 7 días; después se tomó una asada para inocular un segundo par de tubos con medio de cultivo, con objeto de asegurar la ausencia de vitaminas en el medio y en el inóculo, y evitar así resultados positivos falsos de crecimiento sin vitaminas

↓
Se incubó a 25-28°C, se agitó y observó periódicamente durante un mes

↓
Se evaluó el grado de asimilación con una tarjeta blanca marcada con líneas negras de 3/4 mm (ver cuadro 5)

Cuadro 11. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento

b) Efecto de diferentes vitaminas

Medio de cultivo

Se transfirieron 0.5 ml de MLV a cada tubo de 12 x 160 mm con 4.5 ml de la solución de vitaminas por probar*



Tubos con 5 ml del medio para determinar las vitaminas requeridas



Se inoculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión 2+, procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)



Se incubó a 25-28°C; se agitó y observó periódicamente durante un mes



Se evaluó el grado de crecimiento con una tarjeta blanca marcada con líneas negras de 3/4 mm (ver cuadro 5)

* Soluciones de las vitaminas (esterilizadas por microfiltración)

µg litro

Birotina	20
Pantotenato de calcio	2 000
Ácido fólico	2
Inositol	10 000
Niacina	400
Ácido paraminobenzolco	200
Riboflavina	200
Hidrocloruro de tiamina	400
Hidrocloruro de piridoxina	400

Cuadro 12. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

4. Resistencia al antibiótico cicloheximida

Medio basal

6.7 g base nitrogenada para levaduras (BNL)
5.0 g glucosa
100 ml agua destilada

Se disolvió perfectamente y se esterilizó por microfiltración

Se transfirieron 0.5 ml del medio de cultivo a cada tubo con la solución de cicloheximida

Solución de cicloheximida al 0.1 y al 0.01%

Se disolvió perfectamente y se esterilizó por microfiltración

Se transfirieron 4.5 ml de esta solución a tubos estériles de 12 x 160 mm

Tubos con 5 ml del medio para la prueba de resistencia al antibiótico

Se inoculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión 2+; procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)

Se incubó a 25-28°C; se agitó y observó periódicamente durante tres semanas

Se evaluó el grado de resistencia con una tarjeta blanca marcada con líneas negras de 3/4 mm (ver cuadro 5)

Cuadro 13. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica

a) Tolerancia a 50 y 60% de glucosa

Medio de cultivo

50% peso/peso

50.0 g glucosa
0.5 g extracto de levadura
2.0 g agar
50 ml agua destilada

60% peso/peso

60.0 g glucosa
0.5 g extracto de levadura
2.0 g agar
40 ml agua destilada

Se disolvió perfectamente y se vertió en tubos de 10 x 100 mm; se esterilizó en autoclave



Se inoculó el medio sólido por estría, a partir de un cultivo vigoroso de la levadura en estudio



Se incubó a 25-28°C; se hicieron observaciones periódicamente durante un mes

Cuadro 14. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica

b) Tolerancia a concentraciones de 1-18% de cloruro de sodio

Medio de cultivo

18.0 g glucosa
9.0 g peptona
4.5 g extracto de levadura
900 ml agua destilada



Se distribuyó en volúmenes de 50 ml en vasos de precipitados de 100 ml (18 vasos)



A cada volumen se le adicionó la cantidad de cloruro de sodio correspondiente (concentraciones de 1-18% de cloruro de sodio)



Se disolvió perfectamente, se distribuyó en volúmenes de 5 ml en tubos de 12 x 160 mm y se esterilizó en autoclave



Se inoculó con una gota (0.05 ml) de una suspensión 2+, procedente de un cultivo vigoroso de la levadura por identificar (ver cuadro 4)



Se incubó a 25-28°C durante 7 días



La concentración más baja de cloruro de sodio en la que no hubo crecimiento visible se tomó como el límite de tolerancia al cloruro de sodio

Cuadro 15. Metodología usada para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las levaduras estudiadas

6. Producción extracelular de compuestos amiloides

Al final de las pruebas de asimilación se seleccionaron algunos de los tubos que mostraron crecimiento positivo en algún azúcar o alcohol y se les adicionó una gota de lugol. La producción de compuestos amiloides es comprobada al presentarse una reacción de color azul a púrpura o verde

7. Producción de ácido a partir de glucosa

Medio de cultivo

50.0 g glucosa
5.0 g extracto de levadura
5.0 g carbonato de calcio
20.0 g agar
1000 ml agua destilada

↓
Se disolvió perfectamente, se esterilizó en autoclave y se vertió en cajas de petri

↓
Se inoculó el medio sólido por picadura central a partir de un cultivo vigoroso de la levadura en estudio. Como testigo se utilizó una caja con medio sin inocular

↓
Se incubó a 25-28°C durante dos semanas

↓
Se observó si hubo o no producción de ácido en el medio. La clarificación del medio indica producción de ácido.

8. Crecimiento a 37°C

Tubos con GELP se inocularon con una asada de un cultivo vigoroso de la levadura en estudio. Se incubó a 37°C durante 30 días. Se observó si hubo o no crecimiento en este medio de cultivo líquido; no se utilizó un medio con agar pues a esta temperatura se deshidrata

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cuadros 16-17 contienen los resultados del estudio realizado a las tres cepas aisladas de los tísticos y a las dos cepas aisladas de la madre del vinagre. Una de las cepas procedente de tísticos fue identificada como Brettanomyces intermedius (Krumbholz et Tauschanoff) van der Walt et van Kerken. Las otras dos cepas aisladas de tísticos fueron identificadas como Saccharomyces cerevisiae Meyen ex Hansen. Las cepas de la madre del vinagre correspondieron a Zygosaccharomyces bailii (Lindner) Guilliermond (aislada de la pulpa) y a Pichia membranaefaciens Hansen (aislada del líquido en que se hallaba creciendo la pulpa).

Siguiendo las claves de Barnett et al. (1979), la cepa de Brettanomyces correspondió a B. custersii o a Dekkera intermedia (esta última es el estado sexual de B. intermedius). Siguiendo la clave de Kreger-van Rij (1984) para las especies de levaduras que forman micelio verdadero, se llegó a B. anomalus; no obstante, la diagnóstico del género Brettanomyces no indica que éste produzca micelio verdadero (únicamente forma pseudomicelio y filamentos unicelulares, ramificados y no septados, llamados blastese). Con la clave del género Brettanomyces (del mismo Kreger-van Rij) se observó que la cepa en discusión era afín a B. anomalus y a B. custersii, pero los resultados de las pruebas de asimilación correspondieron más a los de B. intermedius, por lo que en este trabajo se determinó a dicha cepa como perteneciente a esta última especie, que ha sido reportada en mosto y vino de uva, instalaciones de vinaterías y de equipo contaminado en fábricas de cerveza de sorgo.

Cuadro 16. Características morfológicas de las especies de levaduras estudiadas

	<u>Brettanomyces intermedius</u> de tíficos	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>Zygosaccharomyces bailii</u> de madre del vinagre	<u>Pichia membranaefaciens</u>
I. Características morfológicas				
A. Macromorfología o características culturales				
1. Crecimiento en medio líquido (GELP)	Abundante sedimento flocooso y mucoso	Abundante sedimento	Poco sedimento, anillo	Abundante sedimento; película blanca, opaca, seca y ascendente
2. Crecimiento en medio sólido (GELPA)	Aprox. 1.6 cm de diámetro a los 35 días. Butirosa, blanco crema, lisa, suave y semibrillante. Cultivo aromático (a fruta y/o ácido acético)	Aprox. 3 cm de diámetro a los 50 días. Butirosa, blanco crema, lisa, suave y semibrillante	Aprox. 2.4 cm de diámetro a los 35 días. Butirosa, blanco crema, lisa, suave y semibrillante	Aprox. 2.5 cm de diámetro a los 60 días. Seca, rosada, rugosa, opaca, plegada y alveolada
B. Micromorfología				
1. Características de la reproducción asexual o vegetativa (GELPA)	Gemación multilateral	Gemación multilateral	Gemación multilateral	Gemación multilateral
2. Características de las células vegetativas				
a) Morfología en medio sólido (GELPA)	Células biapiculadas, ovales y elipsoidales, de 7.5-12.5 x 5-7.5 μm	Células esferoidales y globosas, de 7.5-12.5 x 7.5-12.5 μm	Células ovoides, elipsoidales y cilíndricas, de 10-12.5 x 7.5-10 μm	Células ovoides a elongadas, de 7.5-12.5 x 5-7.5 μm
b) Formación de pseudomicelio	Bien desarrollado, anaerobio	Bien desarrollado, anaerobio	Bien desarrollado, aerobio y anaerobio	Bien desarrollado, aerobio y anaerobio
y				
de micelio verdadero en placa de Dalmau (HMA)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Cuadro 16 (continuación)

	<u>Brettanomyces</u> <u>intermedius</u>	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	<u>Zygosaccharomyces</u> <u>baillii</u>	<u>Pichia</u> <u>membranaefaciens</u>
3. Características de la reproducción sexual	Ausentes			
a) Proceso de formación de ascas y ascosporas (GELPA, F, G, HMA, PDA, EMA y Z)		Directamente de la célula vegetativa	Después de la conjugación entre dos células independientes	No conjugadas, o conjugadas entre células independientes, o célula madre-célula hija
b) Características de ascas y ascosporas (mismos medios del inciso a)				
Situación del asca		Libre (no adherida a pseudomicelio o micelio verdadero)	Libre	Libre
Forma y medidas del asca		Esféricas o elípticas (en F), de 6.4-8 µm	En forma de pesas (en HMA), de 9.6-14.4 µm	Elípticas (en F y PDA), de 6.4 µm
Forma y medidas de las ascosporas		Proladas a esferoidales de 1.6-3.2 µm	Globosas a elipsoidales de 3.2 µm	En forma de sombrero, de 1.6 µm
Número de ascosporas por asca		2, 3 y 4	2, 3 y 4	2, 3 y 4

Cuadro 17. Características fisiológicas y bioquímicas de las especies de levaduras estudiadas

	<u>Brettanomyces</u> <u>intermedius</u>	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	<u>Zygozaccharomyces</u> <u>ballii</u>	<u>Pichia</u> <u>membranaefaciens</u>
II. Características fisiológicas y bioquímicas				
1. Utilización de compuestos de carbono				
a) Fermentación				
D-glucosa	+	+	+	-
Galactosa	+	+	-	-
Maltosa	-	+	+	-
α -metil-D-glucósido	+	+	-	-
Sacarosa	+	-	-	-
Trehalosa	-	-	-	-
Melibiosa	+	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-
Melecitosa	+	-	-	-
Rafinosa	-	+	-	-
b) Asimilación				
D-galactosa	+	+	+	-
L-sorbose	-	-	+ débil	-
D-ribose	-	+	-	-
D-xilosa	-	-	-	+
L-arabinosa	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-
L-ramnosa	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	-	-
Maltosa	+	+	-	-
Trehalosa	+	+	+	-
α -metil-D-glucósido	+	+	+	+
Celobiosa	+	-	-	-
Salicina	+	-	-	-
Arbutina	+	-	-	-
Melibiosa	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-
Rafinosa	-	+	+	-
Melecitosa	+	-	-	+
Inulina	-	-	-	-
Almidón soluble	-	-	-	-
Glicerol	+	-	+	+
Eritritol	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-

Cuadro 17 (continuación)

	<u>Brettanomyces</u> <u>intermedius</u>	<u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	<u>Zygosaccharomyces</u> <u>baillii</u>	<u>Pichia</u> <u>membranaefaciens</u>
Galactitol	-	+ débil	-	-
D-manitol	-	-	+	-
D-glucitol	-	-	+	-
Mio-inositol	-	-	-	-
Gluconolactona	+	-	+	-
DL-láctico	+	+	+	+
Ácido succínico	+ débil	-	-	+
Ácido cítrico	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+
D-glucosamina	+	-	-	+ débil
2. Utilización de compuestos de nitrógeno				
a) Asimilación de KNO_3	+	-	-	-
b) Asimilación de $NaNO_2$	+	-	-	-
3. Requerimientos de vitaminas para el crecimiento				
a) Crecimiento sin vitaminas	+	+	+	+
4. Resistencia al antibiótico cicloheximida				
0.01%	-	-	-	-
0.1%	-	-	-	-
5. Crecimiento en medios de alta presión osmótica				
a) Tolerancia a 50% de glucosa	+	+	+	+
Tolerancia a 60% de glucosa	+	-	+	+
b) Tolerancia a concentraciones de 1-18% de cloruro de sodio	3-4%	8-9%	2-3%	5-6%
6. Producción extracelular de compuestos amiloideos	-	-	-	-
7. Producción de ácido a partir de glucosa	+	-	-	-
8. Crecimiento a 37°C	+	+	+	+

Lutz (1898, 1899a, 1899b) aisló de los tíbicos una especie de leu-
dura que describió como nueva y la designó como Saccharomyces radaisii;
Ruiz Oronoz (1932) la consideró sinónimo de Pichia radaisii. No obstante
Lodder (1970), Barnett et al. (1979) y Kreger-van Rij (1984) no aceptan
la especie P. radaisii dentro del género Pichia, y su clasificación
continúa incierta puesto que parece no haber datos acerca del destino de
esta cepa. Moreno y Díaz (1932) reportó la presencia en los tíbicos de
la levadura que ella determinó como S. ellipsoideus; actualmente esta
especie es considerada como sinónimo de S. cerevisiae. Las dos cepas de
levaduras aisladas de tíbicos, que estudió Mascott y Terrés (1952), y
que fueron determinadas como S. oviformis y P. chodatii var. trumpy, han
pasado a ser sinónimos de S. cerevisiae y P. membranaefaciens, respecti-
vamente.

Hesseltine (1965) señaló la presencia de S. intermedius en las
zoogreas de tíbicos (tibi grains), especie que, como se mencionó pasó a
ser sinónimo de S. cerevisiae. Horisberger (1969), al reportar la compo-
sición química de los tíbicos, señaló la presencia de células de levadu-
ras (correspondientes a S. cerevisiae) y de células bacterianas (perten-
ecientes a Lactobacillus brevis y Streptococcus lactis); sin embargo,
no se publicó un estudio detallado acerca de la identificación de estos
microorganismos.

En 1981, Ulloa y Herrera reportaron la presencia de S. cerevisiae
y P. membranaefaciens en diversas muestras de tíbicos, lo que vino a
confirmar los resultados obtenidos por otros autores.

El presente estudio viene a ratificar que S. cerevisiae es una
especie constantemente involucrada en la formación de las zoogreas de
los tíbicos. Sin embargo, la especie B. intermedius es aquí registrada
por primera vez para los tíbicos.

Respecto a la madre del vinagre, se puede decir que éste es el primer trabajo en México que trata sobre el aislamiento e identificación de las levaduras que se asocian con ella. Aquí se describe por primera vez la presencia de Z. bailii en la pulpa de la madre del vinagre. Dicha especie ha sido aislada en otras partes del mundo a partir de: brandy de sorgo, mayonesa, jugo de manzana, vinagre, mosto y vino de uva, vino turbio, sidra de pera, pepinillos en salmuera, salsa inglesa Worcestershire, heces fecales, refrescos gaseosos y otros sustratos. La pulpa de la madre del vinagre, de la que se aisló Z. bailii, fue cultivada domésticamente en vino de uva, con objeto de elaborar vinagre, que son dos de los sustratos en que se ha encontrado esta especie. Su identificación se logró con las claves de Kreger-van Rij (1984) particulares para el género Zygosaccharomyces, lo que no se pudo hacer con las de Barnett et al., (1979) por haber resultado + la prueba de asimilación de la rafi nosa.

En países orientales y europeos utilizan madre del vinagre para inocular una infusión de hojas de té con azúcar, que al fermentar produce una bebida popular llamada té hongo (Hesseltine, 1965). Del té hongo japonés se han aislado Saccharomyces sp., Torulopsis famata (sinónimo de Candida famata (Harrison) Meyer et Yarrow), Pichia membranaefaciens Hansen y Candida guilliermondii (Castellani) Langeron et Guerra; del té hongo de Formosa se han aislado Candida obtusa (sinónimo de Clavispora lusitaniae Rodríguez de Miranda) y Kloeckera apiculata (Reess Emend. Klöcker) Janke.

De los resultados obtenidos en el presente estudio se desprende una concordancia respecto a la presencia de P. membranaefaciens en el líquido donde se desarrolla la madre del vinagre. Por otro lado, Z. bailii no había sido registrada en la madre del vinagre, ni en México ni en otros

lugares, y las especies de levaduras reportadas para el té hongo parecen haber sido aisladas del líquido, no de la pulpa misma.

LITERATURA CITADA

- Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow, 1979. A Guide to Identifying and Classifying Yeasts. Cambridge University Press, Cambridge, 315 p.
- Buchanan, R. E. y N. E. Gibbons (editores). 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Daker, W. D., Stacey, M. 1938. Investigation of a polysaccharide produced from sucrose by Betabacterium vermiforme (Ward Meyer). Biochem. J. 52: 1946-1948.
- Hehre, E. J. 1951. The biological synthesis of dextran from dextrans. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods, Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 414-420.
- Herrera, T., C. Salinas y S. Palacios, 1984. Estudio de cepas de Klebsiella oxytoca (Flügge) Lautrop, fijadoras de nitrógeno, aisladas de las zoogreas llamadas "tibicos". Rev. Lat-amer. Microbiol. 27 (3) (en prensa).
- Hesseltine, C. W. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. Mycologia 57: 149-197.
- Hestrin, S. and M. Schramm, 1954. Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods, Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.
- Hibbert, H. and J. Barsha. 1931. Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXIX. Structure of the cellulose synthesized by the action of Acetobacter xylinum on glucose. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.
- Horisberger, M. 1969. Structure of the dextran of the tibi grains. Carbohydr. Res. 10: 379-385.
- Kaushal, R., T. K. Walker and D. G. Drummond. 1951. Observations on the formation and structure of bacterial cellulose. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods, Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.

- Kebler, L. F. 1921. California bees. J. Am. Pharm. Assoc. 10: 939-943.
- Kozaki, J., A. Kolzuri, and K. Ketahara. 1972. Microorganisms of zoogloeal mats formed in tea decoction. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 421.
- Kreger-van Rij, J. J. W. (editor). 1984. The Yeasts -A Taxonomic Study. 3a. ed. Elsevier Science Publishers, B. V., Amsterdam, 1082 pp.
- Lapuz, M., E. G. Gallardo, and M. A. Palo. 1967. The nata organisms: cultural requirements, characteristics and identity. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 414-420.
- Lodder, J. 1970. The Yeasts -A Taxonomic Study. North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385 pp.
- Lutz, M. L., 1898. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. Compt. Rend. Soc. Biol. 5: 1124-1126.
- Lutz, M. L., 1899a. Recherches biologiques sur la constitution du tibi. Bull. Trim. Soc. Mycol. Fr. 15: 68.
- Lutz, M. L., 1899b. Nouvelle recherches sur le tibi. Bull. Trim. Soc. Mycol. Fr. 15: 157.
- Mascott y Terrés, M., 1952. Contribución al conocimiento de las levaduras de los tíbicos del arroz. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 60 p.
- Mendoza, J. M. 1953. The culture of nata de coco. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 414-420.
- Mendoza, J. M. 1961. Philippine Foods. Their Processing and Manufacture. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 414-420.
- Moinas, M., M. Horisberger, and H. Bauer. 1980. The structural organization of the tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. Arch. Microbiol. 128: 157-161.
- Moreno y Díaz, M. P. 1932. Contribución al estudio bacteriológico y al análisis químico del vinagre que produce el tíbico. Tesis profesional, Facultad de Química y Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 56 p.
- Muhlethaler, K. 1949. The structure of bacterial cellulose. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 414-420.

- Piedracruz-Carreto, J. A. 1976. Estudio comparativo de los dos principales métodos de producción de vinagre en México. Tesis profesional, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 67 p.
- Porchet, B. 1934. Etude d'une boisson fermentée, a base de figues. Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. 25: 235-244.
- Ramos, M. A. 1977. Production of Philippine nata from coconut water. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.
- Rao, J. R. R. 1957. Acetic acid bacteria. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.
- Ruiz Oronoz, M. 1932. Estudio micológico de las zoogreas conocidas vulgarmente como tibicos. An. Inst. Biol., Univ. Nat. Autón. México 3: 183-190.
- Saint-Phard Delva, C. J. 1984. Aprovechamiento de los desperdicios de plátano maduro por fermentación sólida. Tesis profesional, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 83 p.
- Saturnino-Dimaguila, L. A. 1967. The "nata de coco" II. Chemical nature and properties of nata. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.
- Stadelmann, E. 1957. Die symbiose tibi. Bull. Soc. Fribourgeoise Sci. Nat. 47: 16-19.
- Tarr, H. L. A. and H. Hibbert. 1931. Studies on the reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXV. Polysaccharide synthesis by the action of Acetobacter xylinum on carbohydrates and related compounds. In Steinkraus, K. H. (editor). Handbook of Indigenous Fermented Foods. Microbiology Series, Vol. 9, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 414-420.
- Ulloa, M. y T. Herrera, 1978. Torulopsis taboadae, una nueva especie de levadura aislada del colonche de Zacatecas, México. Bol. Soc. Mex. Mic. 12: 5-12.
- Ulloa, M. y T. Herrera, 1981. Estudio de Pichia membranaefaciens y Saccharomyces cerevisiae, levaduras que constituyen parte de las zoogreas llamadas tibicos en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 16: 63-75.
- Ward, H. M. 1892. The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. Phil. Trans. Roy. Soc. London 183: 125-197.