

ESTUDIO DE *PICHIA MEMBRANAEFACIENS* Y *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, LEVADURAS QUE CONSTITUYEN PARTE DE LAS ZOOGLEAS LLAMADAS TIBICOS EN MEXICO

Por Miguel Ulloa*
y Teófilo Herrera*

A STUDY OF *PICHIA MEMBRANAEFACIENS* AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, THE YEAST CONSTITUENTS OF THE ZOOGLOEAE KNOWN IN MEXICO AS TIBICOS

S U M M A R Y

This paper describes the morphological and physiological characteristics of two yeast species, *Pichia membranaefaciens* and *Sacharomyces cerevisiae*, isolated from the zoogloae known in Mexico as *tibicos*, which are gelatinous masses, composed of bacteria and yeasts that develop in sugary liquids maintained stable. These tibicos are used in the preparation of some popular fermented beverages, such as *tepache de tibicos*, and a kind of vinegar called *vinagre de tibicos*. Certain people cultivate these tibicos in water with brown sugar and drink the filtrate with the purpose of reducing weight.

R E S U M E N

Este trabajo describe las características morfológicas y fisiológicas de dos especies de levaduras, *Pichia membranaefaciens* y *Sacharomyces cerevisiae*, aisladas de las zoogleas conocidas en México con el nombre de tibicos, las cuales son masas gelatinosas constituidas por bacterias y levaduras que se desarrollan en líquidos azucarados mantenidos en reposo. Estos tibicos son usados popularmente para elaborar ciertas bebidas fermentadas como el tepache de tibicos y un tipo de vinagre llamado vinagre de tibicos. Aunque en forma limitada, algunas personas cultivan estos tibicos en agua con piloncillo y beben el filtrado con la intención de reducir de peso.

*Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D. F.

INTRODUCCION

Los tibicos 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 (Figs. 1-2), 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. Estas zoogreas están constituidas por bacterias y levaduras que son las responsables de la fermentación de los distintos sustratos donde se desarrollan.

Lutz (1898, 1899a, 1899b), en relación a sus estudios acerca del proceso de fermentación del colonche, bebida autóctona de México que se obtiene por fermentación del jugo de tunas de varias especies de nopales (Ulloa y Herrera 1978), supuso que dicho proceso era debido a la acción combinada de una bacteria y una levadura, que se encuentran en las zoogreas o masas blancas, globulosas, translúcidas, semejantes a los granos de arroz cocidos, que él denominó "tibi" y que otros autores llaman tibicos, y que crecen sobre los artículos o sobre los frutos de diversas especies de nopales.

Ruiz-Oronoz (1932) indicó que: "el tibico es originario de nuestro país; crece sobre los artículos de diversas especies de *Opuntia* y se presenta en forma de masas globulosas, transparentes, muy semejantes a los granos de arroz cocido. Puesto el tibico en presencia de agua azucarada, determina una fermentación activa del medio, produciendo un líquido de olor penetrante, sabor ácido y color amarillento, conocido con el nombre de vinagre de tibico, muy empleado en economía doméstica. Asimismo, se emplea para hacer bebidas refrescantes. 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".

Mascott y Terrés (1952) obtuvo muestras de tibicos en el Mercado de la Merced de la Ciudad de México y comentó que: "se da el nombre de tibicos a las zoogreas usadas para fermentar jugos azucarados de frutos como la piña y obtener la bebida conocida como tepache y, asimismo, un vinagre de una concentración menor a la que se obtiene por las bacterias acéticas. Se supone que los tibicos se forman en el tepache de piña cuando éste se deja a la intemperie, porque después que aparece en la superficie una nata blanca, la que tiende a sedimentarse, en el fondo se forman las zoogreas mencionadas. También se dice que estas últimas proceden de otras que en medio propicio se reprodujeron activamente, como lo hicieron sus predecesoras, y así sucesivamente".

De lo anterior se deduce que parece haber cierta confusión con respecto al origen de los tibicos, porque no se puede asegurar, aunque es posible, que las masas de bacterias y levaduras que Lutz llamó

tibi corresponden a las zoogleas que otros autores denominan tibicos (Ruiz-Orcoz, 1932; Mascott y Terrés, 1952); además, popularmente, estas zoogleas son propagadas en agua azucarada con piloncillo o azúcar morena y mantenidas en condición estática, con el objeto de consumir eclado, y en ayunas, el producto de la fermentación de las mismas que, incidentalmente, han recibido también el nombre de "algas marinas", lo cual puede provocar aún más confusión respecto a la identidad y naturaleza de los tibicos. Según la información proporcionada a los autores por una persona que elabora tepache en la Ciudad de México, en Oaxaca le dan a éstos el nombre de "granillo".

Si los tibicos se forman con frecuencia espontáneamente en agua azucarada o en jugos de frutas, como la piña, los constituyentes microbianos de dichas zoogleas podrían ser variables en los distintos casos. Con la presente comunicación se intenta contribuir a esclarecer la identificación de las levaduras que forman parte de los tibicos, considerando las discrepancias que hay en las publicaciones sobre el tema y los cambios que ha habido recientemente en cuanto a la metodología que se sigue para la identificación de las levaduras.

MATERIAL Y METODOS

Las levaduras objeto del presente trabajo fueron aisladas por los autores a partir de tres diferentes muestras de tibicos obtenidas directamente de tres personas en la Ciudad de México, en distintas épocas del año. Se desconoce el origen inicial de los tibicos estudiados, puesto que las zoogleas fueron propagadas en agua endulzada con piloncillo y transmitidas de unas personas a otras, de manera parecida a la propagación y distribución, más o menos restringida, que se hace entre personas o familias, con las zoogleas de los bacillos búlgaros de la leche, aunque este último caso parece ser de más amplio conocimiento popular que el del objeto del presente estudio.

El aislamiento de las dos especies de levaduras que se describen en este trabajo fue hecho por el método de múltiples estrias en placas de medio de V8 agar. A partir de las colonias puras que se desarrollaron en este medio, se hicieron resiembras a los medios de cultivos sólidos y líquidos, necesarios para efectuar el estudio morfológico y fisiológico y lograr la identificación de las mismas. Todos estos medios fueron de la marca Difco, excepto los de V8 agar, de Fowell, de Gorodkova, trozos de zanahoria, y parcialmente los medios de fermentación y asimilación, los cuales fueron preparados en el laboratorio a partir de los ingredientes correspondientes y de los medios basales de la marca Difco. Las pruebas de fermentación de carbohidratos, las de asimilación de éstos y de otros compuestos del carbono, así como las de asimilación de nitrato de potasio y nitrito de sodio, crecimiento en medio libre de vitaminas, o en este medio adicionado de alguna vitamina determinada, formación de almidón extra celular, tolerancia al cloruro de sodio, tolerancia a elevadas concentraciones de glucosa, cultivo en medios líquidos, resistencia

a la cicloheximida, cultivo en placa de Dalmau y crecimiento a 37°C, fueron hechas siguiendo la metodología recomendada en el tratado de Lodder (1970). La identificación de las especies fue hecha siguiendo las claves y descripciones contenidas en dicho tratado, así como las claves de la guía para identificación y clasificación de levaduras de Barnett, Payne y Yarrow (1979).

DESCRIPCION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DE LOS TIBICOS

Pichia membranaefaciens Hansen

Figs. 3-5

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 20 días la colonia gigante es de 1.5 cm de diámetro, de color blanco, cremosa, semi-brillante, casi lisa, algo elevada y de borde ampliamente lobado y entero (Fig. 3). Las células vegetativas son ovaladas, esferoidales, elipsoidales o cilíndricas, de 2 a 4.5 micras de ancho por 3 a 12 micras de largo; independientes, con un brote polar o subpolar, y en cadenas cortas, simples o ramificadas.

Crecimiento en glucosa-extracto de levadura-peptona-agar. Vigoroso. Después de tres días, el cultivo en estria es de color blanco o crema, brillante, liso, elevado y con margen fimbriado debido a la formación de pseudomicelio. Las células muestran una morfología semejante a la desarrollada en el medio anterior.

Crecimiento en glucosa-extracto de levadura-peptona-líquido. Aun después de un mes no forma ni velo ni anillo, pero forma abundante sedimento de color blanco y el medio permanece casi sin turbidez. En extracto de malta líquido presenta las mismas características.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. Tanto dentro como fuera del cubreobjetos, forma un pseudomicelio bien definido y ramificado con células ovaladas, esferoidales, elipsoidales o cilíndricas (Fig. 4).

Esporulación. Ausente en los medios de Fowell, Gorodkova, V8 agar y trozos de zanahoria. No obstante, forma ascas y ascosporas, aunque no abundantes, en medio de glucosa-extracto de levadura-peptona-agar. Las ascas son elípticas o esferoidales de 6 a 8 micras de diámetro, y cada una contiene de 1 a 4 ascosporas esferoidales, de 2 a 2.5 micras de diámetro (Fig. 5).

Fermentación

Glucosa +

Lactosa —

Cont. Fermentación

Galactosa —	Melibiosa —
Sacarosa —	Rafinosa —
Maltosa —	Melecitosa —
Celobiosa —	Inulina —
Trehalosa —	

Asimilación de compuestos de carbono

Glucosa +	Glicerol —
Galactosa —	Eritritol —
L-Sorbosa —	Ribitol —
Sacarosa —	Galactitol —
Maltosa —	D-Manitol —
Celobiosa —	D-Glucitol —
Trehalosa —	∞ -Metil-D-Glucósido —
Lactosa —	Salicina —
Melibiosa —	Arbutina —
Rafinosa —	DL-Acido láctico +
Melecitosa —	Acid _o succínico +
Inulina —	Acido cítrico +
Almidón soluble —	Inositol —
D-Xilosa +	Gluconolactona —
L-Arabinosa —	2-Cetogluconato —
D-Arabinosa —	5-Cetogluconato —
D-Ribosa —	D-Glucosamina —
L-Ramnosa —	0.1 % Cicloheximida —
Metanol —	0.01 % Cicloheximida —
Etanol +	

Crecimiento en medios con nitrato de potasio o nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno. Negativo.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Formación de almidón extracelular. Negativa.

Tolerancia al cloruro de sodio. Entre 9% y 10%.

Crecimiento en 50% y 60% (peso/peso) de glucosa-extracto de levadura-agar. Negativo. Hubo crecimiento hasta 40%.

Crecimiento a 37°C. Positivo.

Saccharomyces cerevisiae Hansen

Figs. 6-11

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 20 días, la colonia gigante es de aproximadamente 1.5 cm de diámetro, de color blanco crema, butirosa, opaca, algo elevada, con la superficie algo granular, de borde lobulado y fimbriado, y con surcos radiales (Fig. 6). Las células vegetativas son ovaladas, esferoidales o elipsoidales, con gemación multipolar, de 2 a 7 micras de ancho x 2.5 a 9.5 micras de largo (Fig. 8). Las ascas son globosas o elípticas y miden de 6.5 a 8 micras de diámetro; cada asca contiene de 1 a 4 ascosporas esferoidales, de 2 a 2.5 micras de diámetro.

Crecimiento en glucosa-extracto de levadura-peptona-agar. Bueno. Después de tres días, el cultivo en estría es aplanado, de color blanco, brillante y liso, y con borde entero. Las células vegetativas presentan una morfología similar a la descrita en el medio anterior.

Crecimiento en glucosa-extracto de levadura-peptona-líquido.

Aun después de un mes no forma película ni anillo; con poca turbidez pero con un abundante sedimento floculento de color blanco. Presenta las mismas características en extracto de malta líquido.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. Forma un pseudomicelio bien definido y ramificado, con células ovoides, esferoidales, elipsoidales y cilíndricas, preferentemente por debajo del cubre-objetos (Fig. 7).

Esporulación. Abundante formación de ascas en los medios de V8 agar, Fowell, Gorodkova y glucosa-extracto de levadura-peptona-agar (Figs. 9-11).

Fermentación.

Glucosa +

Lactosa -

Galactosa +

Melibiosa -

Cont. Fermentación

Sacarosa +	Rafinosa + 1/3
Maltosa +	Melecitosa -
Celobiosa -	Inulina -
Trehalosa -	

Asimilación de compuestos de carbono

Glucosa +	Glicerol -
Galactosa +	Eritritol -
L-Sorbosa -	Ribitol -
Sacarosa -	Galactitol -
Maltosa +	D-Manitol -
Celobiosa -	D-Glucitol -
Trehalosa +	∞-Metil-D-Glucósido +
Lactosa -	Salicina -
Melibiossa -	Arbutina -
Rafinosa +	DL-Acido láctico +
Melecitosa -	Acido succínico -
Inulina -	Acido cítrico -
Almidón soluble -	Inositol -
D-Xilosa -	Gluconolactona -
L-Arabinosa -	2-Cetogluconato -
D-Arabinosa -	5-Cetogluconato -
D-Ribosa -	D-Glucosamina -
L-Ramnosa -	0.1 % Cicloheximida -
Metanol -	0.01 % Cicloheximida -
Etanol +	

Crecimiento en medios con nitrato de potasio o nitrito de sodio como única fuente de nitrógeno. Negativo.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Formación de almidón extracelular. Negativa.

Tolerancia al cloruro de sodio. Entre 9% y 10%.

Crecimiento en 50% y 60% (peso/peso) de glucosa-extracto de levadura-agar. Negativo. Hubo crecimiento hasta 40%.

Crecimiento a 37°C. Positivo.

D I S C U S I O N

Lutz (1898, 1899a, 1899b) fue el primer investigador que estudió los microorganismos de los tibicos ("tibi") y describió una especie nueva de bacteria a la que denominó *Bacillus mexicanus* y una especie, también nueva, de levadura a la que dio el nombre de *Saccharomyces Radaisii*. Ruiz Oronoz (1932), al hacer un estudio micológico de los tibicos, registró la levadura aislada de éstos como *Pichia Radaisii* (Lutz) Guilliermond, indicando que *S. Radaisii* había pasado a sinonimia. No obstante, ni Lodder (1970) ni Barnett, Payne y Yarrow (1979) aceptan la especie *P. Radaisii* dentro del género *Pichia*, por lo que la clasificación de la misma quedaría por definirse.

Mascott y Terrés (1952) estudió dos especies de levaduras aisladas de los tibicos, las cuales fueron determinadas como *Saccharomyces oviformis* Osterwalder y *Pichia chodatii* var. *trumpyi* (Zender et Bevan) Dekker. La primera ha pasado a sinónimo de *Saccharomyces bayanus* Sacc., y la segunda de *Pichia membranaefaciens* Hansen (Lodder, 1970). Además de haber estudiado las dos levaduras antes citadas, Mascott y Terrés (1952) aisló diversas cepas de bacterias a partir de los tibicos y, aunque no las identificó, señaló que la bacteria descrita por Lutz como *Bacillus mexicanus* no puede pertenecer al género *Bacillus*, por haber indicado aquél que era Gram negativa, y el género *Bacillus* es Gram positivo.

Moreno y Díaz (1932) describió someramente algunos aspectos sobre la microbiología y el análisis químico de los tibicos y registró para éstos las bacterias *Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers (como *Bacillus coli* Migula), *Bacillus megaterium* de Bary (como *B. graveolens* Meyer et Gottheil), *B. subtilis* (Ehrenberg) Cohn, y *Acetobacter peroxydans* Visser, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (como *S. ellipsoideus* Hansen). Aun cuando se citan varias especies de bacterias de los tibicos, puede considerarse que el estudio bacteriológico de éstos ha sido hecho sólo en forma preliminar.

Como *P. chodati* var. *trumpyi* es sinónimo de *P. membranaefaciens* y, por otra parte *S. bayanus* y *S. ellipsoideus* son considerados sinónimos de *S. cerevisiae*, debido a la gran variación que presenta esta última especie en los caracteres de fermentación y asimilación de compuestos de carbono, entre otras características (Barnett, Payne y Yarrow, 1979), lo registrado por Mascott y Terrés y por Moreno y Díaz concuerda con los resultados obtenidos por los autores del presente trabajo. Tanto Mascott y Terrés como Moreno y Díaz presentaron sus trabajos como tesis de licenciatura, en la Universidad Nacional Autónoma de México y no fueron publicados formalmente en alguna revista científica, por lo que se consideró pertinente hacer la presente comunicación sobre las levaduras de los tibicos, con resultados obtenidos después de utilizar la metodología actual para la identificación de las especies de levaduras.

Aunque la cepa de *P. membranaefaciens* aislada de los tibicos no forma velo ni anillo en medios líquidos, característica común de la especie, no se considera necesario establecer una nueva entidad taxonómica, porque esta leve diferencia es interpretada, por los autores del presente trabajo, entre otras de las variaciones morfológicas espontáneas que podría presentar la especie citada.

Es interesante comentar que *S. cerevisiae* ya había sido aislada de varias bebidas fermentadas indígenas de México, que han sido estudiadas por los autores del presente trabajo, como son el pozol y el tesgüino (de maíz), el pulque y la tuba (de savia de plantas), el colonche (de jugo de tuna), y el tepache (de pulpa y jugo de varias frutas); *P. membranaefaciens* ya había sido aislada del tesgüino y el pulque (Ulloa y Herrera, 1979; Herrera y Ulloa, 1981). Según esto, puede considerarse a *S. cerevisiae* como la especie de levadura más frecuente y de más amplia distribución en las mencionadas bebidas, algunas de las cuales son elaboradas, frecuentemente, con la intervención de los tibicos, como son el colonche y el tepache.

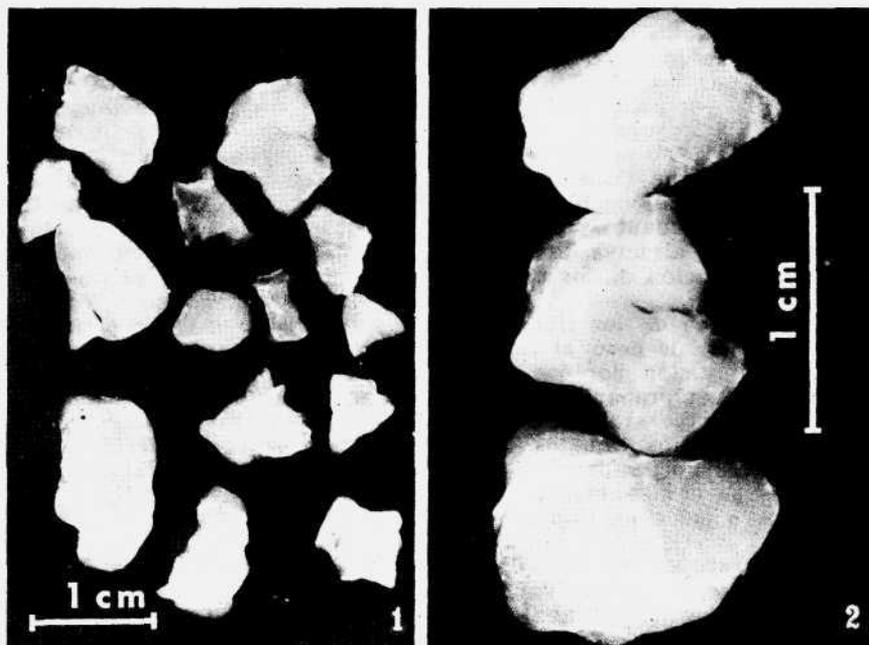
El uso que de los tibicos hacen algunas personas con el propósito de reducir de peso al consumir en ayunas el líquido que resulta de la fermentación por los tibicos, no ha sido estudiado científicamente para comprobar si es que dicho uso tiene algún fundamento. Tampoco se sabe si los microorganismos que forman parte de las zoogreas, o de los líquidos fermentados por éstas, pudieran tener alguna acción nociva para los consumidores habituales o esporádicos, los cuales parecen aumentar o disminuir según las recomendaciones favorables o las contraindicaciones de los mismos.

En cuanto al aspecto aplicado de los tibicos, puede considerarse que aunque en la actualidad es restringido, según se indicó en la introducción de este trabajo, es probable que puedan proyectarse otras aplicaciones de estas zoogreas o de los microorganismos aislados de ellas, inclusive a nivel industrial, puesto que dichas zoogreas o algunos microorganismos que las constituyen tienen gran poder fermentativo que permite obtener diversos productos de importancia

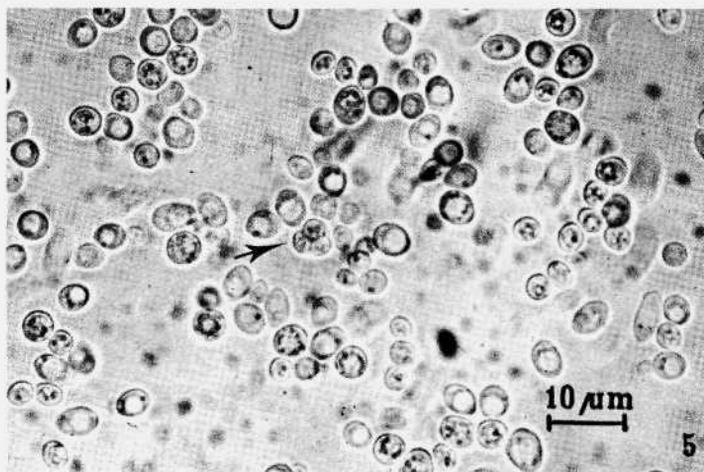
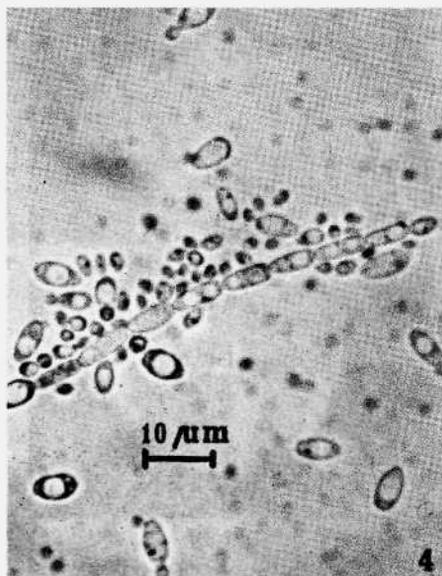
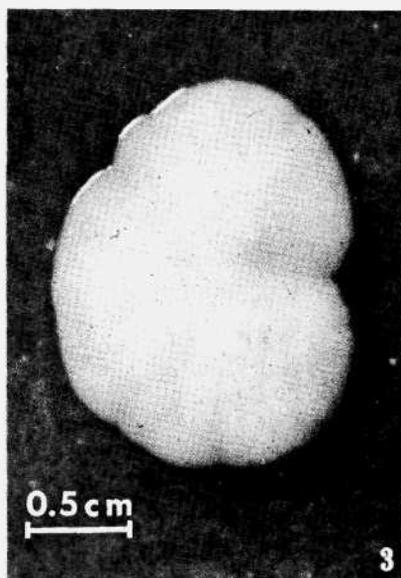
industrial, como bebidas alcohólicas y vinagre, así como diversas sustancias contenidas en estos productos de la fermentación.

AGRADECIMIENTOS

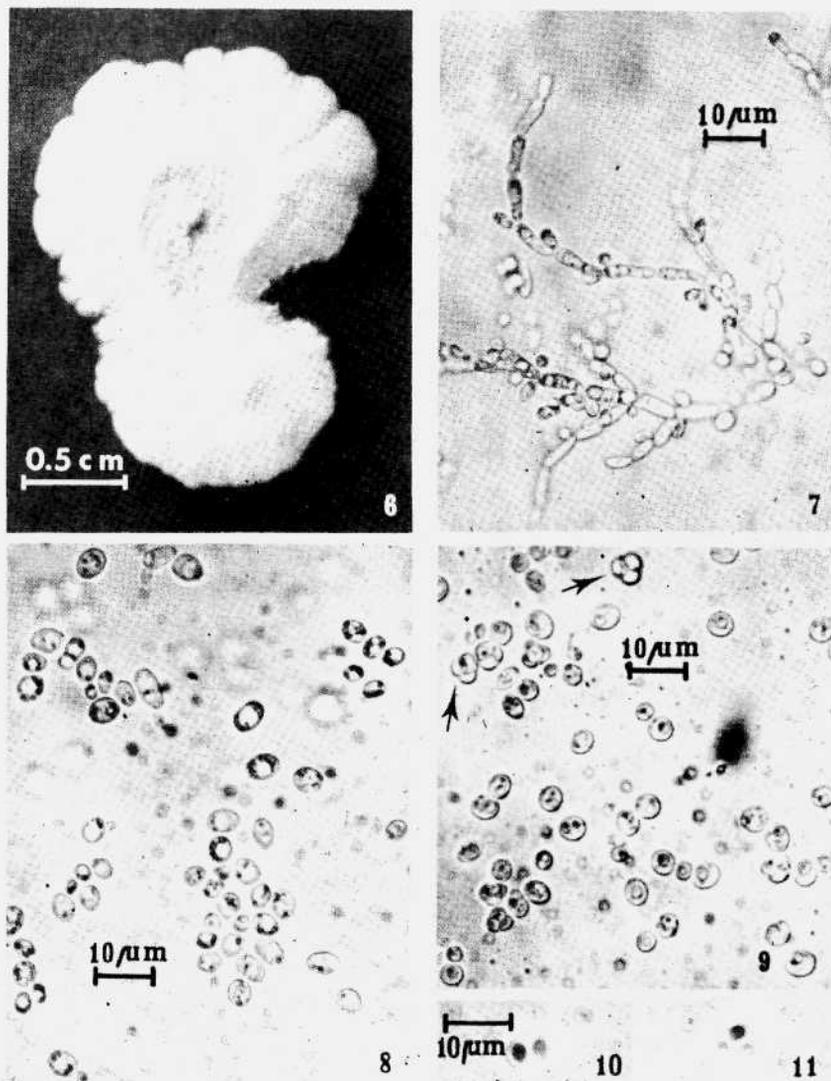
Se reconoce la asistencia técnica de la M. en C. Cora Salinas, en la elaboración de medios de cultivo utilizados en el presente estudio. Se agradece a las Dras. Martha Ortega González y Evangelina Pérez-Silva, así como a la Sra. Catalina Herrera de Galindo, el haber proporcionado, cada una de ellas, una de las tres muestras de tибicos, de donde fueron aisladas las cepas de levaduras que son objeto de esta comunicación.



Figuras 1-2.—Aspecto de las zoogleas (tībicos) formadas en agua endulzada con piloncillo; X2 y X4, respectivamente.



Figuras 3-5.—*Pichia membranaefaciens*. 3: colonia gigante, de 20 días, en medio de V8 agar, X3. 4: pseudomicelio en placa de Dalmau en medio de harina de maíz agar, X 1000. 5: asca con tres ascosporas visibles (flecha), en medio de glucosa-extracto de levadura-peptona-agar, X 1000.



Figuras 6-11.—*Saccharomyces cerevisiae*. 6: colonia gigante, de 20 días, en medio de V8 agar, X3. 7: pseudomicelio en placa de Dalmou en medio de harina de maíz agar, X 1000. 8: células vegetativas en medio de V8 agar, X 1000. 9: células vegetativas y ascas (flechas) en medio de V8 agar, X 1000. 10 y 11: asca con dos ascosporas y asca con tres ascosporas, respectivamente, en medio de Gorodkova, X 1200.

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.
- Herrera, T. y M. Ulloa, 1981. Estudio de *Sacharomyces cerevisiae* y *Candida valida*, levaduras aisladas del colonche de San Luis Potosí, México. **Rev. lat-amer. Microbiol.** (en prensa).
- Lodder, J. 1970. **The yeasts, a taxonomic study.** North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1385 p.
- 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 tibicos del arroz. Tesis profesional, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., 60 p.
- Moreno y Díaz, M. del Pilar, 1932. Contribución al estudio bacteriológico y al análisis químico del vinagre que produce el tibico. Tesis profesional, Facultad Química y Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Ruiz Oronoz, M., 1932. Estudio micológico de las zoogreas conocidas vulgarmente como tibicos. **An. Inst. Biol., Univ. Nal. Autón. México** 3: 183-190
- 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, 1979. Aspectos generales sobre etnología, microbiología y química de bebidas fermentadas indígenas de México. **Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.** 39 (en prensa).