

Pichia membranaefaciens y su ESTADO ASEXUAL, *Candida valida*, AISLADAS DEL TEGÜINO DE CHIHUAHUA, MÉXICO*

TEÓFILO HERRERA**

MIGUEL ULLOA**

RESUMEN

Este trabajo trata de la identificación de las levaduras *Pichia membranaefaciens* y su estado imperfecto, *Candida valida*, aisladas por primera vez del tescüino, bebida alcohólica elaborada por fermentación de granos de maíz germinados, que fue preparada por tarahumases de Chihuahua, México.

Las características morfológicas de estas dos levaduras fueron relativamente diferentes pero sus propiedades fisiológicas fueron idénticas, excepto que el ácido cítrico fue asimilado solamente por *C. valida*.

ABSTRACT

This paper deals with the identification of the yeasts *Pichia membranaefaciens* and its imperfect state, *Candida valida*, isolated for the first time from tescüino, alcoholic beverage obtained by fermentation of germinated maize kernels, which was prepared by Tarahumar Indians of Chihuahua, Mexico.

The morphological characteristics of these two yeasts were somewhat different, but their physiological properties were identical, except that citric acid was assimilated only by *C. valida*.

INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores se ha comunicado la presencia de levaduras y bacterias en el tescüino, bebida alcohólica preparada de muy diversas maneras (generalmente por fermentación de granos de maíz germinados) y que es consumida principalmente por ciertos grupos indígenas del noroeste de México, como los tarahumases y los tepehuanos. Ulloa y Herrera (1973) registraron, en una muestra de tescüino procedente de Chihuahua, México, el primer microorganismo aislado de esa bebida, correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae*. Ulloa, et al. (1974) hicieron un estudio de *Bacillus megaterium*, aislado por ellos a partir de una modalidad de tescüino, también proveniente de Chihuahua, México, elaborado por fermentación de jugo de maguey (*Agave* sp.), obtenido de hojas machacadas,

* Manuscrito recibido el 3 de febrero de 1978.

** Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. México 20, D. F.

hervidas y coladas, mezclado con jugo de raíz molida de "gotoko" (*Phaseolus metcalfei*). Ulloa, et al. (1977) aislaron *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum* de muestras de tesgüino mestizo, es decir, de tesgüino no preparado por indígenas, obtenido de Jalisco, México.

En el presente trabajo, se comunica el aislamiento de dos cepas identificadas una como *Pichia membranaefaciens* Hansen, y la otra como *Candida valida* (Leberle) van Uden et Buckley, correspondiendo esta última al estado asexual de la primera. La muestra de tesgüino de donde fueron aisladas dichas cepas procede de Bahichi-Cusarare, Chihuahua y fue amablemente proporcionada a los autores por Robert Bye (antropólogo de la Universidad de Harvard, Cambridge, Mass., E.U.A.) quien ha estado trabajando sobre aspectos antropológicos de los indios tarahumares de Chihuahua.

Las levaduras fueron aisladas por el método de las estrías múltiples en medio de extracto de malta agar Difco. Posteriormente, a partir de colonias puras, se hicieron resiembras a los medios de cultivo utilizados en el presente estudio, todos ellos de la marca Difco, excepto los de V8 agar, de Fowell y de Gorodkova, los cuales fueron preparados en el laboratorio a partir de los ingredientes correspondientes. Las pruebas de fermentación de carbohidratos, las de asimilación de éstos y de otros compuestos del carbono, así como las de asimilación de nitratos, crecimiento en medio libre de vitaminas y la estimulación del crecimiento por estas últimas sustancias, además de otras pruebas indicadas en el presente trabajo, fueron hechas de acuerdo a la metodología recomendada por Wickerham (*in* Lodder, 1970).

A continuación se indican las características morfológicas y fisiológicas de las cepas estudiadas.

Pichia membranaefaciens

Crecimiento en extracto de malta agar. Bueno. Después de 3 días, las células vegetativas son ovaladas, elipsoidales o cilíndricas, de 2 a 4.5 μm de ancho por 3 a 12 μm de largo; independientes, con un brote polar o subpolar, o en pares. La colonia es blanca y brillante, de borde ligeramente lobulado.

Crecimiento en extracto de malta líquido. Abundante; hay formación de sedimento y de película blanca, opaca, seca, lisa y ascendente.

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 20 días la colonia gigante es de color blanco amarillento, moreno claro o amarillo grisáceo, butirosa, aplanada o ligeramente convexa, semibrillante, lisa en su totalidad o ligeramente granulosa en el centro, región en donde empieza a oscurecerse cuando se forman las ascosporas en mayor cantidad. Presenta el borde entero o irregularmente lobulado (Fig. 1). Las células vegetativas son elipsoidales, cilíndricas u ovaladas, independientes, con un brote polar o subpolar, o están dispuestas en pares y en cadenas, algunas de estas últimas ramificadas; miden de 2 a 6 μm de ancho por 4 a 20 μm de largo. Las ascas son elipsoidales, de 4 a 6 μm de ancho por 6 a 10 μm de diámetro,

contienen generalmente 2 ascosporas, de aproximadamente 2 μm de diámetro, esferoidales o en forma de sombrero y con un glóbulo de grasa en el interior (Fig. 2); cuando las ascosporas son en forma de sombrero pueden presentar un borde conspicuo en la parte aplanada. Las ascosporas son liberadas del asca fácilmente.

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. Se forma un pseudomicelio arbustiforme bien desarrollado (Fig. 3).

Esporulación. Abundante en V8 agar, extracto de malta (con y sin agar), agar para morfología de levaduras y Gorodkova.

Fermentación

| | |
|-----------------------|-------------------------------|
| Glucosa + (muy débil) | Melibiosas - |
| Galactosa - | Rafinosa - |
| Sucrosa - | Melezitosa - |
| Maltosa - | Inulina - |
| Celobiosas - | Almidón soluble - |
| Trehalosa - | α -Metil-D-Glucósido - |
| Lactosa - | |

Asimilación

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| Glucosa + | D-Ribosa - |
| Galactosa - | L-Ramnosas - |
| L-Sorbosa + | Etanol + |
| Sucrosa - | Glicerol - |
| Maltosa - | Eritritol - |
| Celobiosas - | Ribitol - |
| Trehalosa - | Galactitol - |
| Lactosa - | D-Manitol - |
| Melibiosas - | D-Glucitol - |
| Rafinosa - | α -Metil-D-Glucósido - |
| Melezitosa - | Salicina - |
| Inulina - | DL-Ácido láctico + |
| Almidón soluble - | Ácido succínico + |
| D-Xilosa + | Ácido cítrico - |
| L-Arabinosa - | Inositol - |
| D-Arabinosa - | |

Asimilación de nitrato de potasio. Negativa.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Crecimiento a 37 C. Negativo.

Candida valida

Crecimiento en extracto de malta agar. Bueno. Después de 3 días las células vegetativas son de ovaladas a cilíndricas, de 2 a 4.5 μm de ancho por 3 a 20 μm largo; independientes, en pares o en cadenas, algunas de éstas ramificadas. La colonia es blanca, opaca y de borde fimbriado debido a la formación de pseudo-micelio.

Crecimiento en extracto de malta líquido. Abundante; hay formación de sedimento y de película blanca, opaca, seca, lisa y ascendente.

Crecimiento en V8 agar. Vigoroso. A los 20 días la colonia gigante es de color blanco crema, butirosa, ligeramente convexa, con el centro un poco elevado, semi-brillante, lisa, con el borde irregular y fimbriado. Las células vegetativas son de forma y tamaño muy variados, de ovoides a elipsoidales y cilíndricas, de 2 a 4 μm de ancho por 4 a 45 μm de largo; las células pueden estar independientes, con un brote polar, o estar dispuestas en pares y en cadenas, algunas de éstas ramificadas.

Crecimiento en agar para morfología de levaduras. Vigoroso. A los 20 días la colonia gigante es de color blanco crema, de consistencia cremosa, ligeramente convexa, opaca, radical e irregularmente fibrosa-estriada y con el borde entero a ligeramente fimbriado (Fig. 4).

Placa de Dalmau en harina de maíz agar. Forma abundante pseudomicelio, tanto debajo del cubreobjetos como fuera de él, y consiste de células ovoides y cilíndricas en cadenas ramificadas (Fig. 5).

Esporulación. Ausente en todos los medios utilizados.

Fermentación

| | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Glucosa + (muy débil y lenta) | Melibiosas - |
| Galactosa - | Rafinosa - |
| Sucrosa - | Melezitosa - |
| Maltosa - | Inulina - |
| Celobiosas - | Almidón soluble - |
| Trehalosa - | α -Metil-D-Glucósido - |
| Lactosa - | |

Asimilación

| | |
|-------------|--------------|
| Glucosa + | D-Ribosa - |
| Galactosa - | L-Ramnosas - |
| L-Sorbosa + | Etol + |
| Sucrosa - | Glicerol - |
| Maltosa - | Eritritol - |

| | |
|-------------------|-----------------------|
| Celobiosa - | Ribitol - |
| Trehalosa - | Galactitol - |
| Lactosa - | D-Manitol - |
| Melibiosa - | D-Glucitol - |
| Rafinosa - | α-Metil-D-Glucósido - |
| Melezitosa - | Salicina - |
| Inulina - | DL-Ácido láctico + |
| Almidón soluble - | Ácido succínico + |
| D-Xilosa + | Ácido cítrico + |
| L-Arabinosa - | Inositol - |
| D-Arabinosa - | |

Asimilación de nitrato de potasio. Negativa.

Crecimiento en medio libre de vitaminas. Positivo.

Crecimiento a 37 C. Negativo.

DISCUSIÓN

Pichia membranaefaciens fue por primera vez descrita, bajo el nombre de *Saccharomyces membranaefaciens*, por Hansen, en 1888, quien la aisló del exudado de un olmo en Copenague, Dinamarca. En 1904, el mismo Hansen transfirió la especie al género *Pichia*. Posteriormente, diferentes autores han aislado esta especie de sustratos muy diversos, tales como vino agrio, cerveza, kummis (leche agria de Rusia), plátanos, piña, levadura comprimida, dátiles en descomposición, sidra, exudados de encinos, heces fecales, jugo de zarzamora, uvas, granada, pepinillos en salmuera, granos de tibico, yogurt, larvas de *Drosophila*, y de esputos, entre otros (Lodder, 1970).

Esta es la primera ocasión en que se registra *P. membranaefaciens* del tesgüino, sustrato que puede ser considerado como una cerveza de maíz, comparable al que se emplea en la elaboración de la cerveza de cebada, aunque, desde luego, el producto final es diferente debido a que, además de que en su elaboración se utilizan algunos otros ingredientes, en la última los microorganismos son eliminados, después de la fermentación, por medio de filtración y esterilización o pasteurización, procedimientos que no se siguen en el caso del tesgüino bebida en la cual se beben tanto los productos de la fermentación como los microorganismos involucrados en la misma.

Puesto que no se han realizado estudios que correlacionen los cambios químicos que se suceden durante la fermentación del tesgüino con los microorganismos existentes en él, no se sabe el papel que *P. membranaefaciens* pueda desempeñar en la fermentación de esa bebida, pero es probable que utilice parte del alcohol etílico producido por especies de *Saccharomyces*, que comúnmente crecen en el tesgüino, pues en las pruebas de asimilación de compuestos de carbono efectuadas en este estudio se observó una capacidad notoria para asimilar dicho alcohol.

Candida valida estaba considerada anteriormente como *C. mycoderma* junto con *C. vini* (Desmazières ex Lodder) van Uden et Buckley, y estas especies, junto con otras relacionadas, quedaban incluidas en el género *Mycoderma*, el cual no es aceptado en la actualidad por tratarse de un *nomen ambiguum* (Lodder, 1970).

C. valida ha sido también encontrada en diversos sustratos, incluyendo vino turbio, cerveza, piel manchada, líquido para curtir piel, levadura para panificación, agua de pozo, granos kefir (granos malteados de sorgo) y masa de harina de maíz fermentada para la elaboración de pan.

P. membranaefaciens y su estado asexual, *C. valida*, fueron aisladas directamente del tesgüino como cepas independientes y como tales fueron estudiadas. Aunque hubo una concordancia de las dos cepas en las pruebas de fermentación y asimilación antes enumeradas, el ácido cítrico sólo fue asimilado por *C. valida*. Esto parece indicar que, a reserva de que fuera confirmado por un estudio genético especial, en la fase perfecta puede haber una inhibición del mecanismo enzimático que permita la asimilación del ácido cítrico como única fuente de carbono.

Las células vegetativas, el pseudomicelio y la colonia gigante de las dos cepas mostraron una morfología diferente por lo que al inicio del presente estudio fueron consideradas como especies separadas. No obstante, sus propiedades fisiológicas fueron iguales, con la excepción anotada, y como, además, *C. valida* no formó ascas y ascosporas, ésta es considerada como la fase imperfecta de *P. membranaefaciens*.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce la colaboración de Robert Bye en la obtención de las muestras de tesgüino estudiadas y de la M. en C. Cora Salinas en la preparación de los medios de cultivo empleados en este estudio.

LITERATURA CITADA

- LODDER, J., 1970. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. North Holland, Amsterdam, 1,385 p.
- ULLOA, M. y T. HERRERA, 1973. *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura fermentadora del tesgüino de los indios tarahumares. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 7: 33-38.
- , C. SALINAS y T. HERRERA, 1974. Estudio de *Bacillus megaterium* aislado del tesgüino de Chihuahua, México. *Rev. lat.-amer. Microbiol.* 16: 209-211.
- , T. HERRERA y J. TABOADA, 1977. *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum* aisladas de diferentes muestras de tesgüino de Jalisco, México. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 11: 15-22.

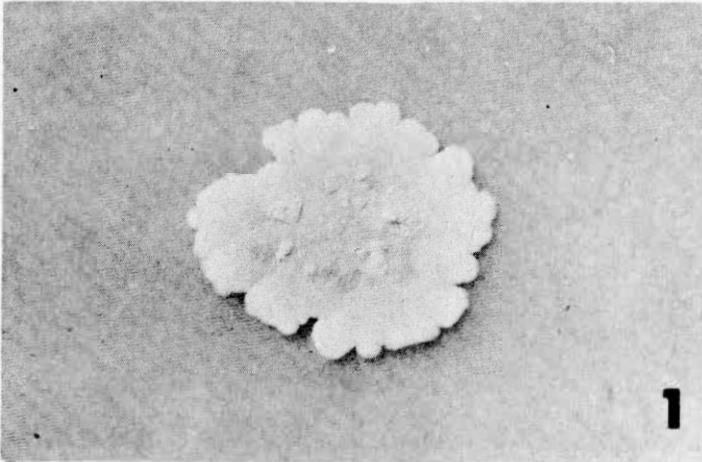


Fig. 1. Colonia gigante de *P. membranaefaciens* desarrollada en medio de V8 agar durante 20 días.

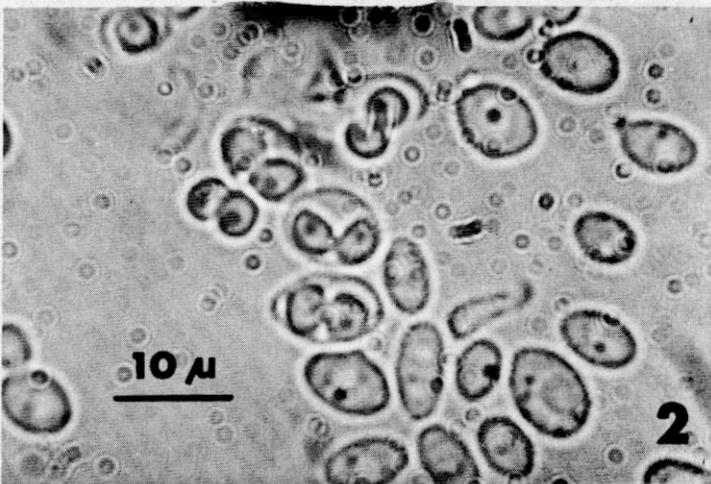


Fig. 2. Ascas y ascosporas de *P. membranaefaciens* desarrolladas en V8 agar.

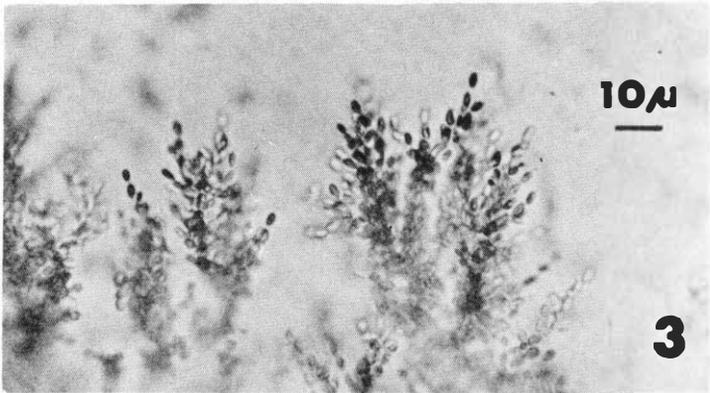


Fig. 3. Seudomicelio de *P. membranaefaciens* en placa de Dalmau en harina de maíz agar, a los diez días.

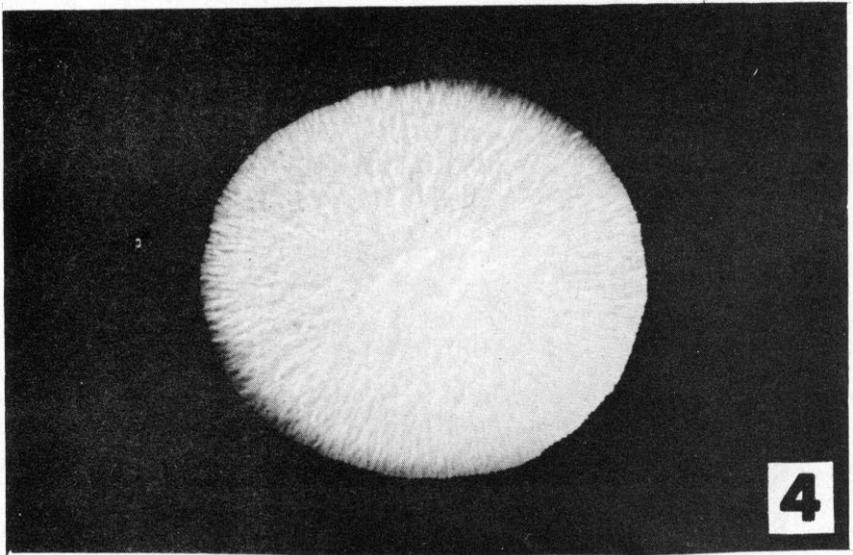


Fig. 4. Colonia gigante de *C. valida* desarrollada en agar para morfología de levaduras durante 20 días

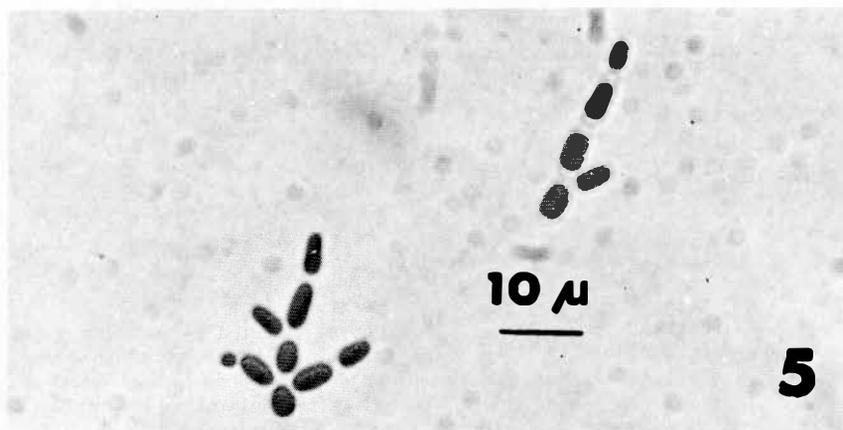


Fig. 5. Seudomicelio de *C. valida* en placa de Dalmat en harina de maíz agar, a los diez días.