

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
UNAM

ESTUDIO SOBRE LEVADURAS AISLADAS EN SALMUERAS  
DE ACEITUNAS

T E S I S

Que para obtener el Título de:

BIOLOGO

p r e s e n t a

ADELAIDA CASAMITJANA VIVES

México, D. F.

1965

## A G R A D E C I M I E N T O S

La presente tesis fue elaborada totalmente con materiales y en las instalaciones de la Compañía Hijos de Ybarra de México, S. A., y amablemente dirigida en su fase inicial por el Dr. Manuel Ruiz Oronoz y posteriormente por el Dr. --- Teófilo Herrera Suárez, del Instituto de Biología de la U.N.A.M., y por el Ing. Quím. Enrique García Galiano, de la citada Compañía.

El Dr. Horacio Fernández Verdet, de la Compañía Hijos de Ybarra, leyó el manuscrito e hizo valiosas sugerencias, especialmente en el capítulo introductorio.

Algunos aspectos bioquímicos estuvieron amablemente asesorados por la Dra. Cristina Pérezamador, del Instituto de Química de la U.N.A.M.

Todas las fotografías que ilustran el trabajo, fueron tomadas por el Biól. Ramón Riba Nava-Esparza.

Quede patente a todas estas personas e ---  
instituciones, el sincero reconocimiento y gra-  
titud por su inestimable ayuda.

## C O N T E N I D O

Introducción	1
Métodos y Materiales de Trabajo	10
Resultados	32
Asimilación de Acido Láctico	72
Discusión	90
Conclusiones	96
Resumen	99
Bibliografía	101

I N T R O D U C C I O N

Si bien el motivo del presente trabajo tiene por objeto fundamental el estudio de las levaduras, así como su efecto sobre las salmueras de fermentación de aceitunas, es interesante dar primeramente y aunque sea en forma sucinta, una reseña de la elaboración de aceitunas, tipo español.

El Olivo. El origen del olivo, Olea europaea, se asigna indiscutiblemente a la zona del Mar Mediterráneo, aunque haya una discrepancia generalizada en cuanto al lugar preciso.

Ya fuese este lugar, Egipto, Grecia, Siria o Etiopía, lo cierto es que su área natural de vegetación se extendió a toda la costa mediterránea.

A América llegó el olivo traído por los misioneros, y así aparece tanto en Sudamérica como en América del Norte. En el siglo XVII, el rey Carlos III de España prohibió las licencias de plantaciones de olivo en América, en previsión de evitar que las colonias españolas de aquel entonces, resultaran con el tiempo competidoras en la-

producción de aceite. Aún más, por medio de un -  
real decreto, mandó talar todos los olivos exis--  
tentes en esa fecha en América. Por suerte, esta  
real tala no fue todo lo efectiva que el rey qui-  
so que fuese, y los olivos que se salvaron de ---  
ella, son los predecesores de los olivos actuales.

Las Aceitunas. Como es bien sabido, las ---  
aceitunas son los frutos del olivo.

Ante la gran cantidad de variedades de olivo  
y por ende de aceitunas, existentes en el mundo, -  
se da una relación de las variedades utilizadas -  
en distintos países para preparar o aderezar el -  
tipo español:

España: Variedades Gordal o Sevillana, Manza  
nilla, Morona, Ropazalla, Carrasqueña.

Argentina: Variedades Aranco o Criolla, Man-  
zanilla, Ascolano, Empeltre.

Estados Unidos de Norteamérica: Variedades -  
Misión, Manzanilla, Sevillano, Ascolano.

México: Variedades Misión, Manzanilla, Neva  
dillo.

Francia: Variedades Touche, Picholine, Axme

llau.

Italia: Variedades Ascolano, Cerignola, Santa Caterina, Areco.

Composición Química de las Aceitunas Aderezadas. Las aceitunas verdes aderezadas contienen en 100 g, los siguientes metales expresados en miligramos: 2.8 de hierro; 0.28 de cobre; 2 de manganeso; 0.0011 de sodio. Además contienen 200 U. I. de vitamina A y vestigios de vitaminas B<sub>1</sub>. (7)

Elaboración o Aderezo de Aceitunas Tipo Español. Luego de seleccionada la variedad adecuada para preparar, lo cual se hace teniendo en cuenta la calidad final que dará como fruto elaborado, así como su tamaño, se espera a que las aceitunas tomen su punto adecuado de madurez en el árbol antes de cosecharlas.

Si las aceitunas se prepararán negras, se cosecharán totalmente maduras, o sea cuando los frutos han tomado un intenso color negro violáceo. Si se las preparará verdes, el punto ideal de cosecha será cuando los frutos toman un color verde pajizo.

La cosecha se hará con el máximo de cuidados para que los frutos no se maltraten.

Tratamiento con Hidróxido de Sodio. Una vez cosechadas las aceitunas y seleccionadas por tamaños, se procede a hacerles un tratamiento con hidróxido de sodio, que tiene por objeto eliminar el amargor natural de las aceitunas, debido a la presencia de "oleuropeína", glucósido amargo, de carácter levógiro, soluble en agua.

El tratamiento alcalino se hace en piletas de cemento o cubas de madera. Las soluciones de NaOH utilizadas, varían entre concentraciones de 1.25 a 2.2%, según la variedad y tamaño de las aceitunas a elaborar.

Este tratamiento dura entre 8 y 12 horas, para permitir que la solución de hidróxido de sodio penetre hasta las 2/3 partes de la pulpa de las aceitunas. Conseguido ésto, se elimina la solución alcalina.

Lavados. Tienen por objeto eliminar la alcalinidad remanente en las aceitunas luego del tratamiento con hidróxido de sodio. Una vez quitada la solución de NaOH, es reemplazada de inmediato por agua, hasta cubrir totalmente las aceitunas. Estas aguas de lavado son cambiadas a intervalos de 3 a 5 horas, hasta conseguir que el agua del último tenga un pH máximo de 8.5

Tratamiento con Hidróxido de Sodio. Una vez cosechadas las aceitunas y seleccionadas por tamaños, se procede a hacerles un tratamiento con hidróxido de sodio, que tiene por objeto eliminar - el amargor natural de las aceitunas, debido a la presencia de "oleuropeína", glucósido amargo, de carácter levógiro, soluble en agua.

El tratamiento alcalino se hace en piletas - de cemento o cubas de madera. Las soluciones de NaOH utilizadas, varían entre concentraciones de 1.25 a 2.2%, según la variedad y tamaño de las - aceitunas a elaborar.

Este tratamiento dura entre 8 y 12 horas, pa - ra permitir que la solución de hidróxido de sodio penetre hasta las 2/3 partes de la pulpa de las - aceitunas. Conseguido ésto, se elimina la solu - ción alcalina.

Lavados. Tienen por objeto eliminar la alca - linidad remanente en las aceitunas luego del tra - tamiento con hidróxido de sodio. Una vez quitada la solución de NaOH, es reemplazada de inmediato - por agua, hasta cubrir totalmente las aceitunas.- Estas aguas de lavado son cambiadas a intervalos - de 3 a 5 horas, hasta conseguir que el agua del - último tenga un pH máximo de 8.5

Envasado en Barriles y Fermentación. Efec--  
tuados los lavados, las aceitunas son colocadas -  
en barriles. En América se utilizan barriles de--  
200 litros en los cuales caben 130 kg netos de --  
aceitunas, mientras que en España se usan reci---  
pientes grandes, de igual forma que los barriles,  
pero de 700 litros de capacidad y en los que ca--  
ben 450 kg netos de aceitunas; estos recipientes--  
reciben el nombre de "bocoy".

Colocadas las aceitunas en los barriles, és--  
tos son tapados perfectamente, dejándoles solamen--  
te en un costado, sobre una duela, un orificio de  
un diámetro de 5 cm, por donde se les agrega la -  
salmuera de fermentación. Los barriles se acomod--  
an al aire libre, en el patio de fermentación y  
acostados con el orificio hacia arriba.

En España, por ser las aceitunas de "secano",  
es decir, que los olivos no son regados sino que  
el agua que reciben es exclusivamente por precipi--  
tación pluvial, las salmueras de fermentación uti--  
lizadas son de concentración alta, variando entre  
10% y 12% de sal.

Al ser trasladado a América, el olivo se ---  
transformó en árbol de riego, ya que si no se rie--  
ga no fructifica. Debido a ésto, las aceitunas -  
contienen una mayor cantidad de agua; esta parti--

cularidad hace que en América, las salmueras de fermentación sean de concentraciones menores a las de España, utilizándose salmueras entre 7% y 9% de sal.

Si se utilizan salmueras más altas, por efecto de la exósmosis, los frutos sufren una contracción resultante en un arrugado de su superficie exterior que generalmente es permanente, inutilizándose los frutos en su valor comercial.

Algunos técnicos elaboradores adicionan a las salmueras "iniciadores" en la fermentación; éstos están constituidos por cultivos de fermentos lácticos en distintos caldos de cultivo. Asimismo, puede ser necesario agregar cantidades variables de azúcares (generalmente glucosa) para reemplazar los azúcares naturales de las aceitunas perdidos en buena proporción durante el proceso de tratamiento con NaOH y los subsiguientes lavados.

En el patio de fermentación, al aire libre, las aceitunas comienzan su fermentación; durante todo el proceso de aderezo las aceitunas sufren en su composición una serie de procesos fisicoquímicos y microbiológicos, con los cuales van adquiriendo características organolépticas especiales, que harán de ellas al final de la fermentación un

producto alimenticio muy apreciado.

Al iniciarse la fermentación, se encuentran en la salmuera un gran número de microorganismos que comprenden levaduras, otros hongos y bacterias y que son aportados por el agua, el aire, las mismas aceitunas, los utensilios de trabajo, barriles, etc. Las bacterias del ácido láctico se encuentran en muy pequeño número, siendo superadas por los microorganismos no deseables en enorme proporción.

Sin embargo, a medida que transcurren los días, si la fermentación por medio de cuidados es llevada por buen camino, las bacterias lácticas comenzarán a multiplicarse rápidamente, dominando por completo la fermentación y produciendo el tan deseado ácido láctico, imprescindible para la obtención de un buen fruto terminado, que al cabo de cuatro meses de terminada la fermentación, llega a tener las siguientes características:

gramos de ácido láctico por 100 ml de salmuera - 0.8 a 1.5 g

pH - 3.5 a 4.2

Las bacterias lácticas predominantes durante la fermentación son las siguientes: Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum, Lactobaci

llus brevis. Transforman los azúcares en ácido láctico.

Este ácido láctico producido durante la fermentación, es el que aprovecharán en su beneficio las levaduras que lleguen a desarrollarse por mala atención de los barriles, alcanzando a consumirlo en tal cantidad, que la disminución de acidez y el aumento de pH, harán peligrar las aceitunas preparadas, llegando a su total pérdida en ciertos casos.

Precisamente de este problema surgió la idea para la realización del presente trabajo, tratando de identificar algunas de las levaduras que aparecen más frecuentemente en el proceso antes mencionado, y determinar si la cantidad de ácido láctico consumido por ellas es realmente lo bastante importante como para llegar a ser un peligro verdadero para la conservación de los frutos elaborados.

MATERIALES Y METODOS DE TRABAJO

## MATERIALES Y METODOS DE TRABAJO

Con una pipeta estéril se tomaron muestras - de salmuera de algunas barricas conteniendo aceitu nas verdes y negras (maduras). Dichas muestras se sembraron en varias cajas de Petri, conteniendo me dios de cultivo diversos con el fin de ver cuál -- era el más apropiado para su crecimiento, a la vez que irlas aislando (11, 20, 25, 30, 31, 32).

Se emplearon los siguientes medios de cultivo:

- a) Infusión de levadura
- b) Infusión de alfalfa-agar
- c) Glucosa Malta-agar
- d) Sabouraud-dextrosa agar
- e) Agar nutritivo
- f) Extracto de levadura Agar
- g) Extracto de Malta Agar

Los que dieron mejor resultado, Sabouraud- - dextrosa agar, y extracto de mal agar, han sido - usados preferentemente a lo largo de este estudio, excepción hecha de aquellas pruebas que específicamente han requerido de determinados medios, como es el caso de Gorodkowa Agar, Mosto Agar, Medio de Fowel, en la prueba de esporulación, de -- los preparados especialmente para las pruebas auxanográficas de asimilación de azúcar y nitrógeno, del medio de Papa-agar empleado para la formación de micelio, etc. (10, 23, 25, 39, 40, 46).

Una vez logrado el aislamiento de las diversas cepas, se ha procedido a una selección de --- aquellas levaduras que se consideran más interesantes, sometiéndolas a una prueba de fermenta--- ción de glucosa, eligiendo cinco fermentativas -- (producción de gas) por considerárselas las más -- interesantes desde el punto de vista industrial, -- y dos no fermentativas tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas.

Hecho ésto y queriendo tener la seguridad de trabajar con cepas puras, se ha seguido con cada una de las elegidas el método de "cultivo en G---otas" de Lindner (31). Para ello se efectúa una -- dilución en uno o varios tubos conteniendo extracto de malta estéril; a continuación se toma con -

plumilla estéril también, un poco de la dilución, colocándola rápidamente en un cubreobjetos en -- forma de gotas dispuestas en hileras, y sin dar tiempo a que se sequen, se coloca el cubreobje-- tos sobre una cámara húmeda estéril (anillo de -- vidrio fijo a un portaobjetos por medio de para-- fina o bálsamo de Canada, y con una gota de agua en el interior), sellando los bordes con vaseli-- na para evitar la evaporación. Seguidamente, se lleva bajo el microscopio para ver cuál o cuáles fotas contienen una sola célula, señalándolas me-- diante una pequeña marca hecha con lápiz graso, -- y siguiendo su crecimiento. En cuanto se ha for-- mado una colonia, se absorbe la misma con un pa-- pel estéril, que se coloca rápidamente dentro de un tubo o caja conteniendo medio sólido. La co-- lonia así obtenida es pura, por provenir de una-- sola célula.

Por otro lado, en todas aquellas cajas don-- de se ha observado contaminación de bacterias, -- se adiciona ácido láctico, magnífico bacteriostá-- tico que detiene el crecimiento de aquellas, sin perjudicar o afectar el de las levaduras.

Logradas las cepas puras, se inicia una se-- rie de pruebas, de acuerdo con Lodder y Kreger-- Van-Rij, 1952, para proceder a su clasificación. Dichas pruebas pueden reducirse a aquellas de ti

po morfológico y a las de tipo fisicoquímico (fisiológicas).

Propiedades Morfológicas Observadas:

1. Características macroscópicas de los cultivos en medios líquidos y sólidos.
2. Forma y tamaño de las células.
3. Características de la reproducción vegetativa.
4. Formación de ascosporas.
5. Formación de balistosporas.
6. Tamaño de las ascosporas.

Propiedades Fisiológicas y Fisicoquímicas observadas:

1. Fermentación.
2. Asimilación de azúcar.
3. Asimilación de nitratos.
4. Etanol como fuente única de carbono.
5. Desdoblamiento de arbutina.
6. Producción de pigmentos carotenoides.
7. Producción de compuestos amiláceos.
8. Producción de ésteres.

9. Reacción en leche tornasolada.
10. Desdoblamiento de grasas.
11. Producción de acidez.

Todas estas pruebas se efectuaron por duplicado, para obtener una mejor apreciación de los resultados. La lectura de los mismos ha variado de acuerdo con el tipo de experimento, entre 24 horas y cuarenta días.

#### 1. Características macroscópicas

Para estudiarlas, se han usado los medios de Malta agar y Extracto de Malta. En el caso de formación de película tiene gran importancia la composición del medio, así como la cantidad de inóculo; para cada levadura se preparan dos tubos con extracto de Malta, medio sumamente favorable, haciéndose la primera observación a las 24 horas, a 17°C y después sucesivamente durante cuarenta días.

Para el estudio morfológico de las colonias, se han empleado tres tubos por levadura, conteniendo Malta agar, y efectuando las siembras por medio de estriás, placa y picadura, para comparar resultados.

Para el estudio de las colonias gigantes, se han preparado cajas de Petri conteniendo Malta -- agar, y efectuando la siembra en el centro por medio de una ligera picadura, y a partir de un cultivo joven. La caja se sella para evitar la desecación, haciéndose la observación a los cuarenta días a temperatura ambiente. (8, 11, 20, 25, 31).

## 2. Forma y tamaño de las Células

Para ello se emplean básicamente los mismos medios arriba mencionados, además de algunos ---- otros usados para comparación de resultados; ya que todos han sido similares, no se considera necesario consignarlos, para no caer en una repetición de datos, sólo se mencionan los obtenidos en Malta agar y extracto de Malta. El procedimiento empleado ha sido la observación al estado fresco, generalmente en una gota de lugol para hacer más evidentes algunos detalles de estructura interna. Para conservación de preparaciones se ha empleado la técnica de Gram. Las observaciones hechas se refieren a forma, tamaño, tipo de reproducción vegetativa, disposición de los brotes con respecto a la célula, detalles de estructura interna, y -- uno de los más importantes, esporulación. (8, -- 20, 25, 31).

20, 25, 31).

### 3. Características de la Reproducción Vegetativa

De las siete levaduras con que se trabajó, no se pudo observar la formación de ascas, por lo que se usaron medios especialmente preparados para favorecer la esporulación. Dichos medios tienen una característica común: la de ser pobres en nutrientes, especialmente carbohidratos. Los medios que se han usado son: Gorodkowa agar, mosto agar (Difco) saturado de carbonato de calcio, bloques de yeso, bloques de papa y zanahoria, y el medio de Fowel (acetato sódico anhidro 0.3 a 0.5%, Agar-1.5%). (20, 25, 29, 31, 39).

El primer paso para provocar la esporulación, es la obtención de cepas jóvenes por medio de varias resiembras continuas en un medio apropiado para su crecimiento, lográndose así células grandes y cargadas de reservas, y con la seguridad de que no han perdido la facultad de formar ascas. Diversos investigadores han observado que cuando una cepa es mantenida en un mismo cultivo durante mucho tiempo, al resembrarla ha perdido su facultad esporógena. (14, 23, 29).

Asimismo, debe tenerse la seguridad de que - hay suficiente oxígeno en el medio, y mantener -- ajustado el pH entre 6.5 y 7.0. (20).

Para algunos investigadores (39), esta división entre levaduras ascosporógenas y anascosporógenas es totalmente falsa, basándose en la idea - de que cuando se trabaja con cepas desconocidas, - al menos en apariencia, que no tienen la facultad de formar ascas, ello puede deberse no a la célula misma, sino más bien a la incapacidad que tiene el medio para inducir esa esporulación. Esto se debe a que muchas especies se consideraron durante algún tiempo como no formadoras de ascas, - hasta que casualmente se encontraba un medio favorable desconocido hasta entonces, al que la misma levadura que había respondido negativamente ante otros medios, respondía positivamente formando -- sus ascas.

Teniendo en cuenta todo esto, las siete levaduras aquí descritas se han sometido a multitud - de diferentes medios y pruebas, incubándolas a dos temperaturas distintas: 20 y 25°C, y ajustando el pH entre 6.5 y 7.0. A pesar de ello, sólo se ha conseguido hacer esporular a dos de ellas (Pichia y Debaryomyces), la primera en Gorodkova, y la segunda en este mismo medio y en bloques de zanahoria.

Se ha procedido de la siguiente forma: para cada medio se han preparado dos tubos por levadura, conteniendo cada uno seis ml de medio. Para los bloques de yeso, papa y zanahoria, se coloca en un tubo un poco de agua en el fondo para conservar la humedad, se coloca después una horquilla de vidrio que hace de sostén al bloque para que no esté en contacto directo con el agua, ya que ello sería perjudicial al crecimiento del inóculo, ni toque las paredes del tubo. Se esteriliza por 20 minutos a 15 lb de presión, se siembran por estría, incubando unas a 20°C y otras a 25°C, haciendo la observación en un lapso que va de los cinco a los treinta días.

Debe anotarse el número de ascosporas por asca, su forma, tipo de membrana, si a su formación antecede conjugación, etc.

Para confirmar que los corpúsculos observados eran esporas, se ha procedido a una tinción empleando la técnica de Kufferath (20), con fucsina básica de Ziehl, y contrastando con azul de algodón. Quedan así las esporas teñidas en rojo y el resto de la célula en azul, todo sobre un fondo negro debido a la capa de tinta china que se extiende sobre la preparación.

Se ha recurrido también al método recomenda-

do por Shimwel (37), tiñendo con verde de malaquita acuoso al 5% de 1 a 3 minutos, calentando varias veces. Las esporas se tiñen de verde intenso.

Por último, se ha hecho una prueba de "cultivo en lámina" (25, 31), para estudiar el tipo de reproducción vegetativa y ver si forman lo que se llama un verdadero micelio (filamentos constituidos por células alargadas, no septadas) o por el contrario, no lo forman o bien constituyen un pseudomicelio (filamentos constituidos por células alargadas, a menudo ramificadas y septadas). En el caso de las levaduras aquí estudiadas, no se han tenido problemas al respecto, puesto que desde el principio se ha hecho aparente en cualquier medio su formación, o por el contrario, su ausencia.

Sin embargo, siguiendo las indicaciones dadas por Lodder & Kreger-Van Rij (25), se ha usado un medio de papa agar en un cultivo en lámina, llevándolo bajo el microscopio a los cinco días para su observación.

Los pasos a seguir son los siguientes: se esteriliza una caja de Petri con un disco de papel filtro en el fondo, conteniendo un triángulo de vidrio y colocando sobre de él un portaobje-

tos. Se moja el disco de papel filtro con agua destilada estéril, para conservar la humedad del medio; a continuación se vierte sobre otra caja, también estéril, el contenido de un tubo previamente preparado, de papa agar. Sin dar tiempo a que solidifique, se introduce el portaobjetos mediante unas pinzas flameadas, procurando empapar lo bien de medio, y regresándolo nuevamente en la caja sobre el triángulo; se incuba a 25°C.

De este modo se tiene ya una serie de datos bastante completos, de tipo morfológico, pero que por sí solos no son de mayor validez para clasificar las levaduras, requiriéndose para ello del concurso de pruebas de tipo bioquímico y fisiológico.

1. Fermentación. La fermentación de azúcares es una de las pruebas de valor más estable, y que se toma más en cuenta en la clasificación de especies y aún de géneros.

Las levaduras presentan una fermentación alcohólica, o sea una fermentación verdadera constituida por un proceso desmolítico puro, en el que en la destrucción de la cadena de carbón de las hexosas, queda totalmente excluida la incorporación de oxígeno por la molécula del azúcar, o sus productos de desdoblamiento; sólo se adi-

cionan a la molécula los elementos del agua. (30).

Este desdoblamiento alcohólico del azúcar da como productos finales anhídrico carbónico y acetaldéhid, que es propiamente el precursor del alcohol etílico.

El proceso de fermentación por las levaduras se realiza teniendo como base azúcares sencillos, que son los únicos que pueden desdoblar fácilmente: glucosa, levulosa, manosa, galactosa (monosacáridos), sacarosa, maltosa y lactosa (disacáridos), y en algunos casos especiales de identificación de levaduras, rafinosa (trisacárido). (13, 20, 21, 28, 32, 34).

AZUCAR  
(hexosa)

triosa

Compuestos --  
orgánicos con  
3 átomos com-  
binados con -  
ácido fosfóri-  
co

COENZIMA

ALCOHOL  
ETILICO

ac. fosfo-  
pirúvico

ac. pirú-  
vico

acetal-  
dehido

ADP

ATP

CO<sub>2</sub>

Glicerina

alcohol  
isoamílico

alcohol  
d'amílico

ácido  
succínico etc.

PRODUCTOS SECUNDARIOS DE LA FERMENTACION FOSFOPIRUVICA

Para la prueba se toma como medio básico, - extracto de levadura por su alto contenido nutritivo, factor éste de considerable importancia en la efectividad de la fermentación, si se tiene en cuenta que puede haber un resultado negativo si faltan los factores esenciales para un buen crecimiento; al medio básico se le agregan los azúcares a probar, en una concentración de 2%, y teniendo en cuenta las leyes de Kluyver-Dekker, 1914:

1. Toda levadura que no fermenta glucosa, - no fermenta ningún otro azúcar.
2. Toda levadura que fermenta glucosa, hace fermentar siempre la levulosa y manosa.
3. Ninguna levadura puede fermentar a la vez maltosa y lactosa.

Dos han sido los métodos empleados:

1) El de Henrici, en el que se usan pequeños tubos de Durham o Wasserman colocados invertidamente dentro de otro tubo mayor (25 cm x -- 150 mm), de modo que actúan como receptores de gas. 2) El de Guerra, que consiste en colocar en un tubo de ensaye unos 6 ml de medio azucarado al 2% y, ya estéril, se siembra la levadura;

a continuación, con una pipeta Pasteur, se va dejando caer gota a gota una mezcla de cinco partes de parafina por una de aceite de parafina, previamente estéril, a modo de formar un tapón de un grosor de 3 a 5 mm, cuidando de que ajuste perfectamente a las paredes del tubo, pues de otro modo puede escapar inadvertidamente el gas por este sitio.

Así, el gas formado irá empujando el tapón hacia arriba, ocupando la capa entre éste y la superficie del medio. Este método tiene la desventaja de crear condiciones estrictamente anaerobias, bajo las cuales algunas levaduras no se desarrollan. Las observaciones se efectuaron continuamente a partir de las 24 horas, hasta los treinta días, con obtención de resultados iguales en ambos métodos. La temperatura ha sido a todo lo largo del experimento, de 25°C.

2. Asimilación de Azúcares. La asimilación y la fermentación de azúcares constituyen dos procesos enteramente diferentes, con la capacidad -- por parte de la misma levadura, de asimilar azúcares no fermentescibles. Algunas de ellas, incluso, no llegan a fermentar ningún azúcar, y sí en cambio a asimilarlos (levaduras proteínicas), efectuando una oxidación respiratoria.

Este tipo de prueba es muy útil también para la diferenciación de especies, particularmente en aquellos casos en que la fermentación no se presenta.

El método usado para determinar la asimilación de azúcares, es el llamado auxanográfico -- (Beijerinck, 1889), usando como medio base, ---- aquél que se prepara con 0.1% de fosfato monopotásico, 0.05% de sulfato magnésico, 0.05% de sulfato amónico, y 2.0% de agar, con ausencia de -- fuentes inorgánicas de carbono. Estas se añaden posteriormente bajo la forma de: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

El procedimiento es el siguiente: se hace una dilución de levaduras en agua estéril, poniendo un ml de ella en una caja de Petri estéril; se vierte después el medio, cuidando que -- tenga una temperatura entre 45 y 50°C, nunca --- más, para no perjudicar la viabilidad de las levaduras, e imprimiendo un ligero movimiento de -- rotación a la caja, para distribuir homogéneamente el contenido. Una vez solidificado el medio, se divide la caja en dos zonas, por medio de una línea media, y en cada una de ellas se pone un -- azúcar distinto (en forma sólida) por medio de la asa microbiológica. Al difundirse en el medio, -- la levadura crecerá si es que asimila ese azú---

car; la observación debe hacerse cuidadosamente a partir de las 24 horas para evitar la mezcla de resultados.

Puede hacerse esto mismo en tubos diferentes para cada azúcar, pero conteniendo medio líquido. Las pruebas de asimilación trabajadas para cada una de las siete levaduras, se efectuaron por duplicado, incubando a 25°C y en aquellos casos en que el resultado era poco claro, se ha empleado una sola caja para el glúcido por probar (24, 25, 35).

3. Asimilación de Nitratos. La capacidad de una determinada especie de levadura para utilizar una fuente dada de nitrógeno, se ha empleado para ayudar a su clasificación. En general, pocas son las especies de levaduras capaces de asimilar el nitrógeno de los nitratos, y esta prueba de asimilación de nitratos tiene además un valor dudoso para determinados investigadores (46) que han visto que muchas especies son capaces de utilizar toda clase de compuestos nitrogenados, si se emplea un medio especial conteniendo vitaminas y ciertos elementos, dependiendo, en general, el metabolismo del nitrógeno de la concentración del medio, cantidad de inóculo, temperatura y edad de la cepa.

La técnica es la misma que se empleó para los azúcares, pero con la diferencia de que el medio de cultivo en este caso no tiene nitrógeno, y sí en cambio glucosa: glucosa 2%, fosfato mono potásico 0.1%, sulfato de magnesio 0.05%, agar 2.0%. Las sustancias nitrogenadas usadas han sido nitrato de potasio y sulfato de amonio, la lectura de los resultados se ha hecho a partir de las 24 horas, hasta los ocho días, a 25°C y siempre por duplicado ante una caja testigo.

La asimilación más intensa de nitrógeno se produce en el momento en que el crecimiento de levadura es aún muy escaso, o sea, en las diez primeras horas de hecha la siembra. (20).

4. Etanol como Fuente Unica de Carbono. Este tipo de prueba tiene un valor secundario en la clasificación. Lodder & Kreger-Van Rij, 1952, incluyen muchas veces dentro de una misma especie a levaduras que difieren en este carácter, por lo que no le dan una mayor importancia. El medio que se emplea es el siguiente: sulfato de amonio 0.1%, sulfato de magnesio 0.05%, fosfato monopotásico 0.1%, alcohol etílico 3 ml; se reparten cinco ml de medio en cada tubo, pero el alcohol no se agrega sino después de esterilizar para evitar que durante la misma se volatilice.

Los resultados, a temperatura ambiente, se toman una semana después contra tubos testigo, -- conteniendo el mismo medio pero sin alcohol; se anota tanto el grado de crecimiento, como la formación de película.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina. -- Este carácter se usa más bien para identificar de terminados grupos, como Hansenula (positivo) de Pichia (negativo). En muchas especies es, sin embargo, una propiedad variable. (23).

El medio que se emplea es el que sigue: 5 g de arbutina o esculina, 20 g de agar, en un litro de extracto de levadura al 8%. Ya preparado, se vierte en una caja de Petri, y se mezcla con una gota de cloruro férrico, por lo que en caso de haber un resultado positivo, se observa una zona de color moreno alrededor de la colonia, y que puede observarse a los dos, cuatro o seis días de efectuada la siembra, incubando a 25°C.

6. Producción de almidón. Esta prueba no tiene un valor absoluto en la evaluación taxonómica, sino que se usa más bien como una característica diferencial del Gr. Cryptococcus; se ha encontrado también en el Gr. Bullera, y en algunos otros grupos aislados. Se puede poner de mani---

fiesto si han formado almidón, por la adición de una solución de Lugol, que en presencia del almidón toma un color azul o morado, a veces algo marrón. El medio usado es el siguiente: sulfato de amonio 0.1%, sulfato de magnesio 0.05%, fosfato monopotásico 0.1%, glucosa 1.0%, agar 2.5%, - ajustando el pH a 4.5. La observación de resultados se hace entre una y dos semanas, incubando a 25°C. (25).

7. Producción de Ester (acetato etílico). - Tampoco este carácter tiene mayor significado taxonómico. Ha sido estudiado por Weber, 1922, -- Fabian y Wickerham, 1937, y Bedford, 1942 (25), - encontrando presente este carácter en Pichia fermentans, Candida krusei y Hansenula anomala entre otras. En este trabajo se ha encontrado que seis de las levaduras con las que se ha trabajado, han dado un resultado positivo.

El medio que se usa consiste en extracto de levadura glucosado al 5%, que se vierte en pequeños matraces de 50 cc, conteniendo cada uno 20 ml. El resultado se anota a los siete días al destapar el matraz, juzgando el aroma a éster -- por medio del olfato.

8. Reacción en Leche Tornasolada. Este carácter no es lo suficientemente característico -

como para permitirnos el emplearlo por sí solo en la diferenciación de especies. Para esta prueba se ha empleado el medio ya comercialmente preparado: Litmus Milk Difco, agregando en algunos tubos lactato de calcio, para proveer al medio de suficientes iones de calcio necesarios para la precipitación de la paracaseína formada. (25). Los tubos se tuvieron en observación durante un mes, sin arrojar resultados precisos tanto en el aspecto de coagulación como en el de peptonización.

9. Producción de Acido. La facultad de producir ácido a partir de un medio que contenga glucosa, es característica del género Brettanomyces. El método ideado por Custer, 1940, consiste en -- preparar un medio que contenga 20% de agar, 0.5% de glucosa, 0.05% de carbonato de calcio en una solución de extracto de levadura al 8%. Se reparten 6 ml en cada tubo, los que una vez estériles se inclinan. Ya sembrados, se incuban a 25°C durante 10 días, y si el resultado es positivo, para este tiempo el carbonato de calcio se ha disuelto ya, estando la cantidad de ácido producida, en relación directa a la rapidez y grado de disolución del carbonato de calcio.

Así pues, se ve que no es un carácter aislado el que podrá llevar a la clasificación de una levadura, sino la suma combinada de todos los datos mencionados.

## RESULTADOS

## CANDIDA MELINII DIDDENS ET LODDER

La muestra original de salmuera se tomó de una barrica que contenía aceitunas verdes variedad Misión, tamaño 210 a 230 aceitunas por kg, y la purificación del cultivo se hizo por medio de siembras sucesivas en malta agar, adicionando ácido láctico para detener el crecimiento de las bacterias. Lograda la purificación se pasó a la obtención de una capa cien por ciento pura, por medio del método de "gotas" de Lindner. (31).

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Líquido. Después de 24 horas de hecha la siembra, empieza a observarse ya un sedimento de color lechoso, iniciándose la formación de película y anillo: a los 18 días, el sedimento ha tomado un color moreno, y el anillo se ha convertido en un grueso velo membranoso, y el desarrollo es muy abundante con enturbiamiento del medio.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en

Medio Sólido. Después de tres días, en malta -- agar, a 25°C, se observan ya colonias bastante bien definidas, de color amarillento, forma irregular, con superficie mucosa si bien en algunos puntos se observa ya rugosa, los bordes aparecen rodeados por finísimas estriaciones de pseudomicelio, y se aprecian mucho más brillantes que el resto de la colonia. A los 30 días el color toma un tinte bastante más oscuro, que se acentúa en el centro debido al mayor grosor de la colonia en ese punto, y la superficie se ha tornado completamente membranosa.

De todos los cultivos hechos, mediante los sistemas de estría, placa y picadura, el que ha arrojado resultados más precisos y un desarrollo más abundante, ha sido el de estría.

Colonias Gigantes. En un medio de malta -- agar, a temperatura ambiente, pueden observarse al cabo de treinta días, colonias de gran desarrollo, de forma circular y superficie rugosa, más elevadas en el centro que en la periferia, y con bordes sumamente irregulares y festoneados por pseudomicelio.

Caracteres Morfológicos de las Células. En extracto de malta, se observan a los tres días, a 25°C, células bastante regulares cuyo tamaño -

va de 2 a 4 x 3 a 7 micras (figura 1), de forma oval, algunas más bien redondas, con brotes polares y subpolares, al principio aisladas, y formando cadenitas cortas un poco después; la membrana se aprecia más oscura que el protoplasma, y algo muy característico, es la presencia constante de una o dos gotas de grasa sumamente refringentes, situadas en uno o en ambos extremos de la célula; en el centro se encuentra una vacuola pequeña al principio, y que va creciendo a medida que envejece la levadura. A los 18 días, el pseudomicelio es notable, pudiendo incluso en algunos casos, llamársele micelio (aunque primitivo), con células predominantemente ovaladas, cargadas de grasa, y la vacuola central ocupando gran parte del protoplasma.

Cultivo en Lámina. Se observa un pseudomicelio muy bien desarrollado, alargado, con blastosporas más bien pequeñas, colocadas en verticilos, a veces en cadenitas.

Esporulación. No forma, aparentemente, esporas, a pesar de que se probaron varios métodos --tratando de conseguirlo. (25).

## CARACTERES BIOQUIMICOS

### 1. Fermentación

Glucosa	+	Maltosa	-
Galactosa	-	Lactosa	-
		Sacarosa	-

### 2. Asimilación de Azúcar

Glucosa	+	Maltosa	+
Galactosa	-	Lactosa	-
Sacarosa	+		

### 3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de Potasio	+	(muy débil)
Sulfato de Amonio	+	

### 4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

Se observa al cabo de seis días un -- abundante crecimiento, con formación de anillo, - velo membranoso y sedimento.

### 5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina	-	
Esculina	+	(muy débil)

6. Producción de Almidón

Negativa.

7. Producción de Esteres

Al cabo de siete días, a temperatura ambiente, se percibe claramente un olor a éster (frutas).

8. Leche Tornasolada

Sin cambio.

9. Producción de Acido

Positiva (aún cuando no muy intensa).

CLASIFICACION

Clase	Deuteromycetes o Fungi Imperfecti
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Subfamilia	Cryptococcoideae
Género	<u>Candida</u>
Especie	<u>melinii</u>

La diagnosis del género es la siguiente (Lodder & Kreger-Van Rij, 1952): células de tamaño variable, reproducción por brotes multilaterales, -

pueden encontrarse clamidosporas, y un pseudomicelio bastante bien desarrollado, pudiendo haber además verdadero micelio. Las blastosporas tienen generalmente, una posición con respecto al pseudomicelio muy específica, especialmente en algunas especies. En medio líquido hay formación de sedimento, anillo y velo, y la desasimilación que presentan es de tipo oxidativo, y en muchas especies es además, de tipo fermentativo, más o menos intenso.

Tiene muchas similitudes este género con el género Torulopsis, con la única diferencia, no válida para muchos investigadores (25), de que este último no forma pseudomicelio o micelio verdadero.

Los caracteres diferenciales de la especie C. melinii, son de tipo fermentativo: fermenta sólo glucosa, pero asimila glucosa, sacarosa y maltosa.

Las nueve cepas aisladas de esta especie (25), están conectadas de alguna forma a la madera y la que aquí se estudia, aunque aislada en la salmuera, tiene probablemente relación con la madera de roble de que están hechas las barricas que contienen las aceitunas durante el proceso de fermentación, así como otros recipientes y --

utensilios de madera usados durante el proceso de elaboración.

CANDIDA SOLANI LODDER & KREGER-VAN RIJ

La muestra original de salmuera se tomó de una barrica conteniendo aceitunas verdes variedad Misión, tamaño 210 a 230 aceitunas por kg, purificándola por medio de siembras sucesivas en malta-agar y obteniendo la cepa pura por medio del método de Lindner.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Líquido. Veinticuatro horas después, a 25°C se observa ya un ligero crecimiento con formación de una delgada película lisa que a los tres días toma un aspecto algo membranoso; se forma también un sedimento que con el tiempo, al igual que la película, toma un color amarillento primero y moreno después. A los 18 días la película se observa sumamente plegada, seca, opaca y de color amarillo moreno.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Sólido. En malta agar, a 25°C, se observa a los 18 días, una serie de colonias blanco-amarillentas de forma algo irregular, con la superficie mucosa en el centro, pero rugosa y orlada con

pseudomicelio hacia la periferia, especialmente en los bordes; en el centro se observan opacas y con la superficie ligeramente levantada, haciendo se más contorneada a medida que pasa el tiempo; - la periferia, en cambio, se observa sumamente -- translúcida y muy delgada.

Para otros medios usados, casi no se observó diferencia, excepto un mayor crecimiento en unos que en otros.

Colonias Gigantes. En malta agar, a temperatura ambiente, se obtienen, al cabo de 30 días, colonias sumamente desarrolladas de forma circular, con superficie algo papilada, opacas y levantadas en el centro, con bordes ciliados, de color amarillento y algo translúcidos.

Caracteres Morfológicos de las Células. En extracto de malta, a 25°C, se observan a las 72-horas, células de forma ovalada, algunas más --- bien cilíndricas, con un tamaño variable entre - 2 a 4 x 3 a 13 micras (figura 2), con brotes más bien polares que subpolares; la membrana se aprecia muy gruesa y obscura en contraste con el protoplasma muy brillante con una o dos vacuolas angulares; empiezan a formarse pequeñas cadenas de pseudomicelio, que a los 18 días es ya muy aparente; para este tiempo las células son princi---

palmente cilíndricas, con una o dos vacuolas ocupando gran parte del protoplasma y algunos gránulos muy refringentes.

Cultivo en Lámina. A los 7 días, a 25°C, se observa un pseudomicelio con sus filamentos no -- tan largos como los de C. melinii y con blastosporas dispuestas en cadenas y verticilos cortos. -- El cultivo se hizo en papa agar.

Esporulación. No forma esporas.

### CARACTERES BIOQUIMICOS

#### 1. Fermentación

Glucosa +

Maltosa -

Galactosa -

Lactosa -

Sacarosa +

#### 2. Asimilación de Azúcar

Glucosa +

Maltosa+

(débil)

Galactosa +

Lactosa-

Sacarosa +

#### 3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de potasio -

4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

A los seis días, a temperatura ambiente, se presenta un abundante crecimiento, con -- formación de película mucosa primero, membranosa después.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina +

Esculina +

6. Producción de Almidón

Negativa, aún cuando en algunos puntos, al añadir Lugol, el medio tomó una coloración marrón.

7. Producción de Esteres

Al cabo de siete días, a temperatura ambiente, se percibe claramente un olor característico a éster (frutas).

8. Leche Tornasolada

Sin cambio.

9. Producción de Acido

Positiva (muy débil)

## CLASIFICACION

Clase	Deuteromycetes o
	Fungi Imperfecti
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Subfamilia	Cryptococcoideae
Género	<u>Candida</u>
Especie	<u>solani</u>

Como este tipo fermenta sacarosa, además de glucosa, pero no rafinosa, y presenta también una pronta formación de película membranosa, y no asimila nitratos, se clasificó como Candida solani - (25).

Como solo se tenía referencia de una cepa -- estudiada sin mayores detalles (25), la consideraron como una nueva especie, dando el nombre de C. solani, debido a que la aislaron en harina de papa (Solanum tuberosum L.).

### CANDIDA PARAPSILOSIS (ASHF.) LANGERON ET TALICE

Monilia parapsilosis Ashf.

Mycocandida parapsilosis (Ashf.) C. W. Dodge.

Blastodendron intestinale Mattlet var. epidermicum Cif. et Alfonseca.

Blastodendrion globosum Zach (Wolfram und Zach).  
Schizoblastosporion globosum (Zach) C. W. Dodge.  
Blastodendrion gracile Zach (Wolfram und Zach).  
Schizoblastosporion gracile (Zach) C. W. Dodge.

La muestra original se tomó de una lata des-  
cubierta conteniendo aceitunas verdes variedad -  
Misión, tamaño 320 a 350 aceitunas por kg, de la  
nata formada en la superficie, y no del interior.  
Se purificó el medio con ayuda de siembras suce-  
sivas en malta agar, adicionado de ácido láctico,  
y obteniendo la cepa pura por el método Lindner.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en  
Medio Líquido. En extracto de malta, a 25°C, a-  
las 24 horas, empieza ya a observarse un ligero-  
sedimento y un anillo; a los 3 días se ha consti-  
tuido ya una película aún incompleta, a manera -  
de islotes y que ya a los 18 días se ha converti-  
do en una verdadera película de tipo más bien mu-  
coso, de color moreno, y un grueso sedimento obs-  
curo.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en  
Medio Sólido. En malta agar, a 25°C, se observa  
al cabo de 3 días, colonias de un color blanco--  
grisáceo, de aspecto mucoso, filiformes en la ba-  
se del tubo, arrosariadas al final de la estria;  
a los 18 días, el tono se hace más amarillento,-

la superficie se ve algo contorneada, brillante, translúcida, y extendida con sus bordes rodeados por pseudomicelio, apreciándose en todo el contorno unas estriaciones largas y delgadas; estructura amorfa y consistencia primero cremosa y, después, algo membranosa.

Colonias Gigantes. En malta agar, a los 30 días y a temperatura ambiente, se obtuvieron colonias de forma circular, muy desarrolladas, de estructura filamentosa y superficie algo convexa y rugosa, de color gris-amarillento y bordes rodeados primero por pseudomicelio que va desapareciendo para dar paso a una orilla dentada.

Caracteres Morfológicos de las Células. En extracto de malta, a 25°C, se observan, al cabo de 3 días, células no muy grandes, cuyo tamaño va de 1 a 3 x 2 a 7 micras (figura 3), de forma ovalada, algunas alargadas y otras más bien arredondadas, con brotes polares y subpolares, membrana gruesa y obscura y el protoplasma que se observa muy brillante, con dos pequeñas vacuolas; empieza ya a constituirse un pseudomicelio que a los 18 días está ya perfectamente constituido.

Cultivo en Lámina. A los 7 días, en papa -- agar, a 25°C, se observa un pseudomicelio perfectamente desarrollado, con blastosporas dispuestas

en cadenas bastante largas, y colocadas en vérti-  
cilos, a veces no muy claros. Se observan algu-  
nas células gigantes.

Esporulación. No se obtuvo.

## CARACTERES BIOQUIMICOS

### 1. Fermentación

Glucosa	+	Maltosa	-
Galactosa	+	Lactosa	-
Sacarosa	-	Rafinosa	-

### 2. Asimilación de Azúcares

Glucosa	+	Maltosa	+
Galactosa	+	Lactosa	-
Sacarosa	+		

### 3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de Potasio	-
Sulfato de Amonio	-

### 4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

Al cabo de seis días, a temperatura -  
ambiente se observa un crecimiento muy débil, --  
sin enturbiamiento del medio ni sedimento.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina +

Esculina -

6. Producción de Almidón

Negativa.

7. Producción de Esteres

Al destapar el matraz, después de siete días de inoculadas, a temperatura ambiente, se percibió un característico olor a éster (plátano).

8. Reacción en Leche Tornasolada

Negativa, con la particularidad de que a los 15 días se observa un ligero tono azulado.

9. Producción de Acido

Negativa.

### CLASIFICACION

Clase	Deuteromycetes o
	Fungi Imperfecti
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Subfamilia	Cryptococcideae
Género	<u>Candida</u>

Como este tipo fermenta glucosa y galactosa, asimila glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa; y, además forma un pseudomicelio de tipo ---- "Mycocandida" (delgado y muy ramificado, con verticilos cortos, con unas cuantas blastosporas formando pequeñas cadenas), se considera como C. parapsilosis.

Tres variedades fueron estudiadas por Van Rij y Verona, 1949 (25), que fueron obtenidas en frutos de Olea europaea, se coloca dentro de C. parapsilosis var. intermedia, por la propiedad -- que tiene de asimilar arbutina.

#### BRETTANOMYCES ANOMALUS CUSTERS

La muestra original se tomó de una lata des cubierta conteniendo aceitunas verdes variedad Misión, tamaño 320 a 350 aceitunas por kg en descomposición, introduciendo la pipeta hacia el fondo de la misma, se purificó por medio de resiembras continuas, obteniendo la cepa pura a partir del método de Lindner.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Líquido. En extracto de malta, a 25°C, empieza a notarse, a las 24 horas, un ligero creci-

miento, pero, es hasta los 8 días, cuando se forma una película mucosa y delgada al principio, y un sedimento moreno. A los 18 días, la película se vuelve más gruesa y algo rugosa, de color blanco-amarillento y con un desarrollo muy abundante; el sedimento aumenta al desintegrarse la película y caer al fondo en forma de flóculos; el medio se observa bastante turbio.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Sólido. En malta agar, a 25°C, empiezan a constituirse al cabo de tres días, colonias extendidas, de un color blanquecino, con bordes irregulares, que a los 18 días se ven con proyecciones irregulares a manera de cilios; la superficie, al principio lisa, empieza a arrugarse con algunas estrías muy finas que van del centro a la periferia. En el centro, la colonia tiene una elevación convexa, apareciendo en este punto opaca y de color blanco en contraste con los bordes amarillentos y muy brillantes. El cultivo por placa, en este caso, presentó un desarrollo sumamente abundante, siendo los caracteres anotados básicamente los mismos.

Colonias Gigantes. En malta agar, a los treinta días y a temperatura ambiente, se observan colonias muy desarrolladas, de forma circular, convexas, de superficie granulosa y surcada por es---

trías radiales, de un color más amarillento hacia la periferia, bordes formados por proyecciones coherentes y más brillantes que el resto de la colonia.

Caracteres Morfológicos de las Células. En extracto de malta, a 25°C, se observan a los tres días células de forma ovalada, muchas de ellas muy alargadas, constituyendo un principio de pseudomicelio, y cuyo tamaño varía entre 2.5- a 4.5 x 2.5 a 11 micras (figura 4), con brotes multilaterales, la membrana gruesa y oscura, y el protoplasma conteniendo abundantes inclusiones muy refringentes. A los 18 días se ha constituido cadenas de células sumamente largas, donde muchos de los tabiques han desaparecido, dando la impresión de un verdadero micelio.

Cultivo en Lámina. Al cabo de siete días de hecha la siembra en papa agar, se observa un micelio bastante desarrollado, constituido por una serie de células muy largas y ramificadas.

Esporulación. No se obtuvo.

## CARACTERES BIOQUIMICOS

### 1. Fermentación

Glucosa +

Maltosa -

Galactosa +	Maltosa -
Sacarosa -	Lactosa +

2. Asimilación de Azúcar

Glucosa +	Maltosa -
Galactosa +	Lactosa -
Sacarosa +	

3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de Potasio +	
Sulfato de Amonio +	(débil)

4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

Al cabo de seis días, a temperatura ambiente, se observa un crecimiento muy abundante, con formación de sedimento, y una fina película.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina +	(débil)
Esculina -	

6. Producción de Almidón

Negativa.

7. Producción de Ester

Al cabo de siete días de sembrada la -

levadura, a temperatura ambiente, se destapa el-  
matraz percibiéndose un característico olor a és  
ter (frutas).

8. Leche Tornasolada

Negativa.

9. Producción de Acido

Muy abundante.



CLASIFICACION

Clase	Deuteromycetes o
	Fungi Imperfecti
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Subfamilia	Cryptococcoideae
Género	<u>Brettanomyces</u>
Especie	<u>anomalus</u>

Se llega a este género por presentar célu--  
las con brotes, sin artrosporas, pseudomicelio --  
regularmente desarrollado.

La diagnosis del género es la siguiente ---  
(25): células ovales o redondas, algunas en for-  
ma de ojiva, otras más alargadas; reproducción -  
por brotes multilaterales que llevan a la forma-

ción de cadenas irregulares de células. Puede -- formarse un pseudomicelio más bien primitivo, con blastosporas; en medio líquido forma sedimento y a veces película. Bajo condiciones aerobias, hay una fuerte producción de ácido, que acaba por pro-- vocar la muerte de las células; ello se contra--- rresta mediante la adición al medio, de carbonato de calcio. Además de una desasimilación fermenta-- tiva, hay siempre una de tipo oxidativo.

La especie tipo es Brettanomyces bruxellen-- sis, y el género incluye en total cuatro especies.

Debido a que este tipo fermenta glucosa, ga-- lactosa y lactosa, se sitúa dentro de la especie-- B. anomalus. La primera cepa fué aislada por Cus-- ters, 1940, a partir de cerveza negra embotella-- da. Debido a que fermenta lactosa, pero no malto-- sa, característica más bien rara en una levadura-- de cerveza, la llamó B. anomalus.

#### BRETTANOMYCES LAMBICUS KUFFERATH ET VANLAER

La muestra original de salmuera se tomó de -- una lata descubierta conteniendo aceitunas verdes variedad Misión, tamaño 320 a 350 aceitunas por -- kg, en descomposición, introduciendo la pipeta -- hasta el fondo de la misma. Se purificó por me-- dio de siembras sucesivas en malta agar, adicio--

nado de ácido láctico, logrando la cepa pura a -- partir del método de Lindner.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Líquido. En extracto de malta, a 25°C, empiezan a esbozarse a los tres días de hecha la -- siembra, una delgada película mucosa y brillante, que a los 18 días se convierte en una película ru -- gosa, opaca, que posteriormente forma pequeños -- grumos, que acaban por caer al fondo del tubo, en forma de un sedimento bastante bien desarrollado, de color moreno oscuro. El enturbiamiento del -- medio persiste a lo largo de la observación.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Sólidos. En malta agar, a 25°C, se observa ya a los tres días, un abundante crecimiento con colonias extendidas, de superficie lisa, plana, -- con bordes ondulados, estructura amorfa, de un co -- lor amarillento, de consistencia mucosa y translú -- cida. A los 18 días, la superficie se observa ya rugosa, surcada por finas estrías, de color amari -- llento, brillante en el centro de la colonia, y -- los bordes más extendidos, opacos, y bordeados -- por pseudomicelio.

Colonias Gigantes. En malta agar, a los -- treinta días, a temperatura ambiente, se observan

colonias de forma circular, superficie filamentosa, pulvinada, con bordes ondulados. Son opacas, de color moreno-amarillento, y muy desarrolladas.

Caracteres Morfológicos de las Células. En extracto de malta, a 25°C, se observa al cabo de tres días, células de forma ovalada, alargadas, con un tamaño que varía entre 2.0 a 3.5 x 3.0 a 13 micras (figura 5), aisladas, y con brotes multilaterales, y el protoplasma se observa muy granuloso. A los 18 días empiezan a constituirse algunas cadenas de poca longitud, las vacuolas ocupan la mayor parte del protoplasma, y hay varios corpúsculos en el interior, sumamente refringentes.

Cultivo en Lámina. En papa agar, a los siete días, a 25°C, se observa un pseudomicelio rudimentario, representado por pequeñas agrupaciones de células alargadas, con algunas blastosporas poco desarrolladas en los extremos.

Esporulación. No se obtuvo.

## CARACTERES BIOQUIMICOS

### 1. Fermentación

Glucosa	+	Maltosa	+	(débil)
Galactosa	-	Lactosa	-	

Sacarosa +

2. Asimilación de Azúcar

Glucosa + Maltosa + (débil)

Galactosa + Lactosa -

Sacarosa +

3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de Potasio +

Sulfato de Amonio + (débil)

4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

Al cabo de seis días, a temperatura ambiente, se observa un crecimiento regular, con formación de un reducido sedimento, y una película muy delgada, que a los pocos días cae en forma de flóculos al fondo del tubo.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina -

Esculina -

6. Producción de Almidón

Negativa.

7. Producción de Ester

Al cabo de siete días de hecha la ---

siembra, se percibe al destapar el matraz, un -  
característico olor a éster (frutas).

8. Leche Tornasolada

Sin cambio.

9. Producción de Ácido

Positiva, con gran producción de áci-  
do, notable a partir de las 20 horas de hecha -  
la siembra:

CLASIFICACION

Clase	Deuteromycetes o
	Fungi Imperfecti
Orden	Cryptococcales
Familia	Cryptococcaceae
Subfamilia	Cryptococcoideae
Género	<u>Brettanomyces</u>
Especie	<u>lambicus</u>

Se incluye dentro de la especie B. lambicus,  
debido a que fermenta glucosa, sacarosa, malto-  
sa, y en medio líquido forma una película grue-  
sa, membranosa, y de aspecto seco.

La aisló por primera vez Kufferath, a par--  
tir de cerveza oscura; Custers ha aislado cua-

tro más, también a partir del sedimento formado - en cerveza (25).

Esta especie se aproxima mucho a B. bruxellensis, diferenciándose tan solo por el aspecto de las colonias en malta agar, pues mientras éstas tienen un aspecto mucoso y brillante, las de aquella se ven de aspecto seco y opaco.

PICHIA MEMBRANAEFACIENS HANSEN

Saccharomyces membranaefaciens Hansen

Saccharomyces anomalus Hansen var. belgicus Lindner

Willia belgica Lindner

Hansenula belgica (Lindner) H. et. P. Sydow

Endomyces belgica (Lindner) Zender

Pichia belgica (Lindner) Dekker (Stelling-Dekker)

Saccharomyces mycoderma punctisporus Mèlard

Pichia punctispora (Mèlard) Dekker (Stelling-Dekker)

Pichia alcoholophila Klöcker

Pichia calliphorae Klöcker

Pichia membranaefaciens Hansen var. calliphorae (Klöcker) Dekker (Stelling-Dekker)

Pichia mandshurica Saito

Zygosacharomyces chevalieri Guilliermond

Zygopichia chevalieri (Guilliermond) Klöcker

- Zygosaccharomyces bisporus Anderson
- Zygopichia chevalieri (Guilliermond) Klöcker var. andersonii (Nickerson)
- Endomyces chodati Zender
- Willia chodati (Zender) Dekker (Stelling-Dekker)
- Endomyces trumpyi Zender et Bevan Dekker (Stelling-Dekker)
- Pichia neerlandica Lodder
- Pichia alcoholophila Klöcker var. naganishii Lodder
- Pichia derossii Castelli
- Zygopichia chiantigiana Castelli
- Pichia membranaefaciens Hansen var. acidificans -  
Scrivani
- Pichia chodati (Zender) Dekker var. fermentans -  
Mrak, Phaff et Vaughn

La muestra original de salmuera se tomó de una barrica, expuesta a la intemperie, conteniendo aceitunas negras (maduras) variedad Misión, - tamaño 450 a 500 aceitunas por kg. Se purificó el cultivo por medio de siembras sucesivas en -- malta agar, lográndose la cepa pura por el método de Lindner.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Líquido. En extracto de malta, a 25°C, se observa al cabo de tres días de hecha la siembra, la aparición de un sedimento de poco grosor acom

pañado de un leve enturbiamiento del medio, y una película gruesa, bien constituida, color blanco y apariencia seca y quebradiza; a los ocho días se complementa con la formación de un anillo, translúcido y blanco grisáceo. A los 18 días el anillo se desintegra, pero la película subsiste, --- gruesa y bien formada y de un color moreno. El sedimento se nota formado por varias capas de deposición.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Sólido. En malta agar, a 25°C, se observan al cabo de tres días colonias filiformes, de superficie granular gruesa, levantadas en el centro, con bordes algo franjeados, color blanco amarillento, opacas y de consistencia algo quebradiza. A los 18 días se acentúa el color amarillento, la superficie se ve recorrida por pequeñas y delgadas estriás que van del centro a la periferia, -- sin llegar a los bordes; éstos se ven brillantes en contraste con el resto de la colonia, y franjeados por proyecciones delgadas y cortas.

Colonias Gigantes. A los treinta días de hecha la siembra en malta agar, a temperatura ambiente, se obtienen colonias circulares, de bordes enteros, filamentosas, umbonadas y de color amarillento.

Caracteres Morfológicos de las Células. En extracto de malta, se observan a los cuatro días, a temperatura de 25°C, células de forma ovalada, otras alargadas, aisladas o en grupos formando cadenas, los brotes son multilaterales, y el tamaño de la célula va de 2.5 a 5.0 x 4.5 a 14 micras (figura 6). A los 18 días se observan en el centro de la célula, vacuolas grandes ocupando gran parte del protoplasma, muy refringentes, y gránulos diversos; las ascas y ascosporas, son difíciles de observar.

Cultivo en Lámina. Se observan al cabo de siete días, en papa agar, filamentos largos constituyendo un pseudomicelio, con células alargadas y ramificadas, con blastosporas bastante grandes en los extremos de las mismas.

Esporulación. En Gorodkowa agar, a 25°C, se observa después de siete días de hecha la siembra, varias ascas conteniendo de una a cuatro ascosporas, algo hemisféricas, que se han formado después de un proceso de conjugación. Se hizo un frotis que se tiñó por el método de Kufferath y el de Shimwell, pudiendo así observarse perfectamente las esporas, ya que en estado fresco, debido a su contenido tan claro, es difícil distinguirlas. La liberación de las es-

poras se efectúa por rompimiento de la membrana del asca que las contiene.

En los otros cuatro medios empleados, se han obtenido resultados semejantes en cuanto a forma de las ascas y ascosporas, pero no en cuanto al número, ya que en éstos fueron muy pocas las ascas que pudieron observarse. En el bloque de yeso, el resultado fue negativo (figura 8).

### CARACTERES BIOQUIMICOS

#### 1. Fermentación

Glucosa	-	Maltosa	-
Galactosa	-	Lactosa	-
Sacarosa	-		

#### 2. Asimilación de Azúcar

Glucosa	+	Maltosa	-
Galactosa	-	Lactosa	-
Sacarosa	-		

#### 3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de Potasio	-
Sulfato de Amonio	-

#### 4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

Al cabo de siete días se observa un -

ligero crecimiento, empezando a esbozarse ya --  
una delgada película blanca, membranosa, y de -  
aspecto seco.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina -

Esculina -

6. Producción de Almidón

Negativa.

7. Producción de Ester

Negativa.

8. Reacción en Leche Tornasolada

Negativa.

9. Producción de Acido

Negativa.

CLASIFICACION

Clase	Ascomycetes
Subclase	Protascales
Orden	Endomycetales
Familia	Endomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetoideae

Tribu	Saccharomyceteae
Género	<u>Pichia</u>
Especie	<u>membranaefaciens</u>

La diagnosis del género es la siguiente --- (25): células de diversos tamaños, de forma ovalada, alargadas, con reproducción vegetativa por brotes multilaterales, formación de pseudomicelio; una conjugación heterógama puede o no preceder inmediatamente a la formación de ascas, esporas hemisféricas, en forma de sombrero, angulares o redondas, con una gota de grasa en el centro, y en número de 1 a 4 por asca. En medio líquido se forma una película membranosa, de aspecto seco. Metabolismo preferentemente oxidativo, sin embargo, hay casos en que puede haber también una fermentación. Sin asimilación de nitratos, ni desdoblamiento de arbutina, o bien éste muy débil (25).

Como este tipo presenta asimilación únicamente de glucosa, sin fermentación, se clasificó como P. membranaefaciens, que es precisamente la especie tipo.

Se tienen noticias (25) de 31 cepas estudiadas, aisladas a partir de diversos productos, casi todos ellos de origen vegetal, y únicamente una de origen animal.

DEBARYOMYCES KLOECKERI GUILLIERMOND ET PEJU

- Debaryomyces matruchoti Grigoraki et Peju.  
Debaryomyces hudeloi da Fonseca  
Debaryomyces kloeckeri Guilliermond et Peju var.  
hudeloi (da Fonseca) Dekker  
(Stelling Dekker)
- Debaryomyces hildegardii Ota  
? Debaryomyces laedegaardi Ota  
? Debaryomyces leopoldi Ota  
? Debaryomyces lundsgaardi Ota  
Debaryomyces fabryi Ota  
Debaryomyces gruetzii Ota  
? Debaryomyces tremoniensis Ota  
? Debaryomyces fabryi Ota var. tremoniensis (Ota)-  
C. W. Dodge
- ? Debaryomyces emphysematosus Ota  
Debaryomyces matruchoti Grigoraki et Peju var. -  
cesarii Dekker (Stelling---  
Dekker)
- Debaryomyces kloeckeri Guilliermond et Peju var.  
major Lodder
- Debaryomyces sake Saito et Ota

La muestra original de salmuera se tomó de una barrica conteniendo aceitunas negras variedad Misión, tamaño 450 a 500 aceitunas por kg. Se purificó por medio de siembras sucesivas en malta agar, y se obtuvo la cepa pura por medio

del método de Lindner.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Líquido. En extracto de malta, a 25°C, empiezan a notarse al cabo de tres días de hecho el cultivo, un ligero sedimento, sin indicio de anillo o película. Es hasta los 35 días cuando empiezan a crecer unas cuantas colonias en la superficie del medio, dando la apariencia de islotes blanquecinos muy delgados, de aspecto mucoso y muy brillantes. El crecimiento, al cabo de cuarenta días, se ha concentrado en las paredes del tubo formando un esbozo de anillo, y el medio se aprecia sumamente turbio. En ningún momento llega a formarse una verdadera película.

Caracteres Macroscópicos de los Cultivos en Medio Sólido. En malta agar, a 25°C, después de tres días de hecha la siembra, pueden notarse colonias de forma extendida, de superficie amorfa, levantada, con bordes lobulados, color amarillento, no transparentes, pero muy brillantes. A los 18 días la superficie sigue notándose amorfa, pero han aparecido algunas estrias que la cruzan transversalmente, del centro hacia los bordes; el color amarillento se ha acentuado, así como la brillantez.

Colonias Gigantes. A los treinta días, en-

malta agar, a temperatura ambiente, se obtienen colonias de gran tamaño, circulares, con bordes enteros, lisas, surcadas especialmente en el centro por algunas estrías, umbonadas y opacas a la luz, pero muy brillantes.

Caracteres Morfológicos de las Células. Al cabo de tres días de hecha la siembra, en extracto de malta y a 25°C, se observan células más bien pequeñas, en su gran mayoría aisladas, ---- otras formando pequeñas agrupaciones, casi todas de forma oval, muy pocas alargadas, con tamaño que va de 2.0 a 4.5 x 3.5 a 5.0 micras (figura 7); aún cuando se han medido algunas que sobrepasan las siete micras; los brotes son multilaterales. A los 18 días se observan células redondas muy grandes, con varios brotes laterales adheridos, y unos cuantos grupos formando pequeñísimas cadenas muy ramificadas, de modo que no se nota muy claramente el eje principal. Se llegan a observar, aún cuando muy poco claras, alguna que otra asca con una o dos ascosporas.

Cultivo en Lámina. Se observan grupos muy pequeños de células formando cadenas muy cortas y bastante ramificadas. Representan por su poco número y reducido tamaño, pseudomicelios de tipo muy primitivo.

Esporulación. Se notan varias ascosporas, teñidas por los métodos de Kufferath y Schimwell, logradas en Gorodkowa agar, al cabo de siete días de hecho el cultivo; casi todas tienen una sola espora en su interior, no muy grande, y con un glóbulo de grasa no muy refringente en el centro. Se logran observar también algunas conjugaciones, precediendo a la formación del asca; la pared de las ascosporas se nota muy gruesa y oscura. En los otros medios empleados, no se obtuvo éxito en la obtención de ascas, a excepción hecha quizá del de Fowell, donde lograron observarse tan sólo tres ascas en toda la preparación (figura 9).

## CARACTERES BIOQUIMICOS

### 1. Fermentación

Glucosa	-	Maltosa	-
Galactosa	-	Lactosa	-
Sacarosa	-		

### 2. Asimilación de Azúcares

Glucosa	+	Maltosa	+
Galactosa	+	Lactosa	+
Sacarosa	+		

### 3. Asimilación de Nitratos

Nitrato de Potasio -

Sulfato de Amonio -

4. Etanol como Unica Fuente de Carbono

Un crecimiento muy débil, con formación a los cuarenta días de un delgado anillo.

5. Desdoblamiento de Arbutina y Esculina

Arbutina -

Esculina + (débil)

6. Producción de Almidón

Al agregar solución de Lugol al medio, hubo una coloración rojiza, pero no se consideró como prueba de presencia de almidón.

7. Producción de Ester

Al destapar el matraz conteniendo el medio prueba, se aprecia al cabo de siete días, un leve olor a plátano por la formación de acetato etílico.

8. Reacción en Leche Tornasolada

Sin cambio.

9. Producción de ácido

Negativa.

## CLASIFICACION

Clase	Ascomycetes
Subclase	Protascales
Orden	Endomycetales
Familia	Endomycetaceae
Subfamilia	Saccharomycetoideae
Tribu	Saccharomyceteae

La diagnosis del género es la siguiente ---  
(25): células de forma ovalada o redondas, rara -  
vez alargadas, reproducción vegetativa por medio-  
de brotes multilaterales, excepcionalmente con --  
pseudomicelio bien desarrollado, más comúnmente -  
sin él. Las células vegetativas son generalmente  
haploides, generalmente con conjugación heteróga-  
ma precediendo a la formación de las ascas; la cé-  
lula puede conjugarse con su propio brote, pudien-  
do encontrarse, además, una conjugación isógama,-  
o bien puede no haber conjugación precediendo a -  
la formación de las ascas; las esporas son redon-  
das, en número de 1 a 2, excepcionalmente 4, por-  
asca, con una gota de grasa en el centro, y con -  
paredes a veces algo rugosas. A menudo sin forma-  
ción de película y sin fermentación, o si la hay,  
muy débil.

Este tipo se incluyó dentro de la especie -  
D. kloeckeri, por no formar película sino hasta -

después de mucho tiempo, no asimilar lactosa, no formar pseudomicelio y presentar sólo una o dos esporas. De las 17 cepas estudiadas dentro de la especie, sólo cuatro han sido reportadas como de origen vegetal (25).

### F E R M E N T A C I O N

LEVADURAS	GLU- COSA	GALAC TOSA	LACTO SA	MALTO SA	SACARO SA
<u>Candida melinii</u>	+	-	-	-	-
<u>Candida solani</u>	+	-	-	-	+
<u>Candida</u>					
<u>parapsilosis</u>	+	(débil)	-	-	-
<u>Brettanomyces</u>					
<u>lambicus</u>	+	-	-	+	+
				(débil)	
<u>Brettanomyces</u>					
<u>anomalus</u>	+	+	+	-	-
<u>Pichia</u>					
<u>membranaefaciens</u>	-	-	-	-	-
<u>Debaryomyces</u>					
<u>kloeckeri</u>	-	-	-	-	-

CUADRO N°. I

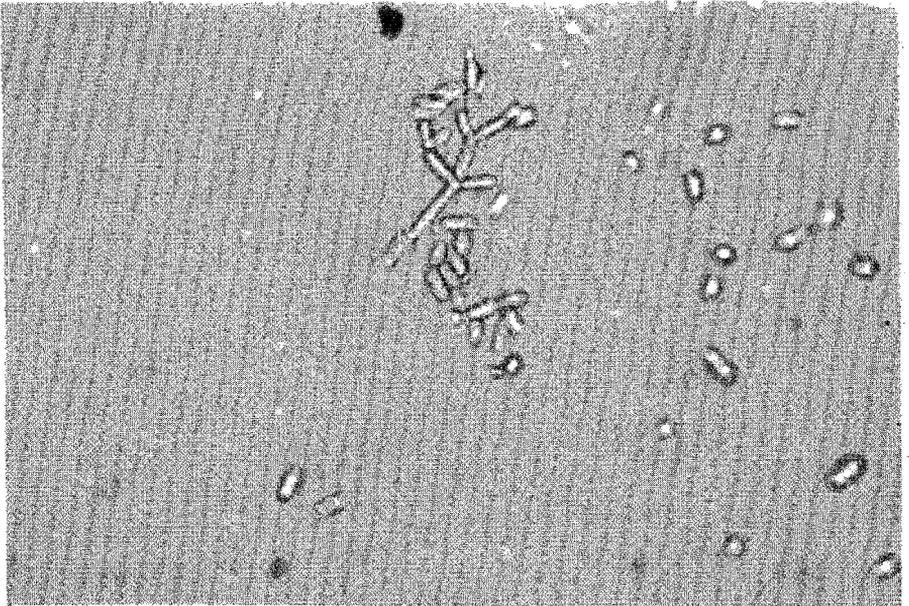


FIGURA 1. Candida melinii

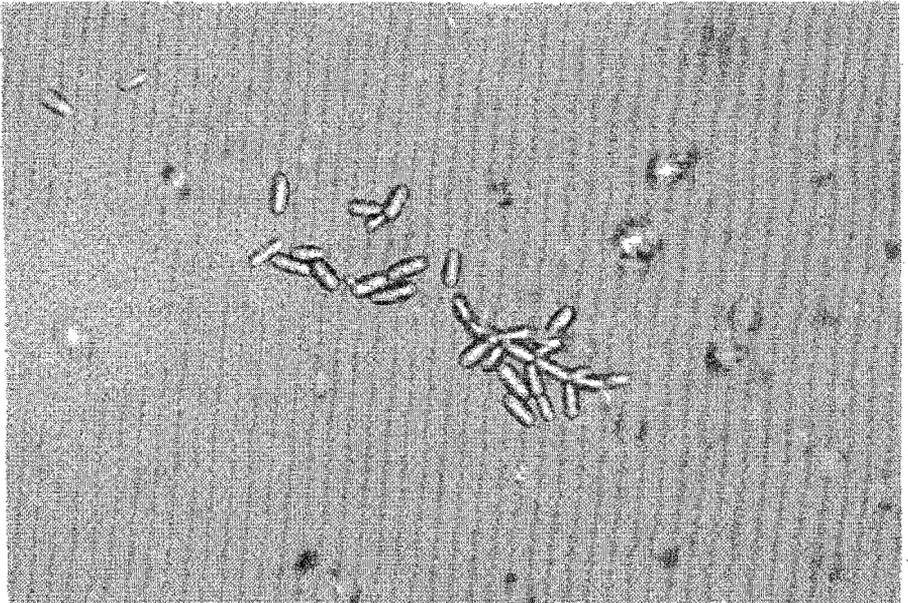


FIGURA 2. Candida solani

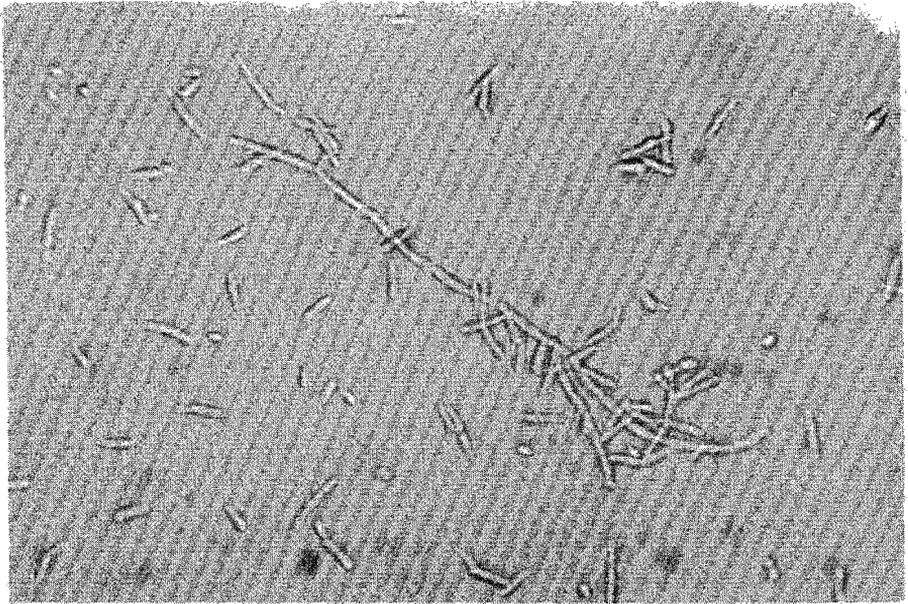


FIGURA 3. Candida parapsilosis

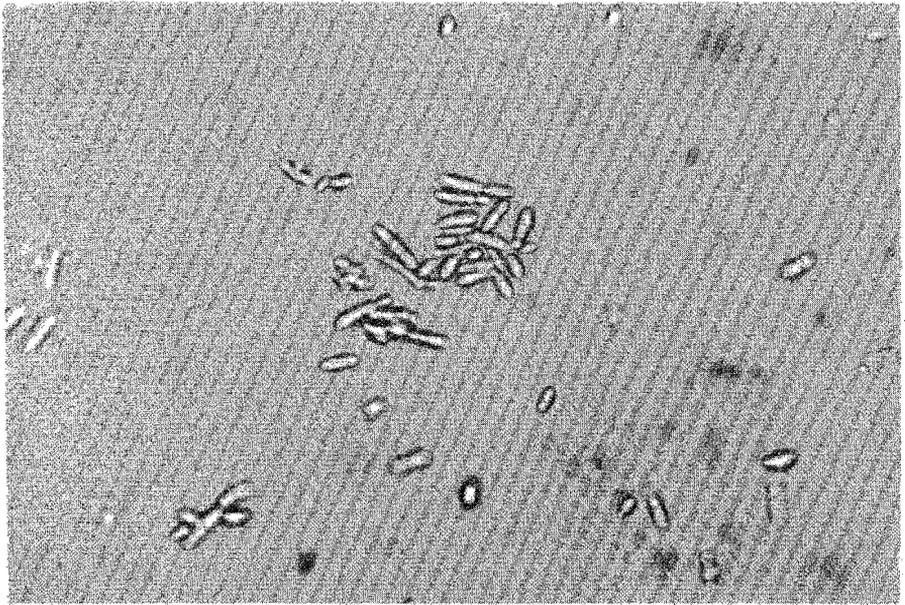


FIGURA 4. Brettanomyces anomalus

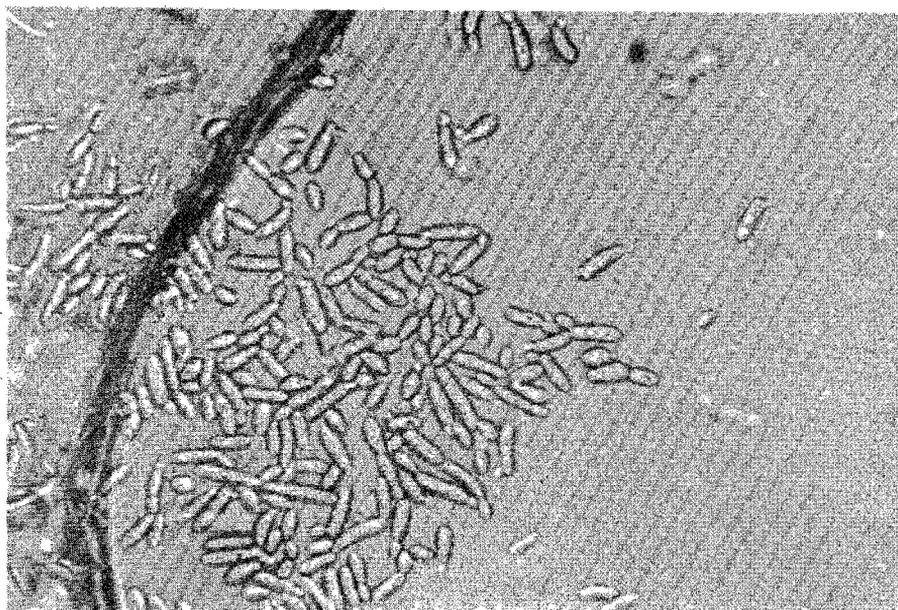


FIGURA 5. Brettanomyces lambicus

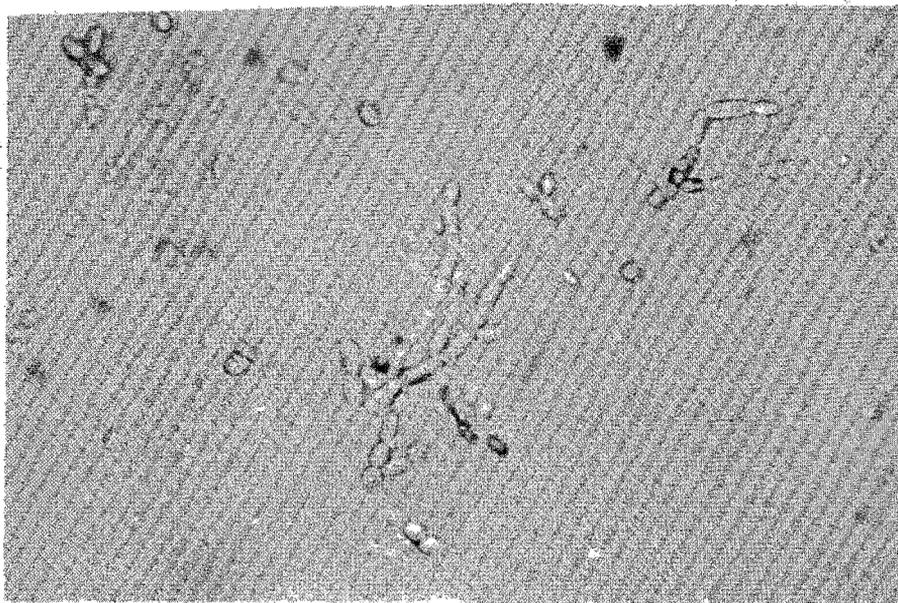


FIGURA 6. Pichia membranaefaciens

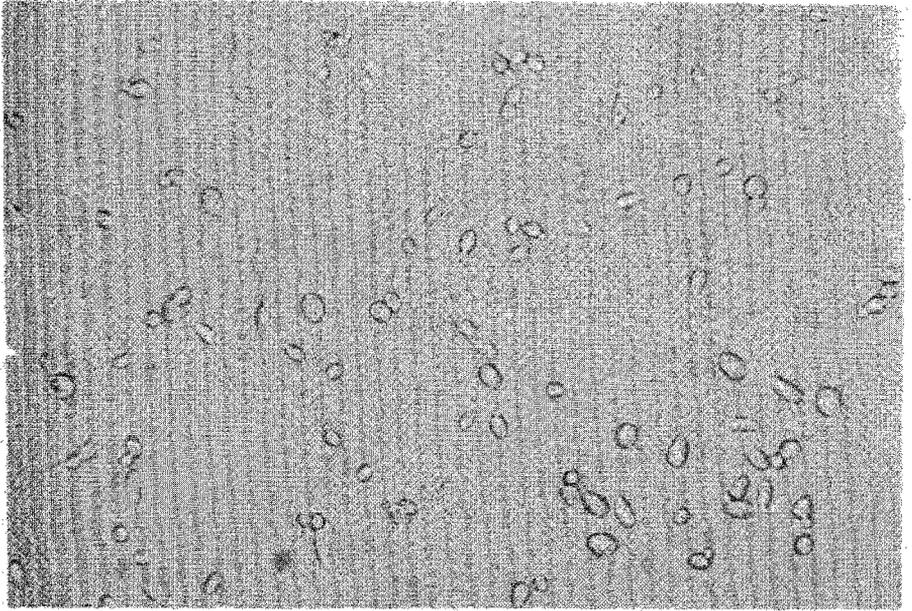


FIGURA 7. Debaryomyces hansenii

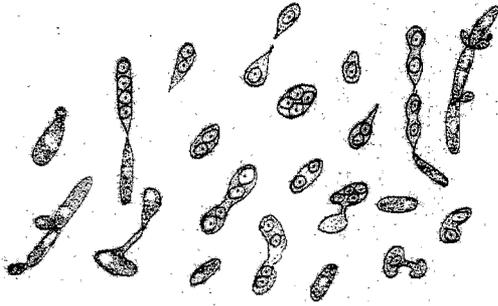
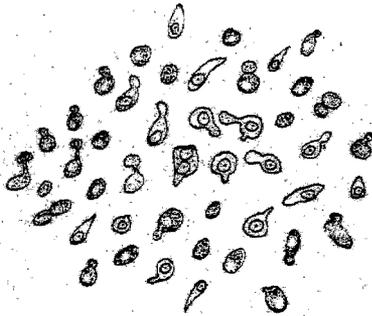


Fig. 8.- Formación de ascas en Pichia membranaefaciens  
(1000 X)

Fig. 9.- Formación de ascas en Debarymyces kloëckeri  
(1000 X)



## ASIMILACIÓN DE ACIDO LACTICO

Las levaduras que se desarrollan en las barricas conteniendo las aceitunas en salmuera, -- utilizan, aparentemente, el ácido producido en -- la fermentación por diversas bacterias, perjudicando con ello el sabor y las propiedades de conservación de aquellas.

Teniendo en cuenta esto, y queriendo saber si las levaduras por nosotros aisladas realmente modifican el pH y el grado de acidez, se ha hecho una prueba en donde se ha cuantificado el -- ácido láctico asimilado, y se han seguido los -- cambios consecuentes en la acidez del medio.

Para ello, se han preparado dos medios: extracto de levadura al 8%, adicionado de ácido -- láctico al 1%, y la salmuera misma de las aceitunas, filtrada y esterilizada. Con el primero de ellos se han llenado seis matraces de 1000 ml, y con el segundo, tubos con campana de fermenta---ción.

A partir de las 48 horas de haberse inoculado, se empezó a tomar diariamente el pH tanto en tubos como en matraces, y el grado de acidez cada tercer día en estos últimos.

Para tomar el pH se ha empleado un papel -- "Merck" para pH con una escala de 2.5 a 4.5, de -- 4.5 a 6.5 y de 6.5 a 8.5. Para saber el grado de acidez se prepara una solución de hidróxido de sodio al 4%, valorándola a continuación.

Para valorar la solución de NaOH, se parte de una solución normal de ácido clorhídrico:

Volumen de HCl = 5 ml  
Normalidad = 1N  
Volumen de NaOH = 49.1 ml

$$N_{\text{NaOH}} = \frac{\text{ml HCl} \times N_{\text{HCl}}}{\text{ml NaOH}} = \frac{5 \times 1}{49.1} = 0.1018$$

Ya que se determinó la normalidad del hidróxido de sodio, la cantidad de ácido láctico = L, se obtiene de la siguiente manera:

Lg = gramos de ácido láctico en 100 ml de muestra de la solución.

$$Lg = \frac{\text{ml NaOH} \times N_{\text{NaOH}} \times \text{eq. ac. láctico}}{5 \text{ ml muestra}} = \frac{0.090 \times \dots}{5}$$

$$\text{Lg} = \frac{\text{Vol. NaOH} \times 0.1018 \times 0.09 \times \frac{100}{5}}{0.183 \times \text{ml NaOH}} =$$

(en 100 ml)

Y ya para obtener la cantidad total de ácido láctico presente en la muestra, se tiene que hacer la siguiente relación, teniendo en cuenta los volúmenes originales en cada caso:

$$\text{Ac. láctico total en muestra} = \text{Lg} \times \frac{\text{Vol. muestra}}{100} = a$$

b = ac. láctico total que queda en la muestra después de usar los cinco ml necesarios para el análisis.

Entonces el peso del ácido láctico en gramos es = a x b.

Finalmente, para obtener el total de ácido láctico asimilado en gramos por las levaduras, tenemos que, total de ácido láctico asimilado, c, es igual:

$$c = b - a \text{ del día siguiente}$$

Donde:

a = total de ácido láctico en muestra inicial en gramos.

b = total de gramos de ácido láctico en vol. rema-

nente.

c = gramos totales de ácido láctico asimilados.

Todos los resultados estan consignados en -  
tablas y gráficas, para facilitar su comprensión.

Por ellas se podrá ver que el pH en algunos casos ha llegado hasta 7.9, pasando de un estado - totalmente ácido de 2.8, a otro totalmente alcali- no, por lo que se puede suponer que ha habido algu- nas reacciones de tipo secundario con formación de fosfatos y amoníaco, de aquí se siguió entonces -- con una serie de pruebas para poner de manifiesto- su presencia.

D I A S

8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
5.0	5.0	5.0	5.1	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.8	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.6	6.6	6.6	6.6	6.7	6.7	6.8	6.8	6.9
4.9	5.0	5.1	5.2	5.3	5.4	5.6	5.8	6.0	6.3	6.4	6.5	6.6	6.6	6.6	6.6	6.7	6.8	6.8	6.9	7.0	7.0	7.0	7.0
4.7	4.7	4.8	4.9	5.0	5.0	5.1	5.3	5.4	5.5	5.7	5.8	5.9	6.0	6.0	6.0	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.7	6.7
4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.9	4.9	4.9	4.9
4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.9	4.9	5.0	5.1	5.2	5.2	5.3	5.4	5.5	5.5	5.0
4.9	5.0	5.2	5.3	5.5	5.7	5.9	6.0	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	7.0	7.2	7.3	7.4	7.6	7.8	7.9	7.9
4.6	4.6	4.6	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.9	4.9	4.9	4.9	5.0	5.0	5.0

CUADRO N°. II - VARIACION DE pH EN SALMUERA

7	8	9	9	10	11	13	12	13	14	15	16	17	17	18	19	20	21	21	22	23	24	25	25	26	27	28	29	29
Ph	Ph	Ph	ac	Ph	Ph	Ph	ac	Ph	Ph	Ph	Ph	ac	Ph	Ph	Ph	Ph	Ph	ac	Ph	Ph	Ph	Ph	ac	Ph	Ph	Ph	Ph	ac
4.7	4.8	5.4	0.09	5.5	5.6	5.7	0.05	5.8	5.9	6.0	6.2	0.05	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	0.01	6.8	7.0	7.1	7.5	0.00	7.8	7.9	8.0	8.1	0.00
4.1	4.5	5.0	0.10	5.1	5.2	5.3	0.07	5.5	5.7	5.9	6.0	0.05	6.1	6.2	6.3	6.4	6.6	0.03	6.8	7.0	7.2	7.3	0.00	7.4	7.6	7.8	8.0	0.00
4.4	3.4	3.5	0.74	3.6	3.7	3.8	0.25	4.1	4.2	4.4	4.6	0.12	4.9	5.3	5.4	5.5	5.6	0.09	5.7	5.8	5.9	6.0	0.03	6.2	6.3	6.5	6.7	0.00
4.5	3.6	3.7	0.62	3.8	3.8	3.9	0.36	4.0	4.0	4.1	4.2	0.29	4.3	4.3	4.3	4.3	4.4	0.18	4.4	4.4	4.4	4.4	0.18	4.4	4.4	4.4	4.4	1.18
4.8	3.9	4.0	0.38	4.1	4.2	4.4	0.25	4.6	4.8	5.0	5.2	0.10	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	0.07	5.9	6.0	6.1	6.2	0.05	6.4	6.5	6.6	6.6	1.02
4.6	3.8	4.0	0.24	4.2	4.4	4.6	0.07	4.9	5.1	5.3	5.6	0.05	5.8	6.0	6.1	6.2	6.3	0.02	6.4	6.7	6.9	7.0	0.00	7.4	7.6	7.8	8.0	0.00
4.2	3.2	3.2	0.83	3.3	3.3	3.3	0.83	3.3	3.3	3.3	3.3	0.83	3.3	3.3	3.3	3.3	3.4	0.80	3.4	3.4	3.4	3.4	0.80	3.4	3.4	3.4	3.4	0.80

CUADRO III - VARIACION DE pH Y ACIDEZ EN EXTRACTO DE LEVADURA

Candida melinii (+)

DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	0.84	0.84	0.00
3	0.62	0.58	0.22
6	0.15	0.16	0.43
9	0.08	0.07	0.08
12	0.04	0.03	0.03
17	0.02	0.01	0.01
21	0.00	0.00	0.00
25	0.00	0.00	0.00
29	0.00	0.00	0.00
		TOTAL	0.78 g

CUADRO N°. IV

(+) Cuadros de concentración de los datos para -  
conocer la asimilación total de ácido lácti-  
co por las diferentes levaduras.

Candida solani

DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	2.2	2.2	0.00
3	1.9	1.8	0.30
6	1.5	1.4	0.30
9	1.0	1.0	0.40
12	0.62	0.59	0.38
17	0.29	0.25	0.30
21	0.21	0.20	0.04
25	0.11	0.10	0.09
29	0.06	0.05	0.04
		TOTAL	1.85 g

CUADRO N°. V

Candida parapsilosis

DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	1.26	1.26	0.00
3	1.26	1.20	0.00
6	1.20	1.15	0.00
9	1.03	0.98	0.12
12	0.33	0.31	0.65
17	0.15	0.14	0.16
21	0.11	0.10	0.03
25	0.06	0.05	0.04
29	0.05	0.04	0.00
		TOTAL	1.00 g

CUADRO N°. VI

Brettanomyces anomalus

DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	1.34	1.34	0.00
3	1.31	1.25	0.05
6	0.93	0.89	0.22
9	0.57	0.54	0.32
12	0.36	0.35	0.18
17	0.14	0.13	0.21
21	0.09	0.08	0.04
25	0.06	0.05	0.02
29	0.02	0.00	0.03
		TOTAL	1.15 g

CUADRO N°. VII

Brettanomyces lambicus

DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	1.62	1.68	0.00
3	1.64	1.57	0.04
6	1.26	1.20	0.31
9	1.17	1.12	0.03
12	0.66	0.63	0.46
17	0.52	0.49	0.11
21	0.31	0.29	0.18
25	0.30	0.28	0.00
29	0.29	0.27	0.00
		TOTAL	1.13 g

CUADRO N°. VIII

Pichia membranaefaciens

DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	1.26	1.26	0.00
3	1.10	1.05	0.16
6	0.61	0.58	0.44
9	0.83	0.31	0.25
12	0.09	0.08	0.22
17	0.07	0.06	0.01
21	0.03	0.02	0.03
25	0.02	0.00	0.02
29	0.02	0.00	0.00
		TOTAL	1.13 g

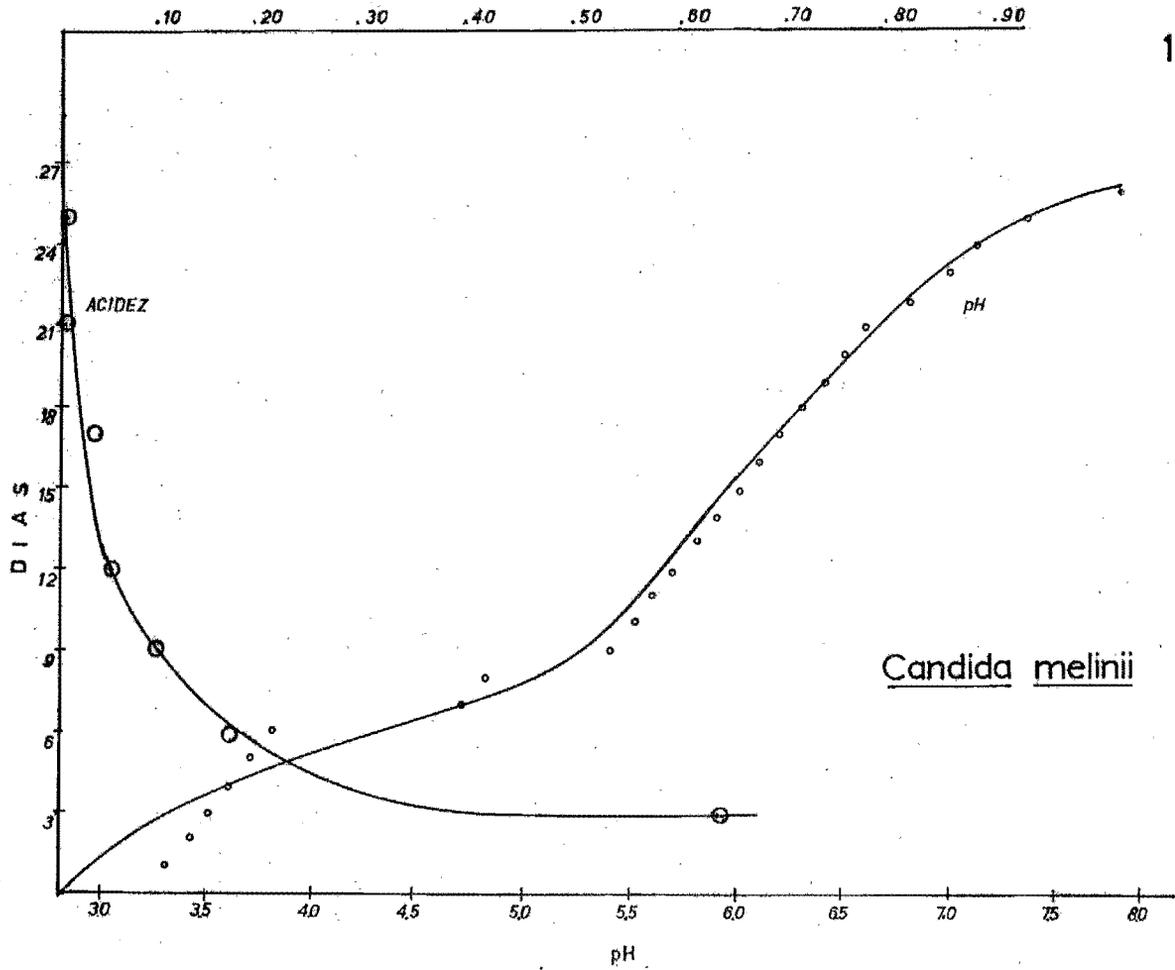
CUADRO N° IX

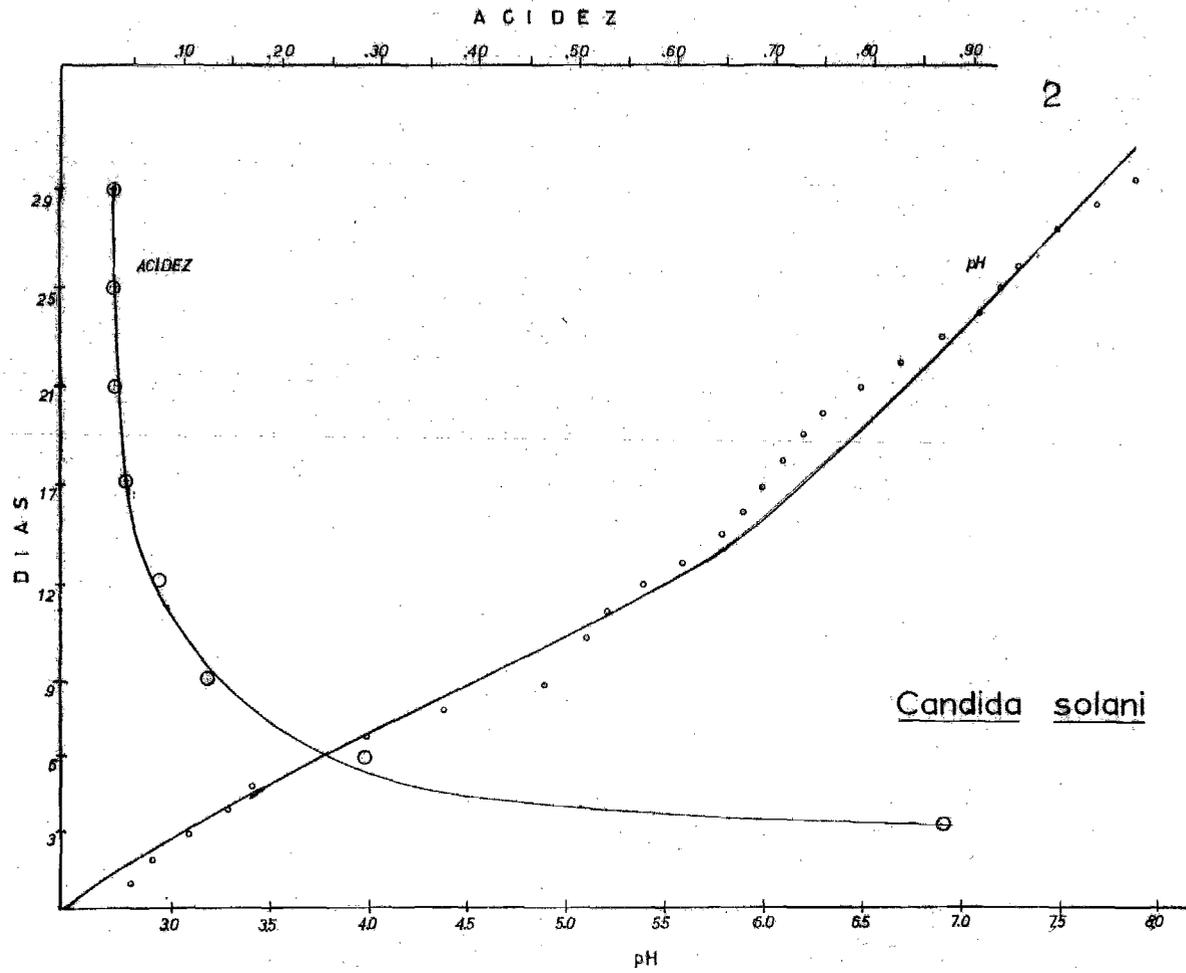
Debaryomyces hloeckeri

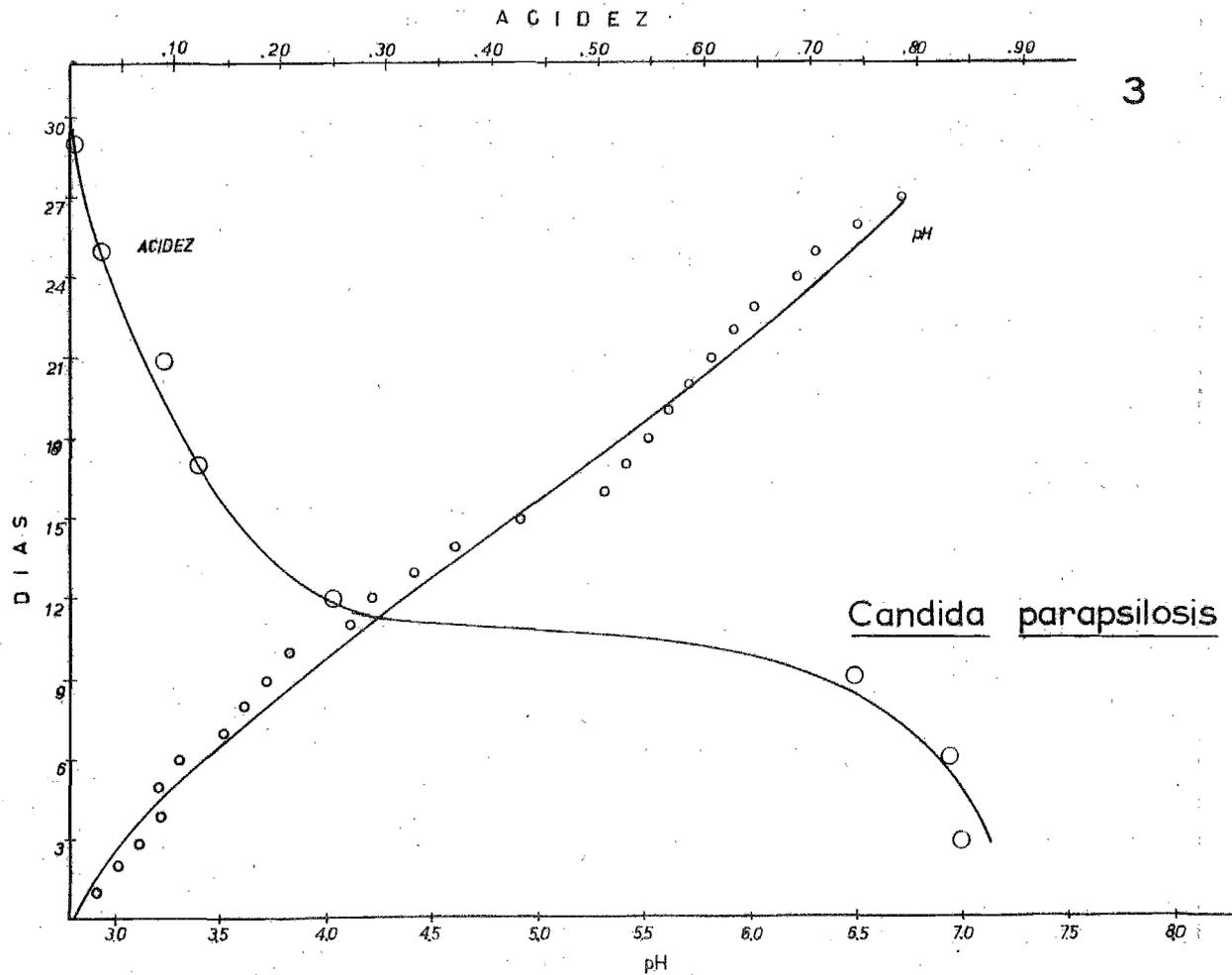
DIAS	CANTIDAD DE ACIDO LACTICO POR MUESTRA EN GRAMOS	GRAMOS DE ACIDO LACTICO EN MUESTRA REMANENTE	GRAMOS TOTALES DE ACIDO LACTICO ASIMILADOS
0	1.26	1.26	0.00
3	1.25	1.20	0.01
6	1.20	1.15	0.00
9	1.16	1.11	0.00
12	1.12	1.07	0.00
17	1.04	0.99	0.03
21	1.00	0.96	0.00
25	0.96	0.92	0.00
29	0.92	0.87	0.00
		TOTAL	0.04 g

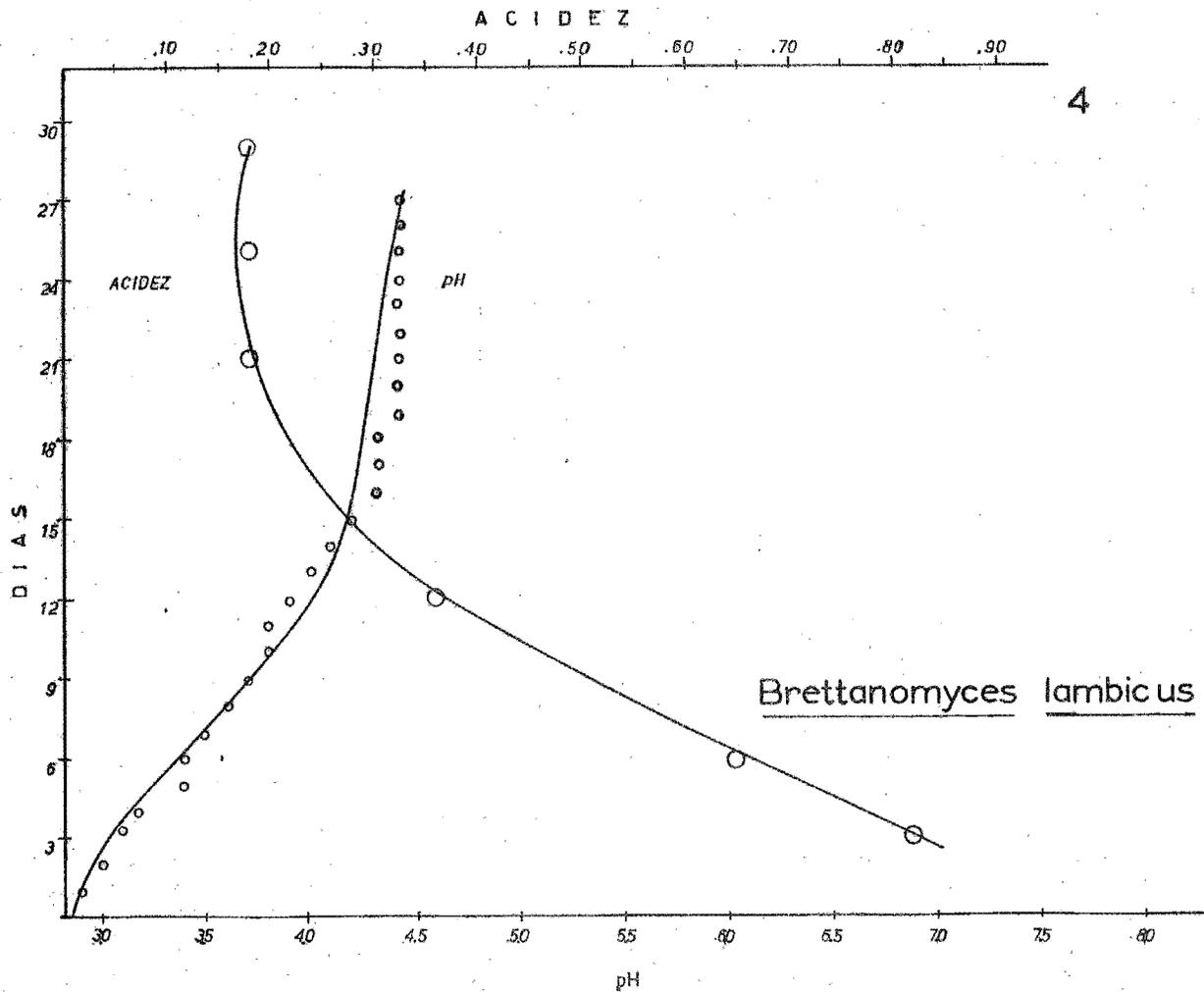
CUADRO N°. X

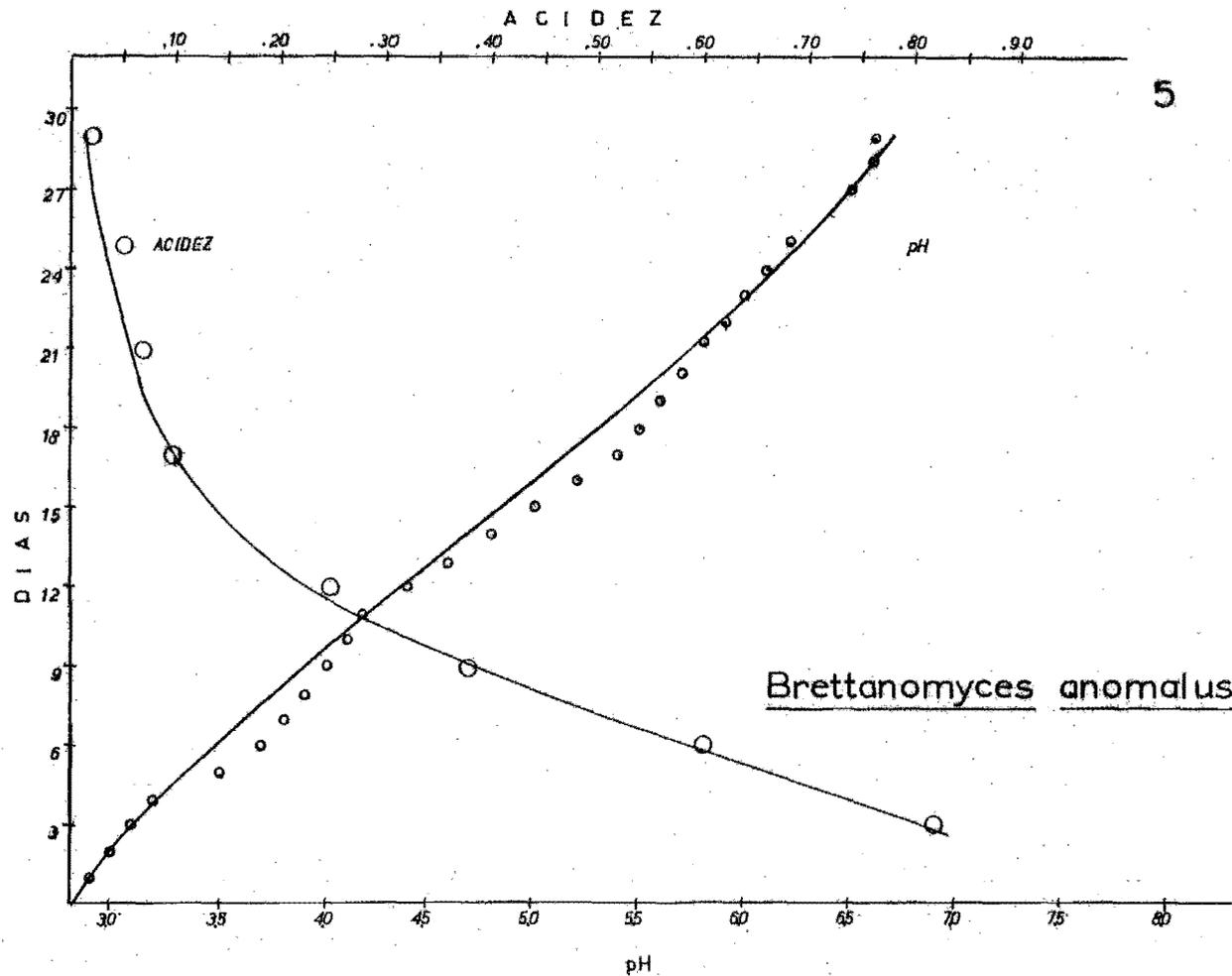
A C I D E Z

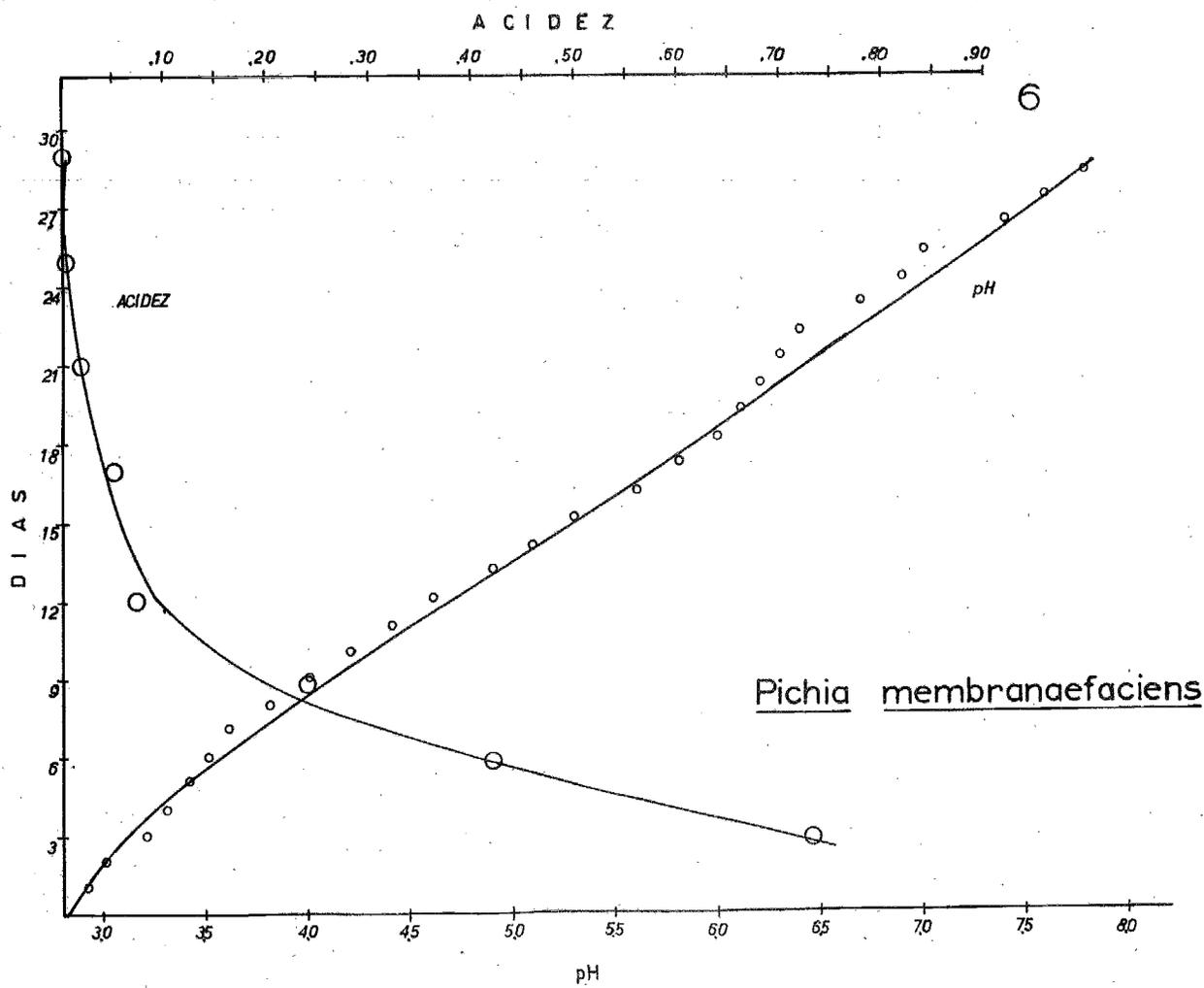


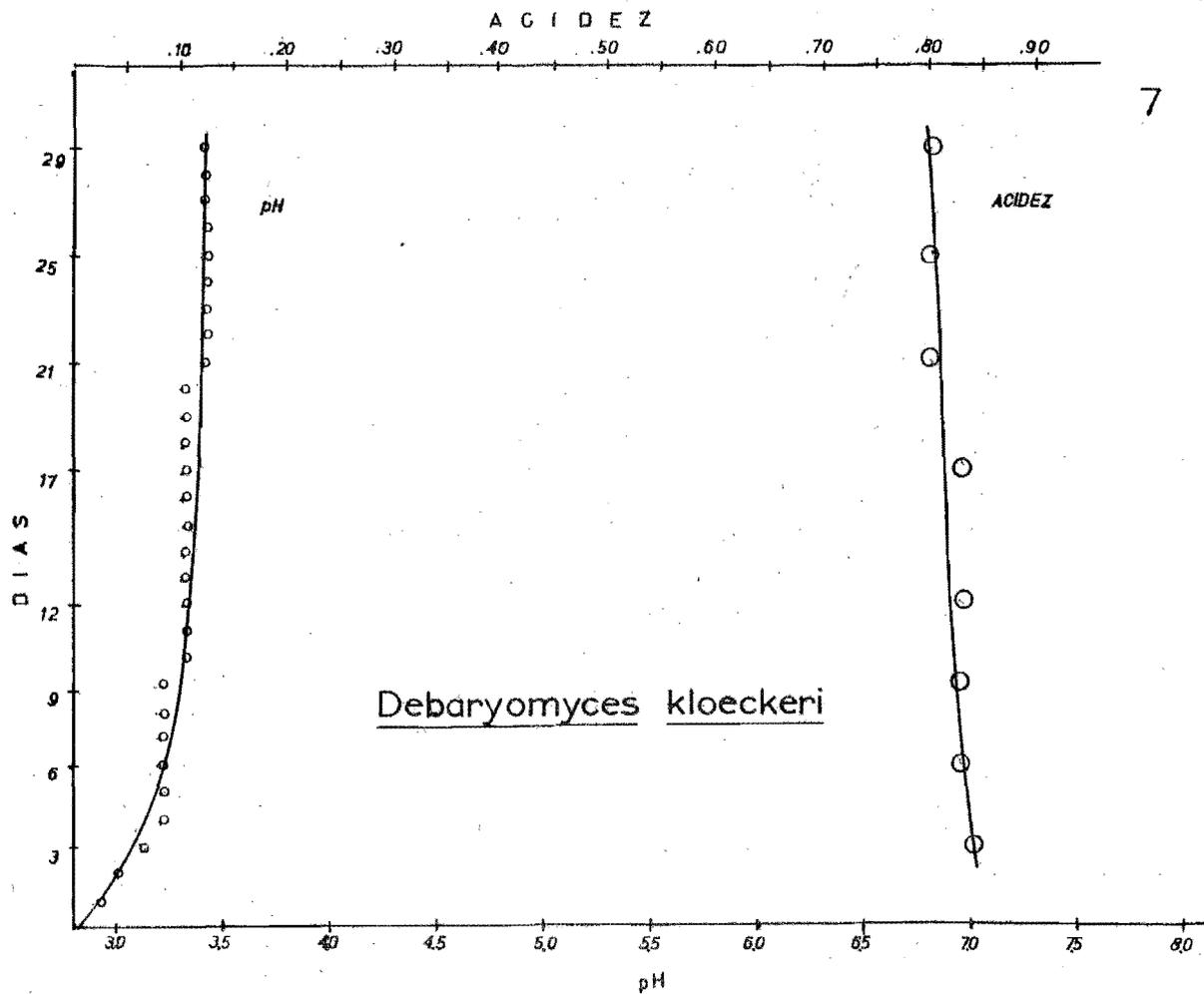












## IDENTIFICACION DE ALCOHOL, FOSFATOS Y AMONIACO

Con los volúmenes finales de la prueba de asimilación de ácido láctico, se procede a una destilación para obtener dos porciones separadas en distintas matraces, la destilada y el residuo. Tanto durante la fermentación en los matraces, como en el destilado, se percibió un claro olor a alcohol, lo que hace suponer su presencia, si bien se ha evaporado casi totalmente durante el proceso mencionado de destilación; además, como se trata de levaduras no cultivadas, la producción de alcohol no es muy fuerte, lo que explicaría también la poca cantidad de alcohol encontrada.

### Identificación de Alcohol

1) Siguiendo el método de Pellerin (44, 5), a 10 ml de destilado, se le agregaron dos gotas de una solución al 1% de bicromato de potasio, y cuatro gotas de ácido sulfúrico concentrado. Al entrar en ebullición, se formó un color verde, debido a la presencia de etanol, percibiéndose un olor a acetaldehído. Sólo en un caso, el resultado fue negativo.

### Identificación de Fosfatos

Se realizó la siguiente prueba (6, 38) con molibdato de amonio y benzidina: una gota de la solución a probar se coloca en papel filtro cuantitativo, seguida de una gota de molibdato y una gota de solución de benzidina; el papel se coloca entonces sobre amoníaco, y en caso de haber un resultado positivo, aparece una coloración azul, dependiendo su intensidad del contenido de fosfato.

Reactivos: solución de molibdato de amonio: 5 g de la sal en 100 ml de agua fría, mezclado con 35 ml de ácido nítrico.

Solución de benzidina: 0.05 g de su base ocloruro, se disuelven en 10 ml de ácido acético concentrado, y se aforan con agua hasta 100 ml.

Solución saturada de acetato sódico.

Amoníaco.

Se han obtenido con esta prueba resultados precisos, haciendo primeramente la comprobación-- mediante la gota prueba para verificar que no hay resultado positivo (coloración azul) en ausencia de fosfato, o bien, que en presencia de éste no aparezca la coloración por mal estado de los reactivos. Los resultados se consignan en la tabla No. XI.

Identificación de Amoníaco. Ello se hizo según la reacción de Nessler (6, 38, 2): una gota de la solución a probar se mezcló con una gota de hidróxido alcalino concentrado en un vidrio de reloj. Una gota de la suspensión colorante se colocó sobre papel filtro, mediante un tubo capilar, y se trató con una gota de la solución de Nessler; en caso de haber amoníaco, aparece una coloración amarilla o anaranjada rojiza. La prueba se realizó ante un testigo, y los resultados se consignan en la tabla N°. XI.

LEVADURA	ALCOHOL	FOSFATO	AMONIACO
<u>CANDIDA MELINII</u>	+	+	+ (débil)
<u>CANDIDA SOLANI</u>	+	+	+ (muy débil)
<u>CANDIDA PARAPSILOSIS</u>	+	+	+
<u>BRETTANOMYCES LAMBICUS</u>	+	+	+
	(débil)	(débil)	(muy débil)
<u>BRETTANOMYCES ANOMALUS</u>	+	+	+
		(débil)	(débil)
<u>PICHIA MEMBRANAEFACIENS</u>	+	+	+
		(débil)	
<u>DEBARYOMYCES KLOECKERI</u>	-	-	-

CUADRO N°. XI

D I S C U S I O N

En este trabajo se ha procedido primeramente a un aislamiento de levaduras que se encontraban formando una gruesa película rugosa sobre la superficie de la salmuera de fermentación de aceitunas, así como otras que se encontraron en una lata descubierta en donde se iniciaba un proceso de descomposición.

Se aislaron treinta cepas, aparentemente distintas, pero con una frecuencia mayor de los géneros Candida, Pichia y Debaryomyces, encontradas en los barriles en una etapa primaria de contaminación, y el género Brettanomyces, en un estado ya más avanzado de la misma en la lata mencionada.

Debido a esta predominancia, y teniendo en cuenta también el carácter de la fermentación, se han elegido las levaduras mencionadas para someterlas a un estudio completo.

El resto de las cepas aisladas se ha guardado para un posible estudio posterior, por presentar algunas de ellas bastante interés, sobre todo

desde el punto de vista taxonómico, pero se considera difícil abarcar en un estudio como éste -- tantas especies distintas a la vez. Entre éstas se tenía por ejemplo, una que por su forma triangular podría considerarse como Trigonopsis, y -- ello sería interesante puesto que en México no -- se ha aislado ninguna especie de este género.

En la prueba de fermentación, proceso éste -- de gran importancia industrial, se ha encontrado que dos de las cepas elegidas, Pichia y Debaryomyces), son no fermentativas, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. A partir de este punto, se ha seguido un estudio intensivo de ellas, con base a los métodos y claves dados por Lodder y Kreger-Van Rij (25), para lograr clasificarlas a nivel específico.

Se prestó un especial cuidado a la forma --- ción de película, ya que comercialmente causa -- gran perjuicio al desarrollarse sobre los fras -- cos ya envasados de aceitunas, haciendo pensar -- al consumidor que éstas se encuentran en mal estado. Se encontró que todas, excepto Debaryomyces, forman gruesas películas rugosas.

Una vez lograda su clasificación, se consultaron diversas obras sobre el tema, con el objeto de encontrar referencias sobre las levaduras --

por nosotros identificadas, hayándose mencionadas ya en la salmuera de las aceitunas: Candida -----  
krusei, C. teniens, C. solani, C. mycoderma, C. -  
rugosa, C. parapsilosis, Torulopsis sphaerica, --  
T.holmii, Hansenula subpelliculosa y Pichia -----  
membranaefaciens.

Ello coincide con nuestras observaciones hechas sobre la abundancia de las levaduras del género Candida, aún cuando no se encontró mención alguna sobre C. melinii.

Pichia es bastante común en este tipo de procesos, no así Debaryomyces, de la cual no se ha encontrado referencia alguna sobre su presencia en las aceitunas, aunque sí, pero de distinta especie, en la industria afín de pepinillos.

Podríamos decir que estos tipos mencionados constituyen una etapa primaria de contaminación, y que al reducirse la cantidad necesaria de ácido láctico, viene una segunda etapa, con Brettanomyces como dominante. En este estado ya más avanzado, las levaduras juegan un papel muy importante, pues al asimilar en mayor cantidad aún el ácido láctico, favorecen la aparición de bacterias de tipo proteolítico, como Clostridium, que en un estado ya final de contaminación, dañan por completo el producto.

No se han encontrado referencias sobre Brettanomyces lambicus ni B. anomalus en las aceitunas, sólo en pepinillos, pero aisladas del fondo del líquido, lo que coincide con las encontradas por nosotros que se aislaron del fondo mismo de la lata.

Teniendo un interés especial en obtener un resultado de tipo práctico sobre asimilación de ácido láctico por las levaduras, se ha procedido a una prueba para determinarlo cuantitativamente, sabiendo así qué levaduras pueden considerarse inocuas en el proceso que nos ocupa, y cuáles por el contrario son perjudiciales a él.

Como puede verse por los resultados consignados en los cuadros y gráficas, Candida y Pichia son los géneros que tienen una curva de asimilación más pronunciada (cuadros IV, V, VI, IX y gráficas 1, 2, 3, y 6).

En el caso de Brettanomyces, y en particular, B. lambicus, la curva de acidez es menos pronunciada, debido probablemente a que ellas son a su vez productoras de ácido (cuadros VII y VIII y gráficas 4 y 5).

En cuanto al género Debaryomyces, no hay en absoluto asimilación de ácido láctico (cuadro X,

gráfica 7).

En las curvas de pH (cuadro II y gráficas 1- a 7) se puede observar que llega un momento en -- que éste se estaciona en un punto determinado du-- rante varios días, o indefinidamente (gráfica 7); ello se explica por la formación de una solución-- reguladora, rompiéndose este equilibrio tan solo-- al formarse sustancias como los fosfatos y amo-- niaco que alcalinizan el medio, permitiendo que -- el pH suba en algunos casos hasta 8.0 inclusive.-- (Cuadro II).

Es evidente que las levaduras se encuentran-- ampliamente distribuidas en el proceso de fermen-- tación y tratado con salmuera de las aceitunas, -- bajo la forma de sedimentos o gruesas películas -- que se forman cuando las barricas tienen alguna -- abertura o no están bien llenas. Su presencia en estos procesos mencionados afecta la calidad y -- conservación de las aceitunas, y si el ácido pro-- ducido por diversas especies de Lactobacillus no-- se mantiene a un nivel constante, se ven afecta-- das las cualidades organolépticas de sabor, co--- lor, consistencia y conservación del producto.

## C O N C L U S I O N E S

1. Se aislaron para su estudio aquellas levaduras que tuvieron un promedio de frecuencia de aparición mayor, resultando ser de los géneros -- Cándida, Pichia, Brettanomyces y Debaryomyces, -- respectivamente.

2. De las especies Candida melinii, Brettanomyces lambicus, Brettanomyces anomalus, y Debaryomyces kloeckeri no se encontraron referencias de haber sido reportadas anteriormente en aceitunas, aunque sí, en la industria de los pepinillos.

3. Estas levaduras se encuentran presentes en el proceso de fermentación de las aceitunas, tomando para ellas el ácido producido durante la misma por diversas especies de Lactobacillus, transformando consecuentemente el pH óptimo para el proceso de 2.5 a 4.0, a uno totalmente alcalino de 8.0, con reacciones secundarias productoras de fosfatos y amoníaco.

4. Las levaduras del género Candida, en especial C. solani, y las de los géneros Pichia y -

Brettanomyces resultaron ser las que tienen un total de gramos de ácido láctico asimilados mayor, - en el experimento para cuantificarlo.

5. Se pone de manifiesto que en la medida - de lo posible es necesario evitar el desarrollo - de levaduras durante el proceso de fermentación, - y tratamiento con salmuera, ya que de otro modo - pueden provocar pérdidas cuantiosas al afectar sa bor, consistencia, calidad y conservación de las - aceitunas.

R E S U M E N

Se aislaron muestras de salmuera de aceitunas, realizando una serie de operaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, para proceder al estudio taxonómico de las levaduras que entran en este proceso. Las especies encontradas pertenecen a los géneros Candida, Pichia, Brettanomyces y Debaryomyces, en orden de abundancia.

Para cuantificar el daño producido por las diferentes especies en el proceso de fermentación, se estudió la cantidad de ácido láctico asimilado por ellas en el mismo. Los géneros Candida, Pichia y Brettanomyces resultaron ser los más perjudiciales.

B I B L I O G R A F I A

1. Alexopoulos, C. J. 1962. Introductory Mycology. pp 245-254. John Wiley and Sons -- Inc. New York 2nd. ed.
2. Cheronis A. & C. Entikrin, 1947. Semimicro- Qualitative Organic Analysis. pp 198, --- Thomas & Crowell Co. New York.
3. Compte., C. R. 1963. Estudio de los lactobacilos que intervienen en la fermentación de las aceitunas en México. Tesis de recepción profesional como Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM.
4. Cruess, W. V. 1930. Pickling Green Olives;-- Agricultural Experiment Station, University of California, Bulletin of Agriculture- 498: 42. Berkeley, California.
5. Elkins, B. H. 1958. The Chemistry of Industrial Toxicology, pp. 306-308. John Wiley Sons, 2nd. Ed.

6. Feigl, F. 1954. Spot Tests I, Inorganic ---- Applications, pp. 221-224, trans. Oelsper, R. E., Elsevier Publishing, Co.
7. Food Composition Tables; Food and Agriculture Organization of the United Nations (F.A.O.) 1949, Washington.
8. Fred, E. B. & V. S. Waksman. 1928. Laboratory Manual of General Microbiology, Mc. Graw Hill Co., New York.
9. Frobisher, M. 1929. Fundamentals of Microbiology, W. B. Saunder Co., U. S. A.
10. Graham, V. E. & E. G. Hastings. 1941. Studies on Film Forming Yeasts, I Media and -- Methods. C. Jour. Res. 19: 251-256.
11. Guilliermond, A. 1928. Clef Dichotomique -- pour la Determination des Levures. Librairie le Francois, Paris.
12. \_\_\_\_\_ 1928. The Yeasts; trans. F.-Tanner. John Wiley and Sons, New York.
13. Haehlen, H. 1956. Bioquímica de las Fermentaciones. Aguilera Editores, S. A.

14. Henrici, T. A. 1941. The Yeasts, Genetics, Cytology, Variation, Classification and -- Identification. Bac. Revs. 5 : 97-179.
15. \_\_\_\_\_ 1930. Molds, Yeasts and Actinomyces. John Wiley and Sons, New --- York.
16. Herrera T. 1954. Influencia de la Temperatura durante la Rehidratación de la Levadura del Pan (Saccharomyces cerevisiae) Seca y Activa. Tesis para obtener Título de -- Q. B. P., Escuela Nacional de Ciencias Bio lógicas, I. P. N. México.
17. Hoffert, D. 1926. The Action of Yeasts on Lactic Acid. Bioch. Jour. 20: 358-362.
18. Izquierdo Tamayo, A. 1953. Fermentación Mi crobiana en el Aderezo de las Aceitunas -- Verdes. Microbiología Española, 6: 291- -- 311.
19. \_\_\_\_\_ 1955. La Población Micro-- biana en la Salmuera de las Aceitunas. Mi crobiología Española, 8: 3-14.
20. Jörgensen. A. & A. Hansen. 1959. Microbio- logía de las Fermentaciones Industriales.--

Editorial Acribia, 7a. Ed. México.

21. \_\_\_\_\_ 1948. Micro-Organisms and Fermentation. Charles Griffin and Co. U. S. A.
22. Kayser, E. 1925. Microbiología Agrícola Aplicada a la Transformación de los Productos Agrícolas. Salvat Editores, S. A. Barcelona.
23. Lindegren, C. C. 1945. An Analysis of the Mechanism of Budding in Yeasts and Some Observations on the Structure of the Yeasts ---- Cell. Reprinted from Mycologia, 37: 6.
24. \_\_\_\_\_ 1945. Yeasts Genetics, Life Cycles, Cytology, Hibridization, Vitamin -- Synthesis and Adaptative Enzymes. Bact. --- Revs. 9: 170.
25. Lodder, J. & Kreger-Van Rij, 1952. The Yeasts, A. Taxonomic Study, North Holland Publishing Co., Amsterdam. Interscience Publishers Inc. New York.
26. Lutman, B. F. 1929. Microbiology. Mc. Graw - Gill Book Co. New York.
27. Mrack, E. M. & H. J. Phaff. 1952. Yeasts. -

Division of Food Technology, University -  
of California, Berkeley, California. Re-  
printed from Annual Review of Microbiolo-  
gy.

28. Neuberger, C. 1946. The Biochemistry of Yeasts  
Ann. Rev. Biochem. 15: 435-437.
29. Nickerson, A. & J. Walter. 1942. Mechanics-  
of Budding and Conjugation in Yeasts. --  
Physiol. 19: 3.
30. Prescott, S. C. & C. G. Dunn. 1959. Indus--  
trial Microbiology. Mc. Graw Hill Co. ---  
3d. Ed.
31. Ruiz Oronoz, M. 1942, Métodos de Estudio y -  
Clasificación de las Levaduras. Principa  
les Levaduras del Pulque y del Aguamiel.-  
Tesis Doctoral, UNAM.
32. Salle A. J. 1954. Bacteriología, pp. 100-131.  
Editorial Gustavo Gili, S. A. 4a. Ed.
33. \_\_\_\_\_ 1954. Laboratory Manual on-  
Fundamentals Principles of Bacteriology -  
Mc. Graw Hill Co. 4a. Ed.
34. Sánchez Marroquín, A. 1961. Microbiología -

35. Schultz, A. S. & L. Atkins. 1947. The Utility of Bios Response in Yeast Classification and Nomenclature. Arch. Biochem. 14: 369.
36. Skinner, C. E. 1947. The Yeast Like Fungi: Candida and Brettanomyces. Bact. Revs. 11: 227-274.
37. Shmwell, J. L. 1938. A Simple Staining Method for the Detection of Ascospores. Jour. Inst. Brewing. 35: 474.
38. Shriner, J. & A. Fuson. 1940. Identification of Organic Compounds. 136-138 pp. John Wiley and Sons, 2nd. Ed.
39. Stantial, H. 1935. The Sporulation of Yeast Soc. Can. 3: 175-188.
40. Tanner, F. W. E. D. Devereuk & F. M. Higgins. 1926. The Multiplication of Yeasts and Yeast Like Fungi. Synthetic Nutrient Solutions. Jour. Bact. 11: 45.
41. Van Leir, T. 1935. La Chimie des Fermenta--

tions. Maison et Cie. Editeurs, Librairies de l'Académie de Médecine, Boulevard St. -- Germain 120, Paris.

42. Vaughn, R. H. 1954. Lactic Acid Fermenta---  
tion of Cucumber, Sauerkraut and Olives. -  
Agricultural Experiment Station, University  
of California, Bulletin of Agriculture. --  
Berkeley, California.
  
43. \_\_\_\_\_ H. C. Douglas & J. R. Gilil-  
land. 1942. Production of Spanish Type ---  
Green Olives. Agricultural Experiment Sta-  
tion, University of California. Bulletin -  
of Agriculture. 678: 82. Berkeley, Cali--  
fornia.
  
44. Von Oettingen. 1951. A Guide to Clinical --  
Diagnosis and Treatments. 155 pp. Saunders-  
Co. 2nd. Ed. New York.
  
45. Wellman, H. R. 1931. Olives. Agricultural -  
Experiment Station, University of Califor--  
nia, Bulletin of Agriculture, 510: 27. Ber  
keley, California.
  
46. Wickerham, J. L. 1946. A critical of the Ni  
trogen Assimilation Test Commonly Used in -  
the Classification of Yeasts. Jour. Bact. -  
52: 293-301.