

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**METODOS DE ESTUDIO Y CLASIFICACION DE LAS
LEVADURAS. PRINCIPALES LEVADURAS
DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE**

TESIS

que presenta Manuel Ruíz Oronoz M. C. B. para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

México, D. F.

1942

1942

1

Ejemp:

3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

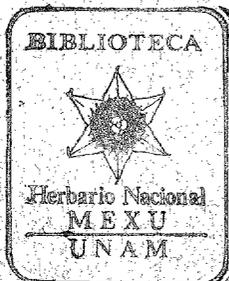
A mi esposa

*Sra. LUCILA CARMONA de RUIZ
Que con su entusiasmo y constante ayuda me ha
inculcado cada vez más el cariño hacia las Cien-
cias Biológicas. Con todo mi cariño.*

A mis hijos

*VICTOR MANUEL y
OSCAR EDMUNDO*

*Espero que el pequeño esfuerzo que representa
este humilde estudio sirva a ellos en lo futuro pa-
ra guiar sus pasos por la senda del bien y del
trabajo.*



BIBLIOTECA UNIVERSIDAD NACIONAL

Con mi más profunda estimación, admiración y respeto, para mi Maestro, Doctor

Don ISAAC OCHOTERENA

Sean estas líneas como eterno agradecimiento para el verdadero maestro que, con todo acierto, cariño y paciencia, me encausó por el fructífero campo de la investigación científica y con sus enseñanzas y consejos me ha llevado por el camino del trabajo y del estudio.

AL INSTITUTO DE BIOLOGIA

Venerable institución la cual me ha proporcionado todos los medios para desarrollar mis trabajos de investigación.

SUMARIO.

METODOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DE LAS LEVADURAS.	9
AISLAMIENTO.	10
SIEMBRA.	11
PURIFICACION DE LOS CULTIVOS.	12
Método de diluciones.	14
Método de Koch.	15
Método de Koch modificado por Hansen.	15
Métodos de Lindner.	17
EXAMEN CRITICO DE LOS METODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACION CITADOS.	18
CAMINO QUE SE SIGUE PARA LA DETERMINACION DE UNA LEVADURA.	22
CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS LIQUIDOS.	22
Medios de cultivo.	22
Siembra.	24
Caracteres fundamentales.	25
Temperatura.	25
Anillo.	25
Velo.	25
Depósito.	26
Fermentación.	27
Enturbiamiento.	27
CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS SOLIDOS.	27

Medios de cultivo.	27
Material.	31
Cultivos en placa.	31
Caracteres.	31
Cultivos en estría.	36
Caracteres.	37
Cultivos en picadura.	38
Caracteres.	38
Colonias gigantes.	38
CARACTERES MACROSCOPICOS DE LAS CELULAS.	41
Procedimientos para el examen microscópico.	41
Caracteres.	42
ESPORULACION.	51
Germinación de las ascosporas.	58
TEMPERATURAS LIMITES Y OPTIMA PARA LA REPRODUCCION, ESPORULACION Y FORMACION DE VELOS.	60
Reproducción.	61
Esporulación y formación de velos.	62
CARACTERES BIOQUIMICOS DE LAS LEVADURAS.	62
Fermentaciones.	62
Azúcares fermentécibles.	66
Leyes de Klyver-Dekker sobre la fermentación de las levaduras.	67
Constancia del poder fermentativo de las levaduras.	68
Empleo de la leche tornasolada.	68
Licuefacción de la gelatina.	69
Empleo del alcohol etílico como fuente de carbono.	69
Asimilación de los azúcares.	69
Asimilación del nitrógeno.	74
CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS.	75
LEVADURAS ASCOSPOROGENAS.	77
Familia Endomycetaceae.	77
Clave de los géneros de la familia Endomycetaceae.	79
LEVADURAS ANASCOSPOROGENAS.	81
Familia Nectaromycetaceae.	81
Familia Rhodotorulaceae.	82
Familia Torulopsidaceae.	82

Subfamilia Torulopsidoideae. Clave de los géneros.	83
LEVADURAS QUE FORMAN BASIDIOSPORAS.	84
Familia Sporobolomycetaceae.	84
PRINCIPALES LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE.	85
SACCHAROMYCES CARBAJALI n. sp.	89
PICHIA BARRAGANI n. sp.	94
TORULOPSIS HYDROMELITIS n. sp.	102
TORULOPSIS AQUAMELLIS n. sp.	110
BIBLIOGRAFIA.	119

MÉTODOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DE LAS LEVADURAS

Las levaduras, con excepción de muy raros casos, no presentan en la forma y dimensiones de sus células, caracteres que permitan determinar el género o la especie a la cual pertenecen; lo mismo se puede decir por lo que respecta a sus ascas y ascosporas cuando las llegan a formar. Las formas de sus células, aún de los géneros y especies más diversos y distantes es siempre semejante: esférica, oval, elíptica y cilíndrica y en cuanto a sus dimensiones siempre están comprendidas entre 5 y 10 micras y sólo en raros casos llegan a ser mayores. Lo mismo se puede indicar de la forma, dimensiones, aspecto y número de las ascas y ascosporas. Estimamos entonces que sería una audacia e ignorancia imperdonables, el tratar de clasificar una levadura, tomando sólo en cuenta estos caracteres.

Cuando se desea determinar una levadura, no basta anotar las formas que adoptan sus células en diversas condiciones de cultivo y en los distintos estados de evolución, o de observar los caracteres y formación de sus ascas y ascosporas, así como la germinación de éstas; es necesario apoyarse en otros caracteres de gran importancia: formación de velos, islotes y anillos; aspecto de los cultivos en placa, estría y picadura; en las colonias gigantes, temperaturas mínimas, óptimas y máximas sobre su reproducción, esporulación y formación de velos y anillos; en sus caracteres bioquímicos como la fermentación y asimilación de los azúcares, asimilación de las sustancias nitrogenadas, licuefacción de la gelatina, producción de pigmentos y aprovechamiento del alcohol etílico como fuente de carbono en su crecimiento.

El estudio de una levadura es una operación meticulosa que requiere una gran paciencia y dedicación y que exige, según **Stelling-Dekker y Lodder**, un tiempo mínimo de dos o tres meses y esto, cuando se dispone de todos los aparatos, útiles y substancias necesarios, pues en caso contrario, el tiempo, el trabajo y el esfuerzo son mayores. Los caracteres referentes a las colonias gigantes y a la licuefacción de la gelatina, indispensables en la clasificación, deben tomarse aún a los 60 y 90 días.

Exponemos a continuación, en este pequeño trabajo, los métodos que hemos empleado y que aconsejamos para la determinación de una levadura; dichos métodos son los que hemos seguido durante todo el estudio que efectuamos sobre las levaduras del aguamiel y del pulque. Se han empleado, de una manera exacta, varios de los métodos recomendados por insignes autores como **Hansen, Lindner, Guilliermond, Tanner, Henrici, Stelling-Dekker y Lodder**. Algunos de estos métodos hemos tenido que modificarlos tomando en cuenta nuestros modestos recursos, lo cual nos ha servido eficazmente para ir formando nuestra propia experiencia. Así mismo, nos permitimos discutir el valor sistemático de los caracteres que se ponen en evidencia.

AISLAMIENTO

De una manera lógica, la primera operación que se debe efectuar en el estudio de una levadura, es su aislamiento, el cual se hace a partir de un producto natural o patológico. En la naturaleza, las levaduras se encuentran sumamente repartidas en medios muy diversos y numerosos: tierra, aire, agua, raíces, tallos, hojas, flores, frutos, semillas, jugos vegetales, miel, leche, quesos, excreciones vegetales, tubo digestivo de los animales, excrementos, supuraciones, tumores, escamas de la piel, bebidas fermentables, cadáveres de animales, etc.

Con un sembrador de platino o tungusteno se toma de alguno de los medios citados y se cultiva en un medio sólido colocado en una caja de Petri. Los medios recomendados son: mosto de cerveza gelosado, gelosa glucosada adicionada de peptona en las siguientes proporciones: agua destilada 100 c.c., glucosa 2 gr., peptona 1 gr., ge-

losa 2 gr., o mosto de uva gelosado. Algunos autores recomiendan el medio de **Sabouraud** maltosado, el cual nosotros no aconsejamos, pues como lo hacen notar, **Langeron y Guerra**, además de tener gran proporción de azúcar, hay levaduras que se desarrollan muy mal en la maltosa debido a que no todas asimilan este azúcar. En nuestras experiencias hemos usado este medio, y llegamos a comprobar lo asentado por los citados autores. En el estudio que se ha hecho de las levaduras del aguamiel y del pulque, nosotros hemos utilizado, para el aislamiento, el aguamiel gelosado y siempre nos dió resul-

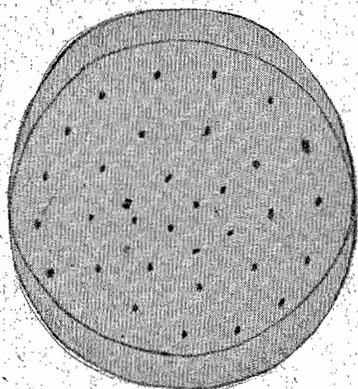


Fig. 1.—Manera de efectuar el aislamiento, en una caja de Petri, por el procedimiento de puntos separados.

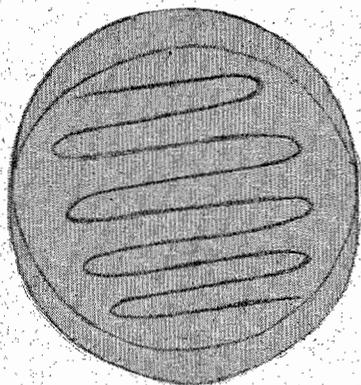


Fig. 2.—Manera de efectuar el aislamiento, en una caja de Petri, por el método de la estria.

tados altamente satisfactorios; creemos que, como el mosto de cerveza, dicho medio puede emplearse en el aislamiento de cualquier levadura.

SIEMBRA.—La siembra, en la caja de Petri, se puede hacer de tres maneras:

1o.—Por puntos separados colocados alrededor de la caja de Petri hasta terminar en el centro. (Fig. 1). Así se obtienen numerosas colonias que se pueden diferenciar por su forma, color y aspecto, lo que nos indica que están formadas de distintas especies o géneros de levaduras. Además, las colonias desarrolladas en los últimos

puntos, resultan casi puras, pues, al efectuar la inoculación en dichos puntos, el sembrador tenía ya muy pocos microorganismos.

2o.—En estría, para lo cual, partiendo de un extremo de la caja de Petri, y sin levantar el sembrador, se recorre toda la superficie del medio, trazando una línea ondulada (Fig. 2). Se forman así, a lo largo de la estría, numerosas colonias, las últimas de las cuales, son cepas casi puras.

3o.—Si el producto del cual se desea aislar las levaduras es líquido o un exudado patológico, se toma con una pipeta estéril, se coloca sobre el medio de cultivo y se agita la caja de Petri de manera que los microorganismos se repartan por toda la superficie, formándose así numerosísimas colonias muchas de las cuales son cepas puras. Desde el punto de vista médico, este procedimiento es el más apropiado, ya que permite conocer la riqueza en levaduras de un producto patológico, dato que, en muchas ocasiones, es de importancia para el médico.

Una vez que se han hecho cultivos en varias cajas de Petri, éstas se colocan en una estufa a 25° C., temperatura que, en la mayoría de los casos, es la más apropiada para el desarrollo rápido de las levaduras.

PURIFICACION DE LOS CULTIVOS.—No se puede proceder al estudio de ninguna levadura sin tener la completa seguridad de que se parte de cepas absolutamente puras. La purificación de las levaduras requiere una técnica delicada y gran paciencia.

En los medios naturales, una especie de levaduras está acompañada no solamente por bacterias y otros hongos sino por otras especies de levaduras. Es muy fácil eliminar las bacterias de un cultivo, para lo cual se siembra en un medio nutritivo favorable al desarrollo de las levaduras y el cual se adiciona de pequeña cantidad de ácido láctico o tartárico o clorhídrico. Las bacterias no se acomodan a vivir en medios ácidos y su desarrollo es muy raquítico; en cambio las levaduras prefieren estos medios y su vegetación es intensa. Después de varios cultivos sucesivos en las condiciones citadas, se llegan a eliminar por completo las bacterias y quedan

sólo levaduras. **Langeron** recomienda usar el **líquido de Raulin** ácido pudiendo llegar hasta un pH de 2, y para asegurarse de la pureza de la cepa se hace un exámen al estado fresco con lugol, o un frotis el cual se colora con azul de toluidina al 1 p. 100. El mismo autor indica que: "este control microscópico no basta siempre para estar seguro de la pureza de un cultivo, pues existen infecciones latentes en cepas de levaduras por bacterias u otros microorganismos. Mientras que las levaduras son cultivadas sobre gelosa glucosada o en general sobre medios ácidos, favorables a los hongos, estas infecciones latentes no se manifiestan puesto que estos medios son desfavorables a las bacterias. Pero en el momento en que se lleva la cepa a un medio que le es favorable (leche, gelatina, etc.), la infección llega a ser evidente. Es muy importante conocer este hecho, porque él explica, en gran parte, los resultados insólitos e inconstantes obtenidos por algunos autores que han empleado el método de **Castellani** para la determinación de las especies. En efecto, con las pruebas de la coagulación de la leche y de la licuefacción de la gelatina, se llega a doblar el número de especies obtenidas por el método de las fermentaciones. Nuestra opinión es que a menudo las pruebas positivas de la leche y de la gelatina son debidas a infecciones latentes."

A la opinión de este autor nosotros agregamos que, con cepas infectadas, se pueden obtener errores no sólo en lo que respecta a la leche y gelatina, sino así mismo en las fermentaciones, asimilación de azúcares, sustancias nitrogenadas y alcohol etílico, y aún en los caracteres macroscópicos de los cultivos, como formación de velos, islotes, anillos, colonias gigantes y en la forma, color, aspecto, etc., de los cultivos en placa, estría y picadura.

En los estudios que nosotros hemos realizado, se han utilizado, para eliminar las bacterias, cultivos sucesivos en medios líquidos adicionados de ácido láctico, sin necesidad de valuar el pH. Para ello se han tomado tubos que contienen 6 a 8 c.c., del medio líquido y con 4 a 6 gotas de ácido en cada tubo. Los resultados obtenidos siempre nos fueron satisfactorios.

Si es en general fácil, por los medios ácidos, separar las levaduras de las bacterias, es en cambio muy difícil separar varias es-

pecies de levaduras que se encuentran en un sólo cultivo: las levaduras poseen semejante forma, dimensiones y estructura, lo que impide distinguirlas. Para tener la certidumbre, que se ha aislado una sola especie de levadura, es absolutamente indispensable partir de una sola célula de levadura, o sea, hacer un cultivo monosperma. Desde hace mucho tiempo, gracias a las investigaciones tan precisas de los insignes **Koch, Hansen y Lindner**, se conocen varios métodos para obtener cultivos a partir de una sola célula.

A continuación anotamos los métodos que se pueden usar para obtener cultivos a partir de una sola célula.

Método de diluciones.—Este método fué concebido por primera vez por **Lister** y después por **Pasteur** pero no se obtuvieron resultados satisfactorios hasta que **Hansen** lo perfeccionó en 1881. Se toman de un cultivo de levaduras algunas células que se colocan en un matrás con agua estéril, se agita perfectamente el agua de manera que las células se repartan de una manera uniforme en ella, se toma una gota y se cuentan al microscopio el número de células que contenga; esta numeración se logra fácilmente colocando la gota de dilución de levaduras sobre un portaobjetos que se recubre de una laminilla sobre la cual se encuentre gravada una cuadrícula que sirva como punto de referencia. Supongamos que en la gota se han encontrado 10 células: se lleva entonces una gota de la misma dilución a un matrás que encierre un volumen determinado de agua estéril, por ejemplo 20 c.c. Habrá muchas probabilidades para que este matrás encierre 10 células como la gota examinada al microscopio; se agita el líquido para que las células se repartan con uniformidad en el agua, y después se introduce 1 c.c., del citado líquido sucesivamente en 20 matraces que contengan un medio de cultivo líquido. Desde el punto de vista teórico, y si la operación está bien hecha, 10 de los matraces deberán contener una sola célula y los otros 10 ninguna, aunque prácticamente puede suceder de otra manera. Para resolver esta dificultad se agitan los matraces, de manera que si quedaron varias células en uno de ellos, se repartan igualmente en el líquido. Al quedar en reposo el medio de cultivo que contienen los matraces, las células se depositan aisladamente en el fondo y cada una, multiplicándose, será el punto de partida de una colonia. Si al ca-

bo de algunos días se obtiene una sola colonia, la cual se nota bajo la forma de mancha blanquizca colocada en el fondo del matraz, se podrá estar seguro que el matraz no encerraba más que una sola célula y que la cepa sólo contiene una sola especie de levadura.

Método de Koch.—Este procedimiento también se basa en diluciones, pero se emplea un medio de cultivo sólido como la gelatina o la gelosa. El método de Koch aún se usa por muchos autores y consiste en tomar una pequeña parte de un cultivo, colocarlo en bastante agua estéril y repartir uniformemente las células. Se toma luego una gota de esta agua que contiene las levaduras y se lleva a un matraz que contiene gelatina a 30° y que por lo mismo está licuada. Se agita el matraz para separar las células en el medio y se vacía la gelatina después en láminas de vidrio estériles que están dentro de cajas también estériles; la gelatina se solidifica y las células que contiene se desarrollan en pocos días en colonias. Un examen macroscópico de la forma, aspecto, color, etc., de las colonias, así como de la apariencia microscópica de las células puede dar una seguridad de que se han obtenido cultivos puros.

Método de Koch modificado por Hansen.—Koch ideó su método especialmente para las bacterias, pero **Hansen** lo adoptó, modificándolo para las levaduras. Reemplazó las láminas de vidrio por **cámaras húmedas ordinarias** o por **cámaras húmedas de Boettcher**, las cuales permiten observar el desarrollo de las colonias ante el microscopio.

Una **cámara húmeda ordinaria**, consiste en un portaobjeto escavado (es un portaobjeto ordinario en cuyo centro tiene una depresión), al cual se le coloca un cubreobjeto cubriendo la escavación. En el fondo de ésta se coloca pequeñísima proporción de agua y del cubreobjeto se suspende una gota del medio de cultivo conteniendo algunas células; en los bordes del cubreobjeto se coloca vaselina para evitar la desecación o alguna contaminación del medio externo. (Fig. 3).

La **cámara de Boettcher**, o **cámara de Van Tieghm y Lecomier** está formada por un anillo de vidrio que se fija a un portaobjeto or-

dinario por medio de parafina o bálsamo del Canadá. (Fig. 4). Para mantener un medio húmedo apropiado, se coloca pequeña cantidad de agua en el fondo de la cámara y luego se cubre el anillo con un cubreobjeto del cual se ha suspendido una gota del medio nutritivo que contiene las células. Para fijar el cubreobjeto al anillo se usa vaselina y para evitar contaminaciones, se esterilizan a la flama el portaobjeto, anillo y cubreobjeto.

Usando cualesquiera de las dos cámaras, **Hansen** procede, de acuerdo con el método de **Koch**, de la siguiente manera: una vez las células colocadas en la gelatina licuada a 30° , se toma una gota de la misma y se coloca en un cubreobjeto el cual tiene grabada una

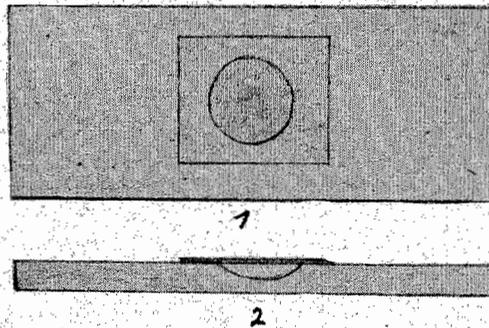


Fig. 3.—Cámara húmeda ordinaria: 1.—Vista de frente; 2.—Vista de perfil.

cuadrícula con 16 cuadros; el cubreobjeto se colocó después sobre la cámara húmeda. Una vez solidificada la gelatina, se cuentan el número de células que existen con ayuda del microscopio, operación que se facilita por la cuadrícula del cubreobjeto. Se anota el número de los cuadros ocupados por las células y se pone el cultivo a 25° para que el desarrollo se haga con más rapidez. Por medio de observaciones microscópicas efectuadas a intervalos regulares, es fácil seguir la multiplicación de las células hasta que producen colonias. Una vez desarrolladas éstas, se pasan a tubos o matraces donde se obtienen cultivos abundantes, los cuales han partido de una sola célula.

Métodos de Lindner.—Lindner puso en práctica varios métodos para obtener cepas puras de levaduras, los cuales se basan en los mismos principios anteriores, pero muy simplificados.

Uno de ellos denominado "**método de cultivo en gota**", consiste en hacer sucesivas diluciones de las células en mosto de cerveza hasta que cada gota contenga una sola célula, lo cual se comprueba ante el microscopio. Una vez que ésto se ha logrado, con una pipeta fina y estéril se toman gotas del mosto y se van colocando

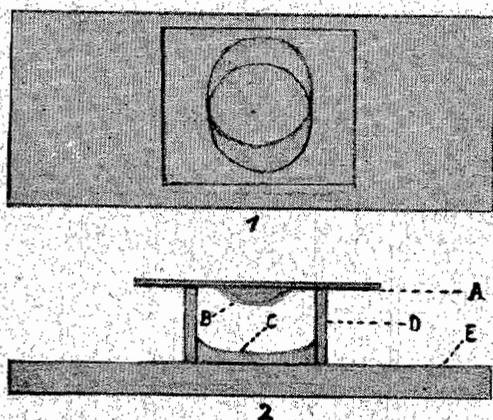


Fig. 4.—Cámara húmeda de Boettcher: 1.—Vista de frente; 2.—Vista de perfil. A.—Cubre objeto; B.—Gota del medio de cultivo; C.—Agua destilada estéril; D.—Anillo; E.—Portaobjetos.

separadas en un medio de cultivo sólido colocado en cajas de Petri estériles. Cada célula se desarrolla en un cultivo puro y, una vez obtenidas varias colonias, se pasan a tubos de cultivos en donde se obtienen cepas puras en gran cantidad.

Otro método de Lindner, denominado "**procedimiento de cultivo en gotitas**" es muy semejante al anterior, con la sola excepción de que se usa un medio sólido en las diluciones, como la gelatina, y que las gotas del medio conteniendo una sola célula se colocan en un cubreobjeto el cual se dispone en una cámara húmeda; ésto per-

mite observar el desarrollo de los cultivos ante el microscopio; obtenidas las colonias puras, se transportan a tubos con medios nutritivos.

Examen crítico de los métodos de aislamiento y purificación citados.—Nos es satisfactorio indicar que todos estos métodos han sido practicados por primera vez en México, por nuestro insigne maestro doctor **Isaac Ochoterena**, quien obtuvo siempre resultados satisfactorios en su empleo. «Gracias al gran desprendimiento cariño y paciencia que siempre ha tenido el citado maestro por la enseñanza, nosotros tuvimos la fortuna de iniciar y aprender estos estudios directamente de él: sirvan estas líneas como eterno agradecimiento para el verdadero maestro que, con todo acierto, nos encausó por el fructífero campo de la investigación científica.

Todos los métodos de aislamiento y purificación de levaduras ya anotados, los hemos utilizado por varios años en los laboratorios del Instituto de Biología y por lo mismo, creemos que estamos en condiciones de indicar breves comentarios sobre la mayor o menor efectividad de ellos, así como sobre las dificultades y tropiezos que se encuentran en cada uno.

El único método exacto y riguroso para eliminar las bacterias de los cultivos de levaduras es el ya citado, o sea, el de los cultivos sucesivos en medios ácidos; no ofrece dificultades y es tan sencillo y efectivo, que no tenemos ninguna objeción que hacerle; es el único que hemos empleado y siempre nos ha resultado completamente satisfactorio.

El método de diluciones de **Hansen**, para obtener cepas puras a partir de una célula, puede ser efectivo en muchas ocasiones, pero muestra sus dificultades: en laboratorios muy modestos no siempre se cuenta con laminillas cuadrículadas para contar las células que hay en una gota de dilución, hay necesidad de utilizar a veces muchos matraces y bastante medio de cultivo y, a veces, no se dispone ni de unos ni del otro, y sobre todo, como la multiplicación de una sola célula no se ha visto ante el microscopio, no se puede asegurar, de manera absoluta, que las cepas obtenidas lo sean a partir de una sola célula.

El método de **Koch** aplicado a las levaduras, ofrece mayores dificultades que el anterior, debido a que las células no se reparten con toda uniformidad en el medio y cuando éste se coloca en las láminas de vidrio estériles la mayoría de ellas quedan muy cerca unas de otras; cuando se forman las colonias se confunden unas con otras y se dificulta mucho la distinción de ellas. Como no se observa al microscopio la multiplicación de una célula hasta la formación de una colonia, no hay plena seguridad de que ésta constituya una cepa pura, pues pueden haber quedado dos, tres o más levaduras juntas y a partir de todas ellas haberse obtenido la colonia; además, este procedimiento está muy sujeto a contaminaciones con esporas de hongos tan abundantes en el aire. Aunque varias veces hemos probado este método en el laboratorio, siempre hemos tenido contaminaciones y en ningún caso podemos asegurar haber obtenido un resultado completamente positivo.

El método de **Hansen** en cámaras húmedas, es más seguro que los anteriores pero ofrece sus dificultades: no siempre se dispone de un cubreobjetos cuadrulado, las células no se reparten bien en la gelatina y quedan casi siempre muy cerca unas de otras y aún cuando quede una célula bien aislada de las otras y se observe su multiplicación ante el microscopio hasta obtener una cepa pura, al momento de pasar la colonia a un tubo o matríz por medio de un sembrador, la gelatina no se toma fácilmente con el alambre de platino o de tungusteno porque se desliza en el cubreobjetos, lo cual hace que tarde mucho tiempo esta operación y estando el cultivo ante el aire se llega a contaminar. Aunque algunas veces obtuvimos resultados positivos con este método, después de muchas pruebas hechas con gran trabajo y paciencia, la mayoría de los casos se nos contaminaron los cultivos.

El "método de cultivo en gota" de **Lindner** tiene las mismas dificultades y objeciones que el de las diluciones, ya que se basa en los mismos principios. Una vez hecha la dilución en mosto, se tiene que observar una gran cantidad de gotas al microscopio hasta encontrar que una de ellas tenga una sola célula, pero al tomar nuevas gotas y colocarlas en cajas de Petri, no hay seguridad, puesto que no se han visto de nuevo ante el microscopio, de que lleven

como la anterior una sola célula.

Seguramente el método más preciso de los ya anotados es el de "**cultivo en gotitas**" de **Lindner**; pero siempre existe la dificultad de manejar la gelatina y de pasar ésta, cuando ya tiene las colonias puras a los tubos o matraces, como indicamos a propósito del método de **Hansen** en cámaras húmedas.

Método que recomendamos como más seguro y preciso.—Después de nuestra larga experiencia por varios años, estimamos que estamos en disposición de recomendar cual es el método más exacto, que ofrece menos dificultades y el que ahora siempre seguimos. Es el mismo de **Lindner** denominado "**cultivo en gotitas**" pero con la única diferencia que en lugar de usar gelatina para la dilución, se emplea algún medio líquido como el mosto de cerveza o aguamiel. Esta ligera modificación evita todas las dificultades que se presentan al utilizar gelatina.

El procedimiento, descrito de una manera detallada es el siguiente: se toma un portaobjetos escavado en el que se va hacer una cámara húmeda, o si no se tiene, se prepara una cámara de **Boettcher** ya descrita con anterioridad y cuyo esquema se observa en la Fig. 4. Es preferible el primero porque permite mayor claridad en la observación de las células. En un vidrio de reloj estéril, cubierto por una caja de Petri estéril, se coloca un medio nutritivo líquido: mosto de cerveza o aguamiel; se toma con un sembrador una cantidad apenas visible del cultivo de levaduras que se va a purificar y levantando la caja de Petri lo suficiente apenas para dar entrada al sembrador se agita perfectamente, dentro del medio, la parte que lleva las células, de manera que éstas queden repartidas uniformemente. Con una pluma de escribir muy fina y esterilizada a la flama se toma un poco de la dilución y en un cubreobjetos común y corriente, bien limpio y estéril, se van colocando gotitas muy pequeñas del medio líquido. La colocación de las gotitas se hace en hileras ordenadas (nosotros siempre colocamos 25 gotitas en 5 hileras). (Fig. 5). Esta operación tiene que hacerse rápidamente, pues de otro modo, siendo las gotas muy pequeñas, al terminar de colocar las últimas, las primeras se han secado, lo cual debe evitarse a

todo trance. (Aquellas personas que por primera vez vayan a practicar este método, les recomendamos que previamente adquieran la destreza necesaria para esta operación, practicando muchas veces con agua común). Una vez colocadas las gotitas en el cubreobjeto, se coloca éste encima de la cámara húmeda y sus bordes se cierran con vaselina.

Examinando las gotitas ante el microscopio se encontrará que algunas no contienen células, otras encierran dos o más, pero también habrá una o varias que contengan una sola célula: si esto no logra se repite la experiencia tantas veces como sea necesario. (Si las gotas tienen muchas células, se diluyen más las células que están

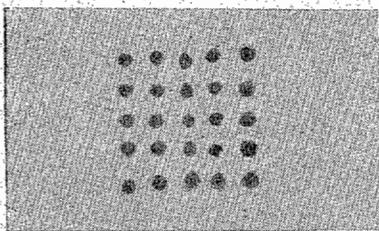


Fig. 5.—Manera de disponer las gotitas del medio de cultivo líquido que lleva las células.

en el vidrio de reloj para lo cual se agrega más medio líquido) Cuando nosotros usamos por primera vez este método, tuvimos que repetir esta operación, debido a la falta de práctica, más de 50 veces, lo que nos ocupó varias tardes; en la actualidad, con una sola vez, obtenemos más de la mitad de las gotas con una sola célula.

La cámara se debe colocar después a 25° y con observaciones continuadas se puede notar la multiplicación de una célula hasta dar una pequeña colonia. Cuando se obtiene ésta, y que puede verse a simple vista, con un papel filtro muy delgado, pequeño y estéril, se absorbe la gota que contiene la colonia y el papel se coloca en un tubo que tenga un medio líquido o mejor un medio sólido. Como el papel absorbe con rapidez la gota, no se da tiempo para

las contaminaciones, como cuando las gotas se hacen con gelatina que se dificulta tomarla del cubreobjetos. A los pocos días, en el tubo donde se puso el papel, se obtiene un cultivo abundante, el cual sí podemos tener la **absoluta seguridad** de que partió de una sola célula y, que por lo mismo, constituye una cepa completamente pura.

CAMINO QUE SE SIGUE PARA LA DETERMINACION DE UNA LEVADURA

Una vez que se obtiene una cepa pura y por lo mismo se tiene la seguridad de trabajar con una sola especie de levadura, hay necesidad de iniciar una serie de trabajos encaminados a determinar la posición sistemática de esa especie, lo cual sólo se logra por la investigación de sus caracteres macroscópicos y microscópicos de los cultivos, así como de los fisiológicos y bioquímicos.

A continuación exponemos, de manera detallada, el proceso que se utiliza para dicha determinación.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS LIQUIDOS

Los caracteres de crecimiento de las levaduras en medios líquidos son de gran importancia para la clasificación, aún más que en el estudio de las bacterias.

MEDIOS DE CULTIVO.—Como los caracteres de la vegetación varían con la composición del medio, es preferible trabajar con un medio de cultivo "standard". El más ampliamente usado por todos los investigadores es el **mosto de cerveza**, del cual, **Stelling-Dekker** (1931), proporciona la siguiente composición: a un kilo de harina de malta se le agregan 2.6 kilos de agua de la llave y se calienta a 45° C., por tres horas agitando constantemente; después se eleva la temperatura a 60° C., por una hora o más; se filtra y se lleva al autoclave 15 minutos a 120° C., luego se lleva a una concentración de 15° Balling; se vuelve a filtrar y finalmente se reparte en tubos y se esterilizan estos a 120° C., durante 30 minutos.

Guilliermond (1928) indica otra manera de hacer el mosto: se pone a germinar gran cantidad de granos de cebada perla, dentro de una estufa a 25° y colocados sobre papel secante o algodón húmedos; a los tres o cuatro días, cuando los granos están hinchados y la radícula del embrión comienza a salir se les seca en la estufa a temperatura de 30° C., y después se trituran perfectamente hasta convertirlos en un polvo llamado malta. Se disuelven 200 grs. de malta en un litro de agua y lentamente se eleva la temperatura a 60° C., en donde se mantiene por 45 minutos agitando constantemente; a continuación se agregan 4 grs., de lúpulo, se hierve una hora, se filtra, se dosifica la maltosa y se diluye el líquido con una cantidad de agua suficiente para que contenga 3% de maltosa; se filtra de nuevo, se reparte en tubos y se esteriliza media hora a 120° C.

En la práctica, es difícil seguir los dos procedimientos anotados para elaborar el mosto: en el primer caso, existe el inconveniente de que la malta no se consigue en el comercio (al menos en nuestro medio) y si la tienen las fábricas de cerveza, éstas no la venden. El segundo procedimiento, lo hemos logrado en el laboratorio, pero es muy lento y difícil. Para obviar estas dificultades aconsejamos conseguir el mosto ya preparado en las fábricas de cerveza. (Para nuestros trabajos siempre hemos utilizado el mosto de la Cervecería Modelo, cuyos dirigentes siempre nos han proporcionado con gran benevolencia).

Otros autores recomiendan el **caldo de levadura**, el cual se obtiene haciendo hervir y agitando durante 5 minutos, 100 grs., de levadura fresca en un litro de agua destilada; después se filtra, se reparte en tubos y se esteriliza. Otros investigadores han utilizado **caldo de carne y Raulin**, y cuya composición no anotamos aquí, por encontrarse en cualquier bacteriología. Estos dos medios, como el caldo de levadura, los hemos utilizado, pero no aconsejamos su empleo porque el desarrollo de las levaduras es muy raquítico en ellos.

Langeron y Guerra han utilizado en sus investigaciones un medio con glucosa al 2% y peptona al 1%, el cual se puede preparar en cualquier laboratorio. Aquellos autores que han trabajado con levaduras de vinos han usado mosto de uva y los japoneses con cultivos de "Koji".

Por nuestra parte, en los trabajos que hemos efectuado sobre las levaduras del aguamiel y del pulque, se ha utilizado el aguamiel extraído directamente del maguey, el cual se pone en el autoclave a 120° C., durante una hora para precipitar las substancias proteicas, luego se filtra y se reparte en tubos que se esterilizan a 115° C., durante 30 minutos. Es un medio en el que cualquier levadura se desarrolla en gran abundancia, pero ofrece la dificultad de que sólo se puede conseguir por aquellos investigadores que trabajan cerca de donde existen magueyes pulqueros y de que su composición es muy variable; estas causas impiden que pueda ser un medio "standard".

Por todo lo anteriormente expresado, se deduce que el único medio que siempre debe utilizarse es el **mosto de cerveza** y si acaso también, el de **Langeron y Guerra**. Si nosotros hemos empleado también el aguamiel, es solamente cuando se han estudiado levaduras aisladas de este medio. Estimamos que los únicos caracteres que deben tomarse en cuenta para la determinación sistemática, son los obtenidos en mosto de cerveza, y que si se proporcionan los observados en otros medios, sólo tienen importancia muy secundaria. **Stelling-Dekker y Lodder**, que han efectuado en la actualidad los mejores y más completos estudios sobre levaduras, sólo proporcionan los caracteres obtenidos en mosto de cerveza.

Material.—El medio líquido debe ser repartido en tubos de ensaye ordinarios (18 cm. por 18 mm.). Es inútil emplear matraces de fondo redondo o plano, pues dan los mismos resultados que se obtienen con los tubos y, en cambio, el desarrollo del cultivo es más tardado.

Siembra.—La siembra debe hacerse con una pequeña cantidad de células que se tomarán de un cultivo joven en medio sólido. Los tubos deben colocarse en una estufa a 25° C., y ser observados durante un mes como mínimo. Después de este período los caracteres anotados son confusos y pierden gran parte de su valor sistemático. Sólo en casos excepcionales se anotarán nuevos caracteres que sean de verdadera importancia. Nosotros encontramos una levadura roja, cuya especie tenemos en estudio, que a los 40 días produjo islotes de velo en la superficie del aguamiel.

CARACTERES FUNDAMENTALES.—Los caracteres principales que deben anotarse son la presencia o ausencia de velo y anillo, así como la formación del depósito al principio o después; como caracteres secundarios, la formación y enturbiamiento del medio.

Temperatura.—Debe anotarse siempre la temperatura en que se desarrolla el cultivo, pues aunque debe procurarse que sea siempre 25° C., hay casos en que se puede carecer de estufa y entonces tienen que colocarse los tubos a la temperatura del laboratorio.

Anillo.—El anillo se constituye por una colonia anular que se desarrolla en el ángulo formado por la pared del tubo y la superficie del líquido (Fig. 6). Se puede considerar el anillo como velo incompleto. Del anillo se anotarán su color, transparencia, altura, tiempo en que apareció, así como los cambios que experimente en 30 días.

Velo.—El velo es una colonia aérea que recubre más o menos la superficie del medio (Fig. 6). Según su aspecto puede ser **membranoso** o **mucoso**.

El velo membranoso se forma por filamentos entrecruzados que se extienden de una pared a otra del tubo; por lo común se adhiere fuertemente a las paredes del tubo y en ciertos casos se puede inclinar el tubo sin romperse el velo. Si se agita el tubo, se llega a desprender el velo y cae al fondo del tubo, en donde forma un depósito estratificado formado por la colocación sucesiva de muchos velos. Los velos membranosos presentan por lo común aspecto seco y opaco, color blanco o grisáceo y la superficie plegada; ésto último indica que contienen aire interpuesto. El velo mucoso se muestra en forma de película muy fina que flota en la superficie; es por lo común más o menos viscoso, húmedo, brillante, semitransparente y de color grisáceo-blanco; a veces puede tener un aspecto mate y cuando está bien desarrollado forma pequeños pliegues. Los velos mucosos se acompañan casi siempre por un anillo y no son adherentes a la pared del tubo; la agitación hace que se vayan al fondo del tubo numerosos grumos que enturbian el líquido.

Hay casos en que la formación de los velos no es completa y entonces sólo quedan en la superficie pequeños fragmentos de col-

nias llamadas "islotos de velo", que no se adhieren a la pared.

Respecto al velo hay que anotar la clase del mismo, su color, transparencia, brillo, tiempo en que aparece, así como los cambios que experimenta en 30 días. Existen levaduras que no forman velos, otras lo integran de uno u otro tipo o solamente islotos y hay casos en que se forman sucesivamente las dos clases, como **Candida**

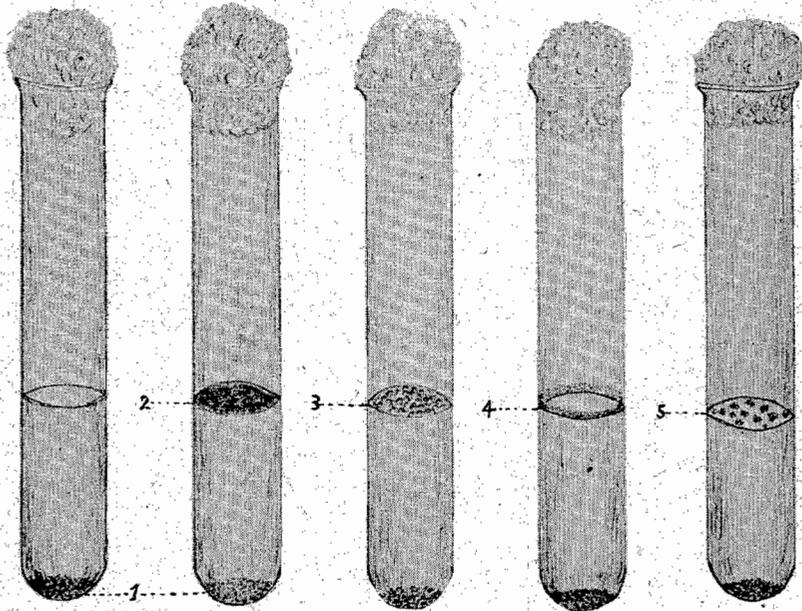


Fig. 6.—Diversos modos de vegetación de las levaduras en mosto de cerveza: 1.—Depósito; 2.—Velo mucoso; 3.—Velo membranoso; 4.—Anillo; 5.—Islotos de velo.

tropicalis que forman primero un velo mucoso que después se torna membranoso.

La presencia o ausencia de un velo, así como sus caracteres, son datos de importancia fundamental en la clasificación de las especies.

Depósito.—La presencia del depósito o sedimento es un dato muy secundario, y sin ningún valor sistemático, pues todas las le-

vaduras lo forman temprano o tarde; si acaso el único dato de cierta importancia es anotar si se forma inmediatamente o a los varios días. Sin embargo, no es por demás citar sus caracteres.

Fermentación.—Tiene cierto interés anotar si el mosto fermenta o no, pero carece de importancia para la clasificación, puesto que este medio posee varios azúcares; además, el poder fermentativo de la levadura se determinará después con azúcares puros y en condiciones especiales.

Enturbiamiento.—Es un dato muy secundario que carece de interés y sin ningún valor.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS SOLIDOS.

Los caracteres de la vegetación en medios sólidos son tan importantes en la determinación sistemática de la levadura, como los que se obtienen en medios líquidos, y por lo mismo, hay necesidad absoluta de observarlos y anotarlos.

Medios de cultivo.—Los únicos medios indispensables y considerados como "standard" son el **mosto de cerveza gelosado** y el **mosto de cerveza gelatinado**. El primero se prepara con mosto de cerveza líquido al cual se le agrega 1.5 ó 2% de gelosa o agaragar, se lleva al autoclave media hora a 120° C.; para incorporar la gelosa al medio, se filtra, se reparte en tubos (6 a 8 c.c., en cada tubo) y se esteriliza a 120° C., media hora. Para el segundo se agregan al mosto de cerveza líquido 12 a 15% de gelatina bastante pura (en nuestro laboratorio siempre se ha usado gelatina "Difco") se calienta el medio en baño maría para incorporar la gelatina, se filtra, se reparte en tubos y se esteriliza media hora a 110°; una temperatura mayor perjudica a la gelatina la cual después no solidifica.

Se pueden utilizar también muchos otros medios como Raulin, caldo de levadura, caldo de carne, mosto de uva, infusiones de zanahoria, patata, frijol, tomate, etc., para lo cual basta agregar gelosa o gelatina a dichos medios líquidos. Así mismo, muchos autores han empleado los medios "standard" de gelosa y gelatina, el de Gorodkowa, Sabouraud y los fragmentos de zanahoria y patata.

Langeron y Guerra opinan que el medio tipo más apropiado es la gelosa al 2% y peptonada al 1%. En sus investigaciones tan fructíferas, siempre han empleado este medio del cual indican que presenta las siguientes ventajas:

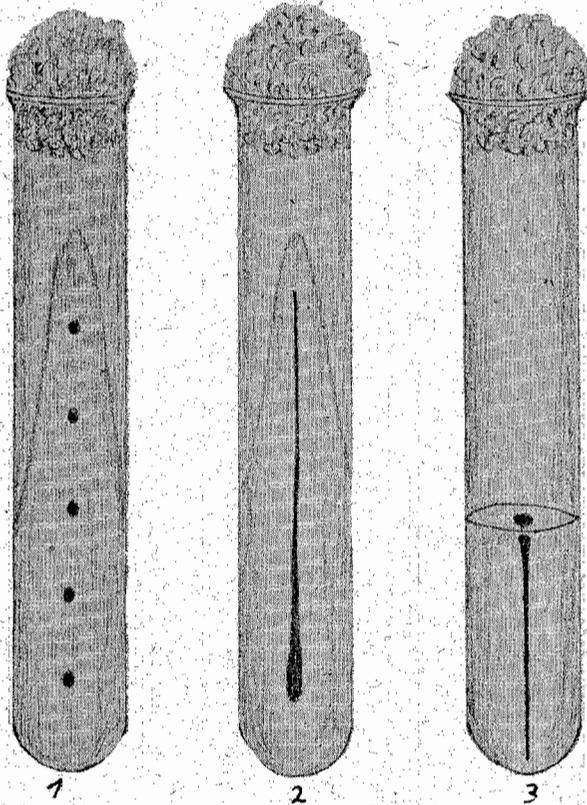


Fig. 7.—Manera de disponer los cultivos en placa (1), estría (2) y picadura (3).

1o.—En él se desarrollan muy bien las levaduras.

2o.—Es muy fácil de preparar y siempre resulta de la misma composición, lo cual no sucede con el mosto de cerveza, que no presenta ninguna ventaja en especial, cuya composición puede va-

riar y que en ciertos sitios es difícil, y hasta imposible conseguir.

3o.—Es un medio relativamente pobre en glúcidos y que, por lo mismo, favorece en ciertos casos la formación de cascas.

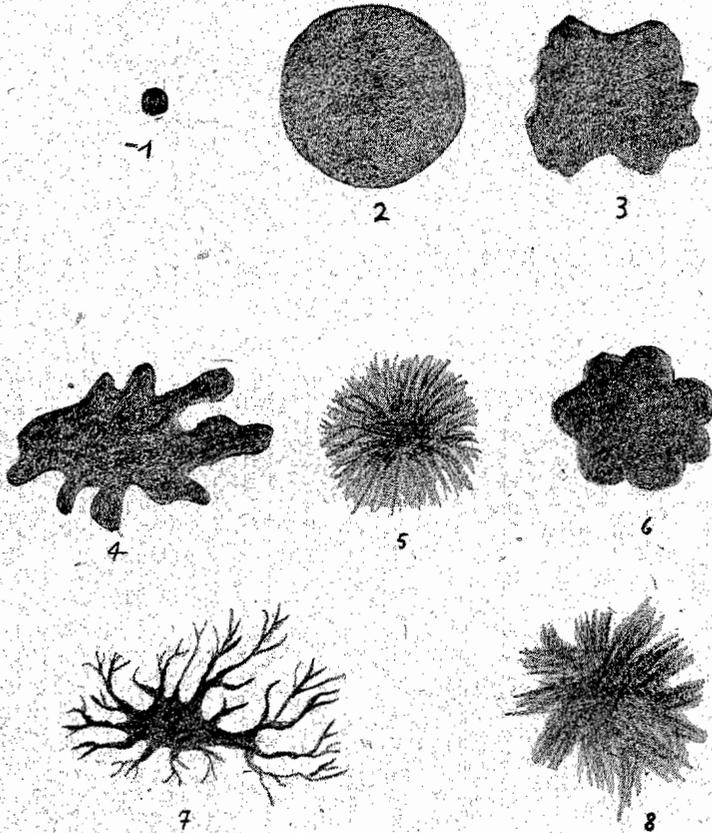


Fig. 8.—Diversas formas que pueden adoptar las colonias: 1.—Puntiforme; 2.—Circular; 3.—Irregular; 4.—Amiboide; 5.—Miceoide; 6.—Rizada; 7.—Rizoide; 8.—Filamentosa (Según Thomas).

El empleo de diversos medios usados en Bacteriología, es completamente inútil, puesto que son más o menos impropios al desarrollo de las levaduras. Se llenan así las descripciones con detalles

inútiles, en general comunes a todas las levaduras, y cuya abundancia opaca los hechos realmente importantes. Algunos autores creen necesario describir el cultivo de una levadura sobre el mayor número posible de medios, pero pocas enseñanzas útiles se sacan de dicha costumbre. Lo que puede ser interesante en ciertos casos,

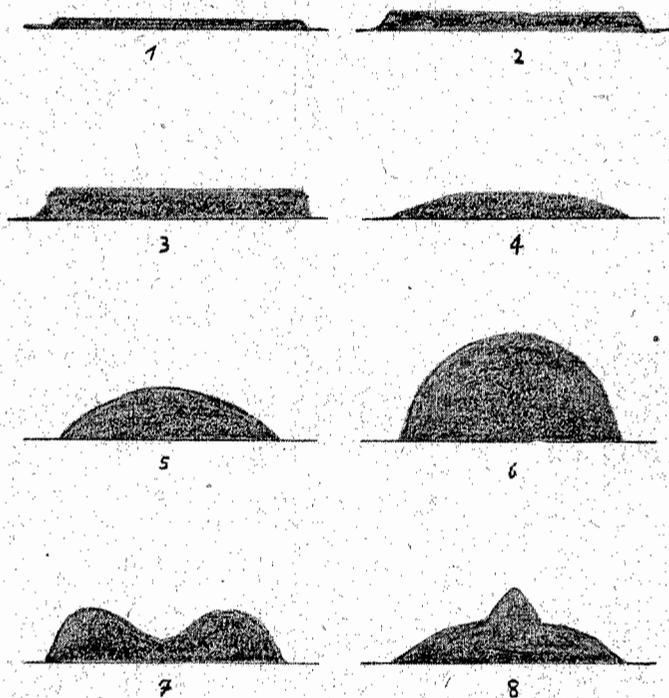


Fig. 9.—Diversos tipos de elevación de las colonias: 1.—Extendida; 2.—Plana; 3.—Levantada; 4.—Convexa; 5 y 6.—Pulvinada; 7.—Umbilicada; 8.—Umbonada. (Según Thomas).

es el empleo de medios especiales, de composición química definida, de los cuales se espera una respuesta clara y precisa, pero entonces no hay necesidad de hacer la descripción del cultivo.

Si nosotros hemos empleado además del mosto gelosado y gelatinado, el aguamiel en las mismas condiciones, se debe a que es el medio natural del cual se han aislado las levaduras que hemos es-

tudiado. Si también, en ciertas ocasiones hemos utilizado gelatina, gelosa, Saboureaud, Gorodkowa, fragmentos de patata y de zanahoria, ha sido sólo con el fin de anotar ciertos caracteres diferenciales con respecto a los medios "standard", pero sin tomarlos en cuenta para la clasificación.

Material.—Tubos de ensaye, y para las colonias gigantes cajas de Petri y cajas de Petroff.

Los cultivos deben hacerse en las siguientes formas: placa, estría, picadura y en cajas para obtener colonias gigantes.

CULTIVO EN PLACA.—Para lograr este tipo de cultivo, se licúa el medio que contiene un tubo y luego se inclina. La inoculación se hace en tres o cuatro puntos equidistantes y a partir de un cultivo joven líquido o sólido. (Fig. 7).

CARACTERES.—Los caracteres que deben anotarse son los siguientes:

Temperatura.—Los cultivos deben colocarse siempre a 25° C., excepción hecha para los medios gelatinados que se pondrán a 18° ó 20° C.; si no se tiene estufa, a la temperatura del laboratorio.

Edad del cultivo.—Los cultivos se observarán por espacio de 30 días, anotando los diversos caracteres que van apareciendo. Nosotros hemos descrito, los caracteres de los cultivos en placa entre los 10 y 15 días; después de este tiempo aparecen pocas variantes que tienen poca importancia.

Forma.—La forma se describe según los siguientes términos: (Fig. 8). (Según Thomas).

- | | |
|--------------------|---|
| Puntiforme: | muy pequeña, pero visible a simple vista; menor de 1 mm., en diámetro. |
| Circular: | regular, arredondada; más de 1 mm., en diámetro. |
| Irregular: | no circular, pero no tan irregular que se confunda con alguna de las formas que se anotan a continuación. |
| Amiboide: | muy irregular; parecida a una amiba. |

- Miceloide:** radiada, semeja un hongo; con ramas radiales más o menos regulares.
- Rizoide:** irregular, ramificada, semejante a una raíz.
- Filamentosa:** irregular, con filamentos entrecruzados.
- Rizada:** ondulada, compuesta de entrantes paralelas.

Aunque hemos anotado todas las formas que pueden adoptar los cultivos de bacterias, en las levaduras sólo se pueden encontrar la puntiforme, circular, irregular, circular, irregular, rizada y si acaso la amiboide.

Superficie.—Se describe con los siguientes términos: (Según Thomas).

- Lisa:** suave, uniforme, sin ningún carácter distintivo.
- Rugosa:** arrugada, plegada, con numerosos y pequeños pliegues.
- Contorneada:** levemente ondulada, como el relieve de un mapa.
- Concéntricamente anillada:** con anillos uno dentro de otro.
- Umbonada:** parecida a un botón, levantada en el centro.
- Papilada:** adornada de pequeñas protuberancias o papilas.
- Granular:** cubierta de gran cantidad de granulaciones pequeñísimas.
- Umbilicada:** deprimida en el centro, como un ombligo.

Elevación de la superficie.—Se describe en los siguientes términos: (Fig. 9). (Según Thomas).

- Extendida:** crecimiento en forma de un velo muy delgado y fino.
- Plana:** delgada, pero no tan delicada como la anterior.
- Levantada:** gruesa, con bordes rectos y verticales.
- Convexa:** como el segmento de un círculo.
- Pulvinada:** más encurvada que la convexa.
- Umbilicada:** deprimida en el centro.
- Umbonada:** convexa, pero levantada en el centro.

Bordes.—Se describen empleando los siguientes términos: (Fig. 10). (Según **Thomas**).

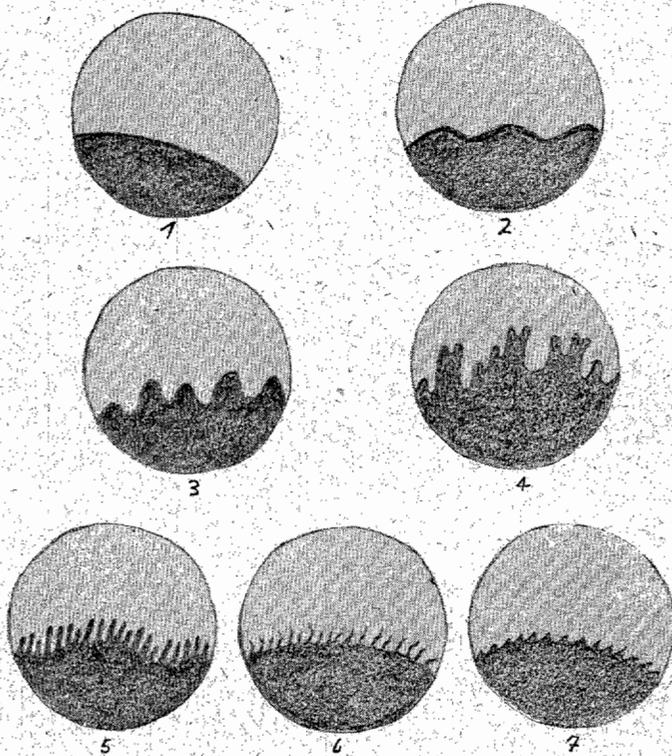


Fig.10.—Diversos tipos de bordes que pueden mostrar las colonias: 1.—Enteros; 2.—Ondulados; 3.—Lobados o lobulados; 4.—Auriculados; 5.—Laciniados o franjeados; 6.—Ciliados; 7.—Erosados. (Según **Thomas**).

Enteros: con márgenes lisos, sin ningún accidente.

Ondulados: con ondas poco profundas regulares o irregulares.

Auriculados: con lóbulos delgados y profundos semejando espigas.

Laciniados o franjeados: con proyecciones muy delgadas semejantes a dedos.

Enrosados: irregularmente dentados, como si estuvieran corroídos.

Ciliados: con salientes radiales semejando al cabello.

Estructura interna.—Aunque en la mayoría de los cultivos de levaduras no se nota ninguna estructura interna, anotamos los términos en que ésta se describe, ya que en ciertos casos pueden utilizarse: (Fig. 11). (Según **Thomas**).

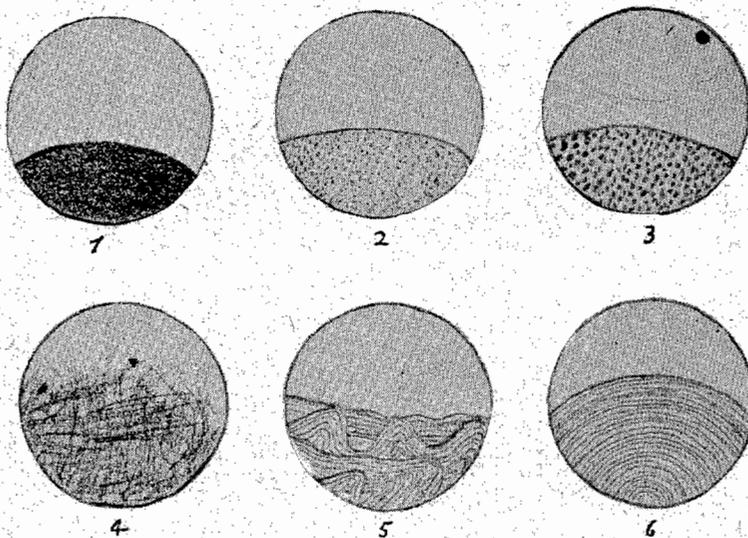


Fig. 11.—Diversos tipos de estructura interna en las colonias: 1.—Amorfa; 2.—Granular fina; 3.—Granular gruesa; 4.—Filamentosa; 5.—Rizada; 6.—Concéntrica. (Según **Thomas**).

Amorfa: no se distingue ninguna diferenciación en la estructura.

Granular fina: formada de granos muy finos.

Granular gruesa: formada por granos grandes.

Filamentosa: compuesta por filamentos irregulares entrecruzados.

Rizada: formada por filamentos paralelos colocados en haces.

Concéntrica: compuesta por filamentos en anillos concéntricos.

Color.—El color, que para otros hongos es un carácter muy variable y secundario, presenta, para las levaduras gran importancia. El color de otros hongos microscópicos varía, más o menos, de blanco a crema, pero jamás son rojos. En cambio las levaduras sí llegan a ser rojas, lo cual se debe a un pigmento carotinoideo. Es tan importante la presencia del pigmento rojo, que todas las levaduras que lo presentan se agrupan en el género **Rhodotorula**.

El color de los cultivos de levaduras puede ser blanco, grisáceo, moreno, salmón, anaranjado, negruzco, rojizo, etc. Para anotar con precisión el color de un cultivo hay que compararlo con una tabla o álbum de colores (nosotros estimamos que la mejor es la tabla de colores de **Ridgway**, que es la que siempre hemos usado).

Caracteres ópticos.—Se describen con los siguientes términos: (Según **Thomas**).

Opaco: la luz no pasa a través de la colonia.

Translúcido: la luz pasa a través del cultivo.

Opalino: la luz pasa levemente dando el aspecto de un ópalo.

Iridiscente: los colores cambian con la luz reflejada.

Consistencia.—La consistencia de las colonias se determina tocando las colonias con un sembrador de platino. Para describirla se emplean los términos siguientes:

Cremosa: de consistencia muy suave.

Viscosa: el cultivo se pega fácilmente al sembrador y se separa del medio.

Butirosa: consistencia parecida a la que muestra la mantequilla.

Membranosa: cultivo delgado, coherente, como una membrana.

Quebradiza: cultivo seco, frágil y fácilmente desmenuzable.

Langeron opina que en las levaduras sólo hay dos tipos de colonias por su consistencia: cremosas o viscosas y membranosas; que todos los cultivos son siempre cremosos y que de éstos derivan los membranosos.

La colonia cremosa pura es aquella de la cual se puede levantar un fragmento sin llevar más que el punto que se ha tocado por el sembrador; además la parte que se ha tomado se emulsiona inmediata y uniformemente en una gota de agua.

En una colonia membranosa, se levantan al tocarla partes vecinas de aquella que ha sido directamente tocada y hasta en ocasiones atraerse todo el cultivo. La parte levantada no se emulsiona sino parcialmente en una gota de agua, pues la mayor parte forma grumos.

Hay colonias que a la vez poseen los dos caracteres citados: su centro es membranoso y se rodea de una aureola cremosa más o menos extensa. Existen otras levaduras que, dando habitualmente cultivos cremosos, pueden, en ciertas condiciones, transformarse en membranosos. Por último hay casos en que el cultivo se disocia en las dos formas.

Brillo.—Se habla respecto al brillo en los siguientes términos: no existe, es poco, regular o intenso. La superficie puede ser brillante y húmeda, como si estuviera recubierta de un barniz, o bien mate y seca, como si estuviera cubierta finamente de talco. Hay ocasiones en que la colonia es mate, pero presenta sitios o puntos brillantes, como si la fina película que parece cubrirla se hubiera destrozado en ciertos lugares.

El carácter de humedad y sequedad es muy importante para la sistemática. Así, todos los cultivos secos presentan siempre un velo típico en los medios líquidos, aunque esto no implica que las colonias húmedas no puedan también producir velo.

La distinción entre colonias brillantes y mates no es absoluta, pues ciertas especies pueden ser mates al principio y luego se tornan brillantes; otras son siempre mates o brillantes, pero hay ocasiones en que estas últimas envejecen, o se seca el medio y se vuelven mates.

CULTIVOS EN ESTRIA.—Para efectuar un cultivo de esta naturaleza se inclina el medio de cultivo dentro del tubo y cuando esté bien solidificado, se hace la siembra deslizando, en línea recta, el sem-

brador que lleva el cultivo por la superficie del medio. (Fig. 7)

Caracteres.—Son los mismos ya anotados para los cultivos en placa: temperatura, edad del cultivo, forma, superficie, elevación, bordes, etc.; los únicos que hay necesidad de observar son los tres primeros que son diferentes a los ya anotados en los cultivos en placa, pues los demás son muy semejantes y no habría caso tomarlos en cuenta; sólo cuando se encuentre una diferencia muy notable se tomará en cuenta.

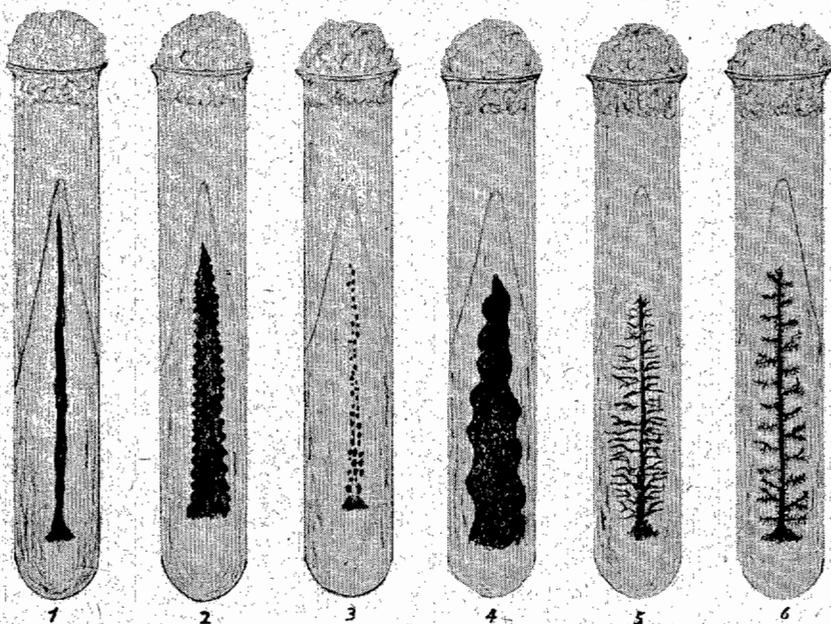


Fig. 12.—Diversos tipos de colonias en estría: 1.—Filiforme; 2.—Equinulada; 3.—Arrosariada; 4.—Extendida; 5.—Rizoide; 6.—Arborescente. (Según Thomas).

Temperatura.—Es conveniente indicar siempre la temperatura con la cual se trabaja, la más apropiada es de 25°C.

Edad del cultivo.—Como puede ser diversa a la empleada en los cultivos en placa, debe anotarse. Los cultivos en estría se observan hasta los 20 ó 30 días.

Forma.—La forma es totalmente distinta a la de los cultivos en placa; por lo mismo, hay necesidad de describirla, lo cual se hace según los términos siguientes: (Fig. 12) (Según Thomas).

- Filiforme:** crecimiento uniforme a lo largo de la línea de inoculación.
- Equinulada:** crecimiento con márgenes dentados o punteados.
- Arrosariada:** colonias separadas a lo largo de la línea de inoculación.
- Extendida:** crecimiento que se extiende varios milímetros de la línea de cultivo.
- Rizoide:** crecimiento irregularmente ramificado semejando una raíz.
- Arborescente:** crecimiento ramificado, semejando un árbol.

CULTIVOS EN PICADURA.—Para efectuar esta clase de cultivos el medio no se inclina en el tubo, sino que se conserva la superficie perpendicular con respecto de la pared del tubo. La siembra se hace introduciendo el sembrador de una manera completamente perpendicular al medio de cultivo. Así quedan las células en un medio cuya proporción de aire está muy reducida.

Caracteres.—Son los mismos de los cultivos anteriores, pero hay que hacer mención de la temperatura, edad del cultivo, caracteres ópticos y forma. A continuación haremos solamente indicaciones sobre la forma, puesto que los demás caracteres ya están discutidos con anterioridad.

Forma.—Para describir la forma de los cultivos en picadura se usan los mismos términos que ya anotamos con respecto a los cultivos en estría: filiforme, equinulada, arrosariada, rizoide, arborescente, exceptuando la extendida en lugar de la cual está la **vellosa:** crecimiento adornado con prolongaciones que se asemejan al pelo (Fig. 13).

COLONIAS GIGANTES.—**Lindner** fué el primero que propuso el desarrollo de las colonias gigantes que se han estudiado mucho por bacteriólogos y micólogos. Se hacen en cajas de Petri o de Petroff en donde hay suficiente espacio para el desarrollo amplio del cul-

tivo. La siembra se hace inoculando el centro del medio de cultivo con un sembrador o poniendo con una pipeta estéril una gota de dilución de levaduras. El desarrollo se deja por lo común a temperatura de laboratorio por un término de uno a dos meses, al cabo del cual se anotan los caracteres. Las colonias gigantes tienen por lo común aspectos muy distintos; sin embargo, en la mayoría de los

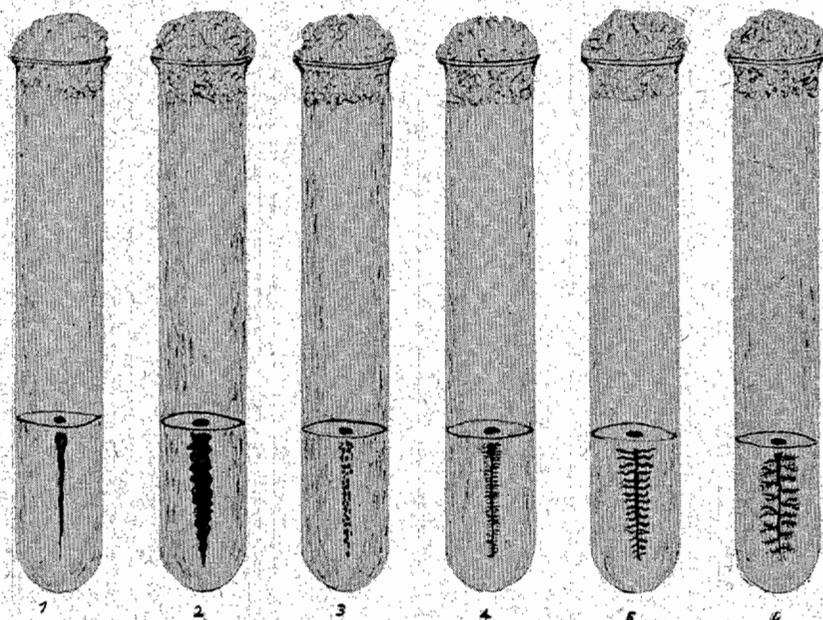


Fig. 13.—Diversos tipos de colonias en picadura. 1.—Filiforme; 2.—Equinulada; 3.—Arrosariada; 4.—Velloso; 5.—Rizoide; 6.—Arborescente. (Según Thomas).

casos, ellas solamente proporcionan caracteres de todo el grupo y no caracteres genéricos ni específicos. Se ha demostrado en diversas ocasiones, que las características de estas colonias varían fácilmente con ligeros cambios en la composición del medio, especialmente con la consistencia del substrato; debido a ésto se debe utilizar siempre un medio "standard".

Langeron y Guerra indican respecto a las colonias gigantes: "En

la época en que no se conocía la filamentación de los hongos levuriformes, ni los medios de hacerla aparecer, se buscaba utilizar los caracteres macroscópicos de colonias desarrolladas lentamente en recipientes de gran superficie.

Es cierto que si se proporciona a una levadura un medio muy abundante sobre una gran superficie convenientemente aerada, ella tendrá en general, tendencia a formar una colonia muy extendida. Esta extensión, proporcional a la superficie utilizable, no tiene en sí ninguna característica, puesto que ella depende de las dimensiones de la caja, o vaso que contiene el medio. Lo único que puede ser característico es el aspecto de la colonia a una edad determinada, cualquiera que sean sus dimensiones. Lo que se debe estudiar, no es la colonia gigante, sino la colonia adulta, la cual se puede obtener fácilmente en un tubo. Las colonias gigantes nos parecen inútiles en la actualidad."

En lo que se refiere a las colonias adultas, siguen diciendo los mismos autores: "Llamamos colonia adulta, a una colonia que ha dejado de crecer, lo cual depende evidentemente de la cantidad de medio que le es ofrecido y de la superficie de que dispone. En cierto momento, se establece un equilibrio entre el hongo y el medio o expensas del cual vive. Este momento es el que hay que escoger para describir la colonia porque después, ella envejece, sus caracteres se pierden y el medio se deseca. La madurez de una colonia es tanto más precoz cuanto que el medio es menos abundante, y en este sentido, se puede decir que hay colonias gigantes microscópicas. La talla de una colonia no tiene nada que ver con sus caracteres macroscópicos, puesto que ella depende sólo de las dimensiones del medio de cultivo. Nuestra experiencia nos ha mostrado que al cabo de un mes, en un tubo de ensaye ordinario, una colonia de hongo levuriforme ha adquirido sus caracteres definitivos".

Nosotros pensamos que los caracteres de las colonias gigantes son muy secundarios para la clasificación, y si en nuestros trabajos siempre los hemos anotado, ha sido solo con el objeto de proporcionar más datos y hacer el estudio más completo. Además, dichos caracteres se han anotado al cabo de los 30 ó 60 días del cultivo, y

los de colonias en placa a los 10 ó 15 días, diferencia de tiempo que permite observar diversos caracteres.

Las características que se toman en cuenta para describir las colonias gigantes, son exactamente las mismas que se anotaron con respecto a los cultivos en placa.

CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS

La determinación de los caracteres microscópicos de las células es de fundamental importancia en la sistemática, pues aunque la mayoría de los géneros y especies de levaduras se parecen en cuanto a su morfología y estructura microscópicas, hay algunos géneros que se pueden distinguir por la forma de sus células, tipo de reproducción, manera de formar los brotes, etc.

MEDIOS DE CULTIVO.—Son los mismos ya recomendados para el estudio de los caracteres macroscópicos; especialmente recomendamos el mosto de cerveza líquido y el mosto de cerveza gelosado; si estos medios no pueden conseguirse o prepararse, entonces el recomendado por **Langeron y Guerra** (medio glucosado pectonado y gelosa glucosada pectonada).

PROCEDIMIENTOS PARA EL EXAMEN MICROSCOPICO.—El más sencillo consiste en tomar pequeña cantidad de cultivo que se va a examinar y repartirlo de manera homogénea dentro de una gota de agua destilada colocada sobre un portaobjetos; luego se cubre con una laminilla y se lleva ante el microscopio. Nosotros aconsejamos mejor usar, en lugar de agua destilada, suero fisiológico, pues la primera es un medio hipotónico y puede deformar, en ocasiones, a las células.

Otra manera de observar las células es por medio del rojo neutro en solución acuosa al 1 p. 10,000; el protoplasma y núcleo no se tiñen, pero sí lo hacen las vacuolas y los granos metacromáticos.

El procedimiento más recomendable es el examen al estado fresco en una gota de lugol. Este reactivo pone en evidencia todos los detalles de la estructura interna, así como la forma y dimensiones de las células. Las preparaciones así obtenidas no pueden ser con-

servadas y son impropias para la fotografía a causa de los movimientos de las células.

Un método que permite obtener fácilmente preparaciones permanentes y excelentes para la microfotografía, es el de la tinta china. Se lleva a cabo de la manera siguiente: sobre una lámina se mezclan una gota de agua destilada, filtrada y esterilizada y otra de tinta china especial para la microfotografía; sobre esta gota así preparada, se emulsiona una pequeña cantidad de cultivo y se hace después un frotis que se pone a secar en una estufa a 37° C. Para el examen ante el microscopio se coloca sobre el frotis aceite de cedro y se cubre con una laminilla. Estas preparaciones se conservan indefinidamente, proporcionan muy buenas fotografías y muestran perfectamente la forma y contorno de las células, cuyas dimensiones son muy poco o nada modificadas. En cambio la estructura interna no se muestra.

Para los datos microscópicos que se van a utilizar en la clasificación, basta el examen con suero fisiológico.

CARACTERES.—Los caracteres microscópicos que muestran las células son muy numerosos, pero solamente algunos de ellos tienen valor sistemático.

Temperatura.—Es conveniente anotar siempre la temperatura en que se desarrollan los cultivos.

Edad del cultivo.—Las células deben observarse por primera vez a las 48 horas después de la siembra; se continúa la observación durante 30 días. Después de este tiempo ya no se observan variaciones, pero si acaso se presentan, hay que anotarlas.

Forma de las células.—Es absolutamente indispensable observar con atención las formas de las células y escogiendo las más características, hacer un esquema o dibujo de ellas.

Las levaduras son típicamente polimorfas, o sea, son capaces de adoptar formas muy variadas y diversas aún dentro de la misma especie y en el mismo cultivo. Esta diversidad de formas depende principalmente del medio en que se cultiven y de la edad del cultivo.

Las diferentes especies de levaduras tienen, en su mayoría, más o menos las mismas formas y por lo mismo no pueden, por este carácter, distinguirse unas de otras.

Las formas típicas que presentan las levaduras y que en algunos casos caracterizan a ciertos géneros y aún a las especies son: esférica, oval, ovoide, elíptica, cilíndrica y apiculada.

Como expresamos anteriormente, hay ciertos casos que en los cultivos se notan formas dominantes de las células, que a veces pueden caracterizar a algunos géneros y especies. La forma esférica es característica del género **Torula**, la oval de la especie **Saccharomyces cerevisiae**, la elíptica de **S. ellipsoideus**, la cilíndrica del género **Mycoderma** y de algunas especies del género **Pichia**, la apiculada que tiene pequeñas prolongaciones en su polos, caracteriza al género **Hansenia** y por último, en **Saccharomyces ludwigi** las células son en forma de tubo o de botella. Es interesante agregar, que ciertas levaduras son capaces de asumir formas anormales, como el caso observado por **Lidner** en **S. bailii** que cuando forma colonias gigantes en gelatina, las células son amiboides.

Agrupamiento.—La mayor parte de las levaduras muestran, ante el microscopio, sus células aisladas unas de otras, pero hay casos en que, al efectuarse la multiplicación, quedan unas células unidas a otras por sus membranas formando cadenas pequeñas o largas. En otras ocasiones constituyen racimos. El agrupamiento no tiene ningún valor sistemático.

Pseudomicelio.—En cultivos viejos, especialmente sobre los velos y en colonias gigantes, las células se pueden alargar y al multiplicarse quedan unidas unas con otras, formando así filamentos bastante alargados, a menudo ramificados, susceptibles de dar lugar a brotes ordinarios y que constituyen lo que se llama pseudomicelio, el cual en algunas levaduras llega a alcanzar gran desarrollo.

El pseudomicelio no se obtiene por supuesto, en todas las levaduras y nunca aparece cuando el desarrollo es débil; sólo aparece en condiciones especiales. Las formaciones miceliales fueron observadas primeramente por **Hansen**, en los velos o películas que cubren

los líquidos fermentables; las colonias están compuestas de largos filamentos que poco a poco proporcionan al crecimiento una apariencia de micelio.

Las investigaciones de **Hansen, Lindner y Will** han mostrado que algunas levaduras producen micelios en gelatina, cuyos elementos quedan sólidamente unidos; sin embargo, las células están separadas por paredes bien marcadas y cada uno es capaz de formar brotes y ascósporas.

El desarrollo del pseudomicelio depende de muchos factores, pero especialmente de la edad del cultivo y del valor nutritivo del medio de cultivo. **Talice** (1930) estudió las condiciones que afectan la formación del pseudomicelio en las **Mycotoruloideae**. Recomienda el uso de la infusión de patata (20 gramos de patatas en un litro de agua). Tres cambios sucesivos en este medio deben ser estudiados, antes de que la levadura sea considerada como incapaz de formar micelio. **Lodder** (1934) usó este método, incubando los cultivos a 25° C. **Rivalier y Seydal** (1932) describen un método para cultivos sobre portaobjetos que también fué empleado por **Lodder**; este consta de: 2 grs. de glucosa, 1 gr. de peptona y 2 grs. de agar en 100 c.c. de agua destilada. **Mastin, Jones, Gao y Lee** (1937) usaron harina de maíz gelosado en cultivos sobre porta-objetos.

Nosotros hemos obtenido formación de pseudomicelios especialmente en cultivos viejos de aguamiel, gelatina, zanahoria y patata. Para observar bien la integración y desarrollo de estas formaciones, aconsejamos el uso de cultivos en gota dentro de cámaras húmedas.

La presencia o ausencia de pseudomicelios y sus caracteres, se toman en cuenta en la determinación sistemática de algunas levaduras, pues llegan a caracterizar a ciertos géneros y especies.

Multiplicación.—Para determinar con toda precisión la multiplicación de las levaduras es indispensable recurrir a los cultivos en cámaras húmedas y observar dichos cultivos constantemente por algunos días.

La multiplicación de las levaduras se efectúa fundamentalmente de tres maneras: brote o gemación, división transversal y esporula-

ción (esta última será objeto de un estudio especial en capítulo aparte).

La gran mayoría de las levaduras se multiplican por brote: el brote aparece como una pequeña prominencia separada de la membrana de la célula madre por un estrecho collar; lentamente crece en tamaño hasta que forma su membrana y se separa de la célula madre; en poco tiempo, este brote, alcanza su desarrollo máximo y a su vez forma brotes.

La gemación o brote puede ser de tres tipos: unipolar, cuando sólo se forma un brote en uno de los polos; bipolar, cuando son dos, uno en cada polo y multipolar o en corona, cuando se forman varios alrededor de la célula. (Fig. 14). Hay ocasiones en que los brotes se separan inmediatamente después de formados, dando lugar a células libres o grupos de dos o tres, pero otras veces no se separan de la célula madre dando lugar a la formación de racimos o de largas cadenas que pueden constituir pseudomicelios.

La división transversal por medio de un tabique, es únicamente característica de las levaduras del género **Schizosaccharomyces**, típicas de los países cálidos. Las células, que son esféricas u ovales, se alargan y cuando han adquirido cierto tamaño, forman un tabique en su parte media (Fig. 14). Luego las células se separan y adquieren su forma normal esférica u oval. A menudo las dos células, antes de separarse efectúan una nueva partición y así se llegan a constituir pequeños filamentos cuyas células se separan a la menor agitación del medio. Hay casos en que las células esféricas no se alargan al dividirse, y al quedar unidas por sus tabiques, sus planos adyacentes no se redondean y así se continúa la división hasta formarse pequeños grupos que semejan sarcinas.

Existe un procedimiento intermedio entre el brote y la división transversal el cual es característico de las especies del género **Saccharomyces** (Fig. 14). En este caso, las células se alargan y emiten en su extremidad una prolongación en forma de tubo; éste se alarga y se transforma en un brote el cual queda unido a la célula por un ancho collar; un poco después se forma un tabique en el sitio del collar que separa a las dos células.

Los caracteres de multiplicación de las células son de fundamental importancia en la determinación sistemática de las levaduras; deben ser anotadas con sumo cuidado y hacer diversos esquemas de los mismos.

Cápsula.—La presencia de cápsulas en las levaduras no tiene ninguna utilidad para la sistemática; además, en pocos géneros se han encontrado y aún en esos casos están por lo común poco

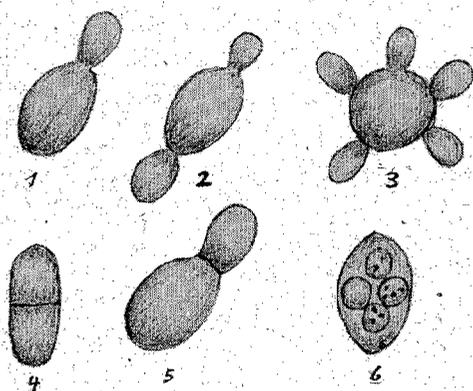


Fig. 14.—Diversas maneras de multiplicación de las levaduras: 1.—Brote unipolar; 2.—Brote bipolar; 3.—Brote multipolar; 4.—División transversal o bipartición; 5.—Brote con formación de tabique; 6.—Esporulación.

desarrolladas y por lo mismo casi invisibles. Solamente en algunas especies del género **Torulopsis** la cápsula llega a tener cierto espesor, pero aún en ellas su presencia no es constante.

Para poner en evidencia la cápsula en las levaduras que la poseen se emplea la fuscina fenicada de **Ziehl** como en el procedimiento de **Kufferath** para la coloración de esporas. (Este procedimiento lo anotamos después al hablar de la esporulación).

Siguiendo dicho procedimiento, después de la coloración, se lava con agua, se coloca lugol un minuto, se diferencia rápidamente con alcohol clorhídrico débil (0.50%), se lava con agua, se seca y

se aplica la tinta china como en la coloración de las esporas. De esta manera las cápsulas quedan incolóras, pero las células toman tinte rojo y el fondo de la preparación negro, lo que hace a las cápsulas bien visibles.

Membrana.—La membrana de las levaduras es gruesa en la mayoría de los casos y se nota con perfecta claridad en observaciones comunes y corrientes; en ciertos casos está provista de pequeñas granulaciones, protuberancias, espinitas, etc. Su composición química no se conoce con exactitud. La mayoría de los autores están de acuerdo que no tiene celulosa típica y le asignan, según cada autor, distintas composiciones: de fungina o metacelulosa de hemi-celulosa, de pectosa, de quitina, etc.

Según algunos investigadores, la membrana de las células presenta siempre dos capas, lo cual se nota especialmente en cultivos viejos. Según **Will y Casagrandi**, si las levaduras son tratadas por 4 a 5% de ácido hidrociorhídrico, se lavan, secan y se tiñen con fuscina, la capa externa toma color violeta y la interna resta incolóra.

Nosotros no hemos hecho coloraciones ni estudios especiales sobre la membrana, puesto que carecen completamente de interés en la clasificación.

Citoplasma.—El citoplasma de las levaduras contiene fundamentalmente un núcleo y numerosas formaciones y secreciones como vacuolas, granos metacromáticos, glucógeno, granos basófilos, glóbulos de grasa y pigmentos. A continuación se anotan los caracteres esenciales de los mismos y su valor sistemático.

Núcleo.—En una época se pensó que las levaduras carecían de núcleo; después se admitió su presencia, pero en forma de "núcleo difuso" o sea, que la cromatina se encontraba repartida en pequeños granos por todo el protoplasma, especialmente en las vacuolas. Posteriormente, **Wagner y Peniston** (1898 y 1910) y otros autores, describieron el llamado "núcleo vacular". Según ellos, el núcleo está formado por una vacuola que contiene numerosas partículas de cromatina y un núcleo de apariencia homogénea situado en la parte externa, pero siempre cerca de la vacuola. Los citados autores pen-

saron que este núcleo sería el paso primitivo en el desarrollo filogenético del núcleo.

Guillermond mostró en 1901 que dicha interpretación era inexacta y que las levaduras presentan un núcleo tipo con su estructura bien diferenciada y en el que se distinguen: membrana nuclear, jugo nuclear, nucleolo y una red cromática más o menos visible según las especies.

El núcleo es relativamente grande en comparación con la célula (cerca de 1 micra en diámetro) y ocupa una posición variable, lo que depende de la forma de la célula y de su estado de desarrollo. Cualquiera que sea su posición, siempre está relacionado con la vacuola que encierra granos metacromáticos. Esto se explica por el hecho de que el núcleo desempeña un papel en la nutrición y secreción y la vacuola es el sitio de una intensa secreción.

Nosotros hemos logrado tinciones perfectas del núcleo con Hematoxilina o con Haemalum-eosina. Los caracteres del núcleo tales como forma, dimensión, posición y estructura, no se emplean para la clasificación, y por lo mismo, se puede prescindir en lo absoluto de ellos.

Vacuolas.—En la gran mayoría de las células jóvenes de levaduras, se observa una vacuola en el citoplasma, la cual contiene granulaciones muy diversas. En células cilíndricas y alargadas se llegan a notar dos vacuolas colocadas en ambas extremidades de las células y las cuales quedan separadas por un puente protoplásmico muy denso en el cual se coloca el núcleo. En el curso del desarrollo, pueden aparecer otras vacuolas junto a las primeras, que por lo común incluyen glucógeno, y que proporcionan a las células una apariencia alveolar. La forma de las vacuolas es circular, oval, elíptica, alargada, etc., y se distinguen fácilmente "in vivo" porque su contenido se nota más claro y transparente que el citoplasma. Si hay duda en la distinción, se tiñe con rojo neutro al 1 p. 10,000 que colora al jugo celular y no al protoplasma.

Los caracteres de las vacuolas tales como su presencia o ausencia, forma, número, tamaño, estructura, contenido, etc., se pueden

observar y anotar, pero sólo como datos muy secundarios, ya que en la determinación sistemática son completamente inútiles y hasta se puede prescindir de ellos.

Gránulos metacromáticos.—Estudiados primeramente por **Guillemond** en 1901, constituyen los elementos más importantes encontrados en las levaduras y parece que desempeñan un papel muy significativo en la vida celular. Se encuentran especialmente en las vacuolas y en el protoplasma que las rodea. Son perfectamente visibles en células vivas en donde aparecen como partículas muy refringentes que, cuando se encuentran en las vacuolas están animados de movimiento browniano. Se pueden teñir "in vivo" con rojo neutro, azul de metileno y azul de toluidina. Con hematóxilina o hematina, previa fijación en alcohol se coloran en rojo vivo; con anilinas azules o violetas toman tintes que varían del rojo al violeta.

Según las investigaciones de **Dangeard** los granos metacromáticos se originan por la condensación de la substancia llamada metacromatina o volutina, que normalmente existe en solución coloidal en el protoplasma y sobre todo en el jugo celular.

Respecto a la composición química de estos gránulos, no se conoce con exactitud, pero la mayoría de los autores están de acuerdo en que están formados de una combinación de ácidos nucleicos y por lo mismo, muy ricos en fósforo.

Hannerberg asienta que los gránulos metacromáticos están relacionados con la fermentación. Según este autor, durante el período de actividad fermentativa es cuando los granos son más abundantes; la adición de fosfatos, que hace más intensa la fermentación, aumenta la proporción de metacromatina. El citado investigador, llega hasta pensar, que la metacromatina es la zimasa misma.

Seguramente la opinión más acertada es la de **Guillemond**, el cual indica que los gránulos metacromáticos son substancias de reservas. Durante los períodos de gran actividad celular, ellos son muy abundantes, y disminuyen, desapareciendo finalmente, en los cultivos viejos; en células que están en inanición desaparecen rápidamente.

Glucógeno.—Fue observado por primera vez en los hongos por **Errera**, en donde llega a ser muy abundante; se reconoce por el color moreno que adquiere cuando se tiñe con yodo en yoduro de potasio. El glucógeno existe en casi todas las levaduras; sin embargo, ciertas especies no lo contienen en ningún momento de su desarrollo, lo cual tal vez se debe a que se usa tan pronto como se forma. El glucógeno aparece en las células desde el principio de la fermentación y a las 48 horas es muy abundante; luego disminuye gradualmente y desaparece completamente hacia la terminación de la fermentación. Durante la esporulación se acumula en gran cantidad en las ascas y es absorbido por las ascosporas durante su madurez. El glucógeno se acumula, en su mayor parte, en vacuolas distintas a aquellas que contienen los gránulos metacromáticos.

Gránulos basófilos.—Estos gránulos son muy abundantes en las células a las 12 ó 24 horas de cultivo; no son visibles "in vivo" y se tiñen especialmente con hematoxilina, que les proporciona un color negro muy intenso poco estable, pues pronto se decoloran. Tienen formas y dimensiones diversas y son probablemente de naturaleza albuminoidea. Probablemente son materiales de reserva, pues son muy numerosos en el momento de la esporulación y contribuyen a la formación de las ascosporas.

Glóbulos de grasa.—Todas las levaduras presentan, cuando están jóvenes o adultas, glóbulos de grasa poco o muy numerosos, pequeños o grandes. Son perfectamente visibles en células vivas en donde muestran un aspecto homogéneo y brillante. Se coloran con el ácido ósmico, el Sudán III y la tintura de chile mulato. Se disuelven y desaparecen con alcohol caliente y sobre todo con éter. Son muy abundantes en las levaduras industriales y aparecen especialmente durante la esporulación; son productos de reserva.

Tanto los granos metacromáticos como los basófilos y los glóbulos de grasa, carecen de utilidad en la clasificación de las levaduras y, por lo mismo, en esta clase de trabajos es inútil su estudio, del cual se puede prescindir por completo.

Pigmentos.—**Lodder** (1934) en su monografía sobre las levadu-

ras anascosporógenas, separó las especies con pigmentos carotinoideos en una familia: las **Rhodotorulaceae**. Para la determinación de estos pigmentos siguió el método propuesto por **Molish**. Se coloca primero una cantidad muy abundante de levadura en un tubo que contenga 2 c.c., de una solución al 20% de potasa que se ha hecho en alcohol al 40%; se coloca en la oscuridad en donde se deja varios días. Luego se remueve el sedimento con una pipeta y se examina al microscopio buscando pigmentos rojos, anaranjados y amarillos, los cuales, si existen, se notan en forma de cristales. **Navak y McClung** (1940) encontraron gran dificultad en seguir este método e indican que las levaduras deben tenerse en el tubo por lo menos seis semanas para dar resultados precisos.

Los pigmentos carotinoideos aparecen pronto en los cultivos y son usualmente tan visibles, que son reconocidos por una simple inspección del tubo.

El pigmento rojo de hierro formado por **Torulopsis pulcherrima** y de otras especies no debe confundirse con los pigmentos carotinoideos. Es más bien castaño y no rosa, coral o salmón como en las **Rhodotorulaceae**; usualmente se difunde en el medio y a menudo falta el color en las células, las cuales quedan incoloras. Además, este pigmento no se desarrolla en medios sintéticos libres de hierro.

Por nuestra parte, hemos tenido oportunidad de aislar tres especies de levaduras de pigmento rojo: dos de las escamas de la piel humana y una del aguamiel. Esta última la estamos estudiando por el momento y, aunque estamos seguros de que pertenece al género **Rhodotorula**, no determinamos aún la especie. Sin embargo, es interesante indicar que, siguiendo el método de **Molisch**, logramos observar los cristales del pigmento ante el microscopio.

La presencia de pigmentos, como los que acabamos de citar, sí debe estudiarse con gran cuidado, pues llega a caracterizar a toda una familia de levaduras.

ESPORULACION

La presencia o ausencia de ascosporas, su modo de formación, número, dimensiones, forma y estructura, son datos de suma impor-

tancia que jamás deben pasarse por alto y determinarlos con gran precisión; pues van a servir de manera fundamental en la clasificación de una levadura. Es tan importante la presencia o ausencia de esporas que los autores de las mejoras y más completas monografías que se han hecho sobre las levaduras, **Stelling-Dekker** y **Lodder**, han separado estos microorganismos en dos grandes grupos: **levaduras ascosporógenas** y **levaduras anascosporógenas**, cuyas monografías se han publicado por separado.

Las ascosporas fueron observadas por primera vez por **Schwann** en 1839 y descritas por **Syenes**. Fueron tomadas por algunos autores como el resultado de un enquistamiento. **Brefeld** consideró a las ascas como esporangios o quistes. **Rees**, **Bary** y **Hansen** semejaron el esporangio de las levaduras al asca de los ascomicetos y comprendieron las levaduras como un grupo de los hongos.

Las ascosporas se forman dentro de las células ordinarias de los cultivos y que reciben entonces el nombre de ascas, las cuales conservan por lo común la forma y dimensiones anteriores, y sólo se exceptúa el caso en que hay una previa copulación para la formación de las esporas.

Por lo común las ascas derivan de células que han cesado de producir brotes, aunque a menudo no sucede así, y se notan por lo mismo, ascas con brote y esporas al mismo tiempo, no habiendo por lo mismo un límite preciso entre el brote y la esporulación.

El número de ascosporas en las levaduras es por lo común de 2 a 4; sin embargo hay especies en que su número es mayor, llegando hasta 12 y 16. Hay especies en las cuales el número es constante, pero en otras pueden variar desde 1 a 5 en los mismos cultivos. Por dimensiones tienen en la mayoría de 1.5 a 3 micras, pero pueden existir más pequeñas que apenas son visibles, y más grandes, hasta de 5 micras. En cuanto a su forma, son esencialmente esféricas y ovales, aunque existen algunas con formas muy típicas y que en la mayoría de los casos caracterizan a ciertos géneros y especies: hemiesféricas, con la parte plana provista de reborde saliente semejando un sombrero, elípticas y con un anillo en su parte media, triangulares, reniformes, esféricas con protuberancias rígidas en su mem-

brana, en limón, fusiformes, en aguja y alargadas provistas de un cilio. (Fig. 15).

La mayoría de las levaduras forman las ascosporas directamente en el asca, pero en otras a la formación del asca precede una copulación de dos células. Esta copulación puede hacerse entre dos células semejantes y se llama **isogamia** o puede ser entre dos células de tamaño diferente siendo entonces **heterogamia**. Existen levaduras con los dos tipos de reproducción al mismo tiempo, y aún grados intermedios. **Zygosaccharomyces ochoterenai**, estudiada y cla-

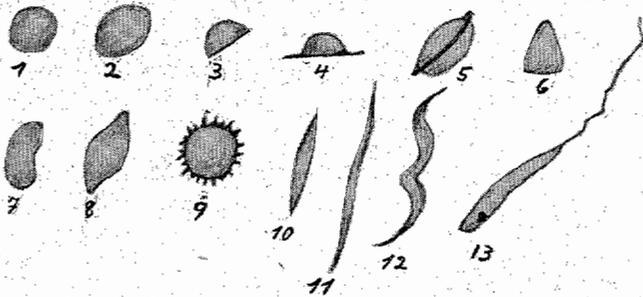


Fig. 15.—Diversas formas que pueden adoptar las esporas de las levaduras: 1.—Circular; 2.—Oval; 3.—Hemiesférica; 4.—En sombrero; 5.—Elíptica con un reborde central; 6.—Triangular; 7.—Reniforme; 8.—Apiculada; 9.—Circular con membrana verrugosa; 10.—Fusiforme; 11.—En aguja; 12.—Fusiforme ondulada; 13.—Alargada con cilio.

sificada por nosotros, es un caso muy interesante de éstos, y que es, probablemente, uno de los pocos que se conocen entre las levaduras.

No nos es posible, en este trabajo tan corto, revisar todo el proceso de la sexualidad de las levaduras que es muy largo y complicado; para ello, hay que buscar los trabajos especiales que tratan el tema y entre los cuales están especialmente los de **Guillermund**.

La manera de formación de las ascosporas debe observarse con toda precisión y claridad, para lo cual el único camino que existe es recurrir a los cultivos en cámaras húmedas y usando medios especiales. Los caracteres de las mismas se pueden, a veces, notar "in

vivo", pero en otras ocasiones hay necesidad de usar coloraciones especiales. El tiempo de observación debe ser muy prolongado, durante dos meses como mínimo y aún más, pues el tiempo de aparición de las ascas es muy variable. Durante el curso de las observaciones, la dificultad estriba en reconocer las ascas con certitud así como sus esporas, lo cual no es fácil, sobre todo cuando estas son muy pequeñas. Los errores cometidos a este respecto son muy numerosos y es frecuente tomar por ascosporas, glóbulos de grasa y aún vacuolas.

Las basidiosporas de las **Sporobolomycetaceae**, se distinguen inmediatamente porque aparecen en la superficie de los cultivos formando una capa pulverulenta y, como por un mecanismo especial son proyectadas a distancia, cuando una colonia está en una caja de Petri, ellas se van a posar sobre la tapa de ésta, en donde forman una mancha blanquizca que reproduce la imagen de la colonia y que se denomina "colonia espejo". De la "colonia espejo" se puede obtener una preparación pura de esporas para su examen microscópico.

En las **Endomycetaceae**, las esporas pueden aparecer en medios ordinarios, especialmente en las muestras aisladas recientemente de la naturaleza; pero por lo común no sucede así y hay necesidad de recurrir, para su producción, a métodos y medios especiales. Una levadura no debe ser considerada como anascosporógena, hasta que se hayan hecho todas las pruebas conocidas para la producción de esporas.

Uno de los métodos "standard" para la producción de esporas, usado desde la época de **Hansen** es el de los discos de yeso. (Fig. 16). Se coloca un disco de yeso en una caja de Petri y se pone en el fondo de ésta un poco de agua. Se esteriliza todo a 120°, después se coloca una pequeña cantidad de levadura, tomada de un cultivo joven, sobre el disco de yeso y todo se pone a 25°. Las esporas pueden aparecer entre un tiempo que varía de 24 horas a 10 días. En la actualidad este método ha sido a menudo reemplazado por el uso del **Goródkowa gelosado**: agua destilada 100 c.c.; glucosa, 0.25 grs.; cloruro de sodio, 0.5 grs.; caldo de carne, 1 c.c., y gelo-

sa 1 a 1.5 grs. Este medio es muy poco nutritivo y puede proporcionar la esporulación.

Stelling-Dekker (1931), revisando la literatura a este respecto, llega a la conclusión de que no hay ningún procedimiento verdaderamente adecuado y que por lo mismo hay que usar varios. En adición a los métodos ya citados, ella utilizó fragmentos de patata y zanahoria, jugo de uva líquido y gelosado y en las especies del género **Debaromyces**, salchichas estériles.

Para el mismo objeto se indica el medio de **Kufferath**, que se prepara en la siguiente forma: malta hidrolizada con ácido sulfúrico se neutraliza con carbonato de calcio y se le agrega gelosa; para que el medio sea alcalino se agrega sosa. **McClung** y **Mrak** in-

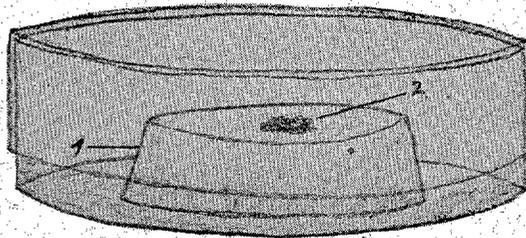


Fig. 16.—Caja de Petri con un disco de yeso en el cual se coloca la levadura para esporular. 1.—Disco de yeso; 2.—Levadura.

dican el empleo de fragmentos de pepinos cuando han fallado otros medios. **Henrici** aconseja el medio de **McClung** gelosado (infusión de zanahoria con sulfato de calcio), con el cual obtuvo bastante éxito. **Niehans** ha usado extracto de tierra gelatinada: 1,000 a 1,500 gramos de tierra de jardín con 1,000 c.c., de agua, se filtra y se agregan 15% de gelatina.

Ochmann, en 1929, hizo un estudio con diferentes especies de levaduras de la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo, sobre la formación de esporas. La formación de éstas fué obtenida transplantando las levaduras del medio estudiado a bloques de madera de haya húmedos y estériles. El medio

básico es el siguiente: 100 c.c. de agua destilada; dextrosa, 10 grs.; fosfato de potasio ácido, 0.5 grs.; sulfato de magnesio, 0.25 grs.; a este medio se agregaron 10 compuestos nitrogenados distintos y como medio de control se usó el mosto de cerveza. El autor encontró que en cada especie la formación de esporas es estimulada por determinados compuestos, los cuales a su vez, no permitían la formación de esporas en otras especies. Tales nitratos, por ejemplo, favorecen la formación de esporas en ciertas especies, pero no así para otras y viceversa.

De todo lo anterior se saca como consecuencia, las dificultades que presentaría una clasificación de levaduras que se basara en la formación de esporas. Algunos investigadores piensan que probablemente todas las levaduras producen esporas, y lo que sucede con muchas levaduras consideradas como anascosporógenas, es que todavía no se han encontrado las condiciones ambientales necesarias para la esporulación. **Windisch** (1939), indicó la formación de esporas en **Torulopsis pulcherrima** (considerada como anascosporógena) solamente después de que los cultivos se habían secado considerablemente. **Fuchs** en 1935 encontró cultivos viejos de laboratorio que habían perdido la facultad de formar esporas, volvían a integrarlas, haciendo siembras alternadas y sucesivas en mosto gelosado y discos de yeso; al cabo de varios pasos en dichos medios, la formación de esporas se inició de nuevo.

La tinción de las esporas se hace según varios métodos, siendo los principales los siguientes:

1o.—**Examen directo en lugol doble:** esta coloración muestra con toda claridad las ascosporas, pero solamente para una persona con práctica.

2o.—**Henrici** recomienda: solución de ácido crómico al 5%, cinco minutos; carbofucsina de Ziehl en evaporación durante 5 minutos; decoloración por 2 minutos en 1% de ácido sulfúrico acuoso y contrastar con azul de metileno de Loeffler un minuto. Las esporas toman un tinte rojo, y las ascas y células vegetativas de azul.

3o.—**Ochmann** tiñó las ascosporas de varias especies con azul

de metileno seguido de moreno de Bismark: las esporas se notan azul negruzcas y las células rojas.

4o.—Coloración electiva por el método de **Kufferath**.—Este autor insiste en que la tinción diferencial es el único criterio que se debe tomar para distinguir las esporas. Su método se basa en una propiedad muy notable de la membrana de las ascosporas maduras: esta membrana es una parte acidófila y por otra parte ácido—y alcohol resistente. Los resultados de este método son muy claros y precisos, puesto que las únicas que se tiñen son las esporas en rojo vivo sobre el fondo gris de la preparación, lo que permite distinguir las fácilmente, aún cuando sean poco numerosas.

El método de **Kufferath**, modificado un poco por **Langeron** y **Guerre** es el siguiente:

a.—Emulsionar sobre un portaobjetos, en una gota de agua destilada, filtrada y estéril, una pequeña cantidad de cultivo.

b.—Calentar la lámina sobre una platina caliente y al mismo tiempo se extiende la emulsión con ayuda de una pipeta o de un alambre de platino. Esta operación se continúa durante todo el tiempo que la gota tarda en secarse, para así obtener una dispersión lo más uniforme posible de las células de la levadura, pues si quedan grumos espesos, impiden distinguir bien las ascosporas. El calentamiento, que puede llegar hasta la ebullición, no altera en nada la forma y el aspecto de las ascas y ascosporas, que en esta operación han sido fijadas.

c.—Una vez que la lámina está seca y fijada, se colora por la fuscina fenicada de Ziehl, calentando hasta la ebullición, pero sin dejar que la preparación se desequie. Se deja enfriar, se lava con agua y se limpian los bordes de la preparación.

d.—Diferenciar con alcohol clorhídrico al 15% ó en ácido láctico al 2% y detener la acción del ácido con un lavado de abundante agua. La diferenciación dura por lo común algunos segundos, pero el tiempo varía según la especie estudiada y con el grado de madurez de las esporas.

e.—Coloración del fondo, durante 30 segundos, por una solución de azul de Nilo a 1%.

f.—Lavar con agua destilada.

g.—Vaciar el agua sin secar completamente.

h.—Estando la lámina aún húmeda, extender sobre la preparación, con una pipeta, una gota de tinta china.

i.—Secar y montar en bálsamo.

Terminada la coloración, las ascosporas maduras se tiñen en rojo y las ascas aparecen en blanco sobre fondo negro: se podrá ver su forma y los fenómenos de copulación si existen; las células vegetativas son coloreadas en verde por el azul de Nilo. El empleo de este colorante, no es indispensable, pero es el único que se puede emplear para las células vegetativas, porque todos los otros azules son decolorados por la tinta china.

En el género *Debaromyces* un carácter importante es el aspecto verrugoso de la membrana de las esporas maduras. Este aspecto no siempre se presenta, y puede haber dificultad en observarlo, especialmente porque la única espora llena completamente el asca, y la membrana de la espora se adhiere íntimamente a la superficie interna de la pared del asca. *Mrak* y *Bonar* indican que si las levaduras se cultivan en medio de *Gorodkowa* gelosado y son incubadas a 16° C. o menos, las ascas son más grandes en relación con el tamaño de las ascosporas y la membrana verrugosa puede ser observada.

En nuestros estudios, para la obtención de las ascosporas, hemos obtenido éxito usando los medios de *Gorodkowa*, patata, zanahoria y discos de yeso. Sin embargo, podemos asegurar, que cuando una levadura forma esporas, éstas aparecen casi siempre en los cultivos viejos de los medios ordinarios y, por lo mismo, no hay necesidad de recurrir a los medios especiales citados. Respecto a la coloración, los mejores resultados los hemos obtenido con los métodos de *Kufferath* y de *Henrici*.

GERMINACION DE LAS ASCOSPORAS.—Es absolutamente indispensable determinar este proceso en cámaras húmedas, pues la

observación debe ser constante y empleando para ello cualquier medio ordinario bastante nutritivo como el mosto de cerveza; el medio debe estar perfectamente límpido y transparente, pues de otra manera se impide una buena observación.

En la mayoría de las levaduras, sobre todo en las industriales, la germinación de las ascosporas se hace de una manera muy sencilla: las ascosporas se hinchan, sus membranas se ponen en contacto tan íntimo que se confunden y ejercen presión unas sobre otras, de manera que se obtiene la impresión de que el asca está tabicada. En este momento la membrana del asca se adelgaza y se rompe; cada ascospora adquiere entonces la forma y dimensiones de una célula vegetativa e inicia su multiplicación ya sea por brotes o por división transversal según el género. Los brotes aparecen, por lo común, después de la ruptura de la pared del asca, pero pueden iniciar su formación aún estando dentro. Lo mismo puede suceder con las levaduras que se multiplican por división transversal: ésta puede empezar antes de que se escapen las esporas del asca.

En ciertas especies, que después de los estudios cada vez más especializados de los investigadores, van siendo más numerosas, la germinación de las ascosporas es precedida por una copulación entre ellas.

En **Saccharomyces carbajali**, levadura aislada del aguamiel y del pulque, nosotros tuvimos la oportunidad de observar, ante cámaras húmedas, la copulación de las ascosporas antes de germinar: todo el proceso lo describimos detalladamente en este mismo trabajo a propósito del estudio que se incluye de la citada especie. **Gulliermond**, en 1917, observó el mismo fenómeno en la misma especie.

En el género **Saccharomycodes**, cuyas células forman cuatro ascosporas, éstas por lo común, se conjugan dos a dos dentro del asca y por medio de un canal; en este canal se forma el huevo, que lanza después en tubo de germinación que rompe la membrana del asca y forma los primeros brotes. Debido a la intensa humedad o sequedad del medio, hay veces que las ascosporas del citado género pierden la facultad de fusionarse; entonces cada ascospora desarrolla un tubo que constituye un filamento formado por células

superpuestas y capaces de ramificarse; se presenta el aspecto de un micelio del cual se desprenden las células vegetativas.

Entre los tipos de germinación de ascosporas citados, se encuentran una serie de modalidades intermedias, bien descritas en los trabajos que con especialidad a ello se refieren y que en muchas ocasiones caracterizan a ciertos géneros y especies.

La manera de germinación de las ascosporas, es un dato muy interesante que se debe tomar en cuenta para la determinación de los caracteres específicos.

TEMPERATURAS LIMITES Y OPTIMA PARA LA REPRODUCCION, ESPORULACION Y FORMACION DE VELOS

En una época no muy lejana, en aquella que imperaban solamente los métodos de **Hansen, Lindner** y **Guilliermond** para el estudio de las levaduras, se dió gran importancia, en la determinación sistemática de las especies, a las temperaturas límites (máxima y mínima) y óptima sobre la reproducción, esporulación y formación de velos. En la actualidad, y después de los estudios tan numerosos y precisos que sobre las levaduras han publicado diversos autores como **Stelling-Dekker, Lodder, Langeron, Guerra, Castellani, Ciferri, Dodge, Henrici** y muchos otros más, se ha llegado a la conclusión de que es un error muy grave tomar en cuenta estos datos para la clasificación, que son completamente secundarios e inútiles, de los cuales se puede prescindir en lo absoluto y que solamente quedan como algo histórico. En las monografías que los citados autores han publicado sobre las levaduras, no se encuentra ningún dato sobre estos caracteres.

Nosotros seguimos las indicaciones de los mencionados investigadores, pero opinamos que cuando se estudia una levadura industrial, si es de gran interés conocer estas temperaturas, especialmente la que se refiere a la reproducción, aunque los datos obtenidos no se utilicen en la clasificación. En una levadura industrial, su actividad fermentativa está íntimamente ligada con la multiplicación de las células, y ésta es muy variable según las diversas temperaturas. Si se trata de levaduras no industriales, pensamos que

es inútil determinar los caracteres de las temperaturas.

REPRODUCCION.—Para determinar las temperaturas mínima, óptima y máxima de la multiplicación de una levadura, se usan cultivos en placa dentro de tubos de mosto gelosado u otro medio "standard", los que se colocan en estufas a temperaturas diversas. La dificultad principal estriba en que, en los laboratorios modestos, no se tienen varias estufas que proporcionen temperaturas exactas, pues en la actualidad son costosas. Sin embargo, se puede obviar esta dificultad empleando para ello botellas termos; este procedimiento es el que se ha usado en nuestros trabajos y nos fué dado a conocer debido a la experiencia del maestro y doctor **Isaac Ochoterena**. En las botellas termos se coloca agua a la temperatura deseada y luego se introducen los tubos de cultivo, los cuales, para evitar la excesiva humedad que puede alterar los resultados, se cierran con parafina y papel estaño impermeable. Como la temperatura del agua de los termos siempre tiende a modificarse según la del medio ambiente, es necesario revisarla por lo menos cada 5 ó 6 horas y ponerla de nuevo a la temperatura deseada.

Para determinar la temperatura mínima, nosotros usamos siempre seis termos con agua a las temperaturas de 0°, 2°, 4°, 6°, 8°, 10°; se colocan los tubos ya inoculados en las condiciones indicadas y se observan los tubos todos los días para anotar la aparición de las colonias macroscópicas; la experiencia se continúa por 10 ó 15 días por lo mínimo. Si el cultivo colocado a 4° dió crecimiento y no así el de 2°, se llega a la conclusión de que la temperatura mínima de reproducción es de 4°; si el cultivo se obtuvo en todos los tubos, lo que es muy raro, hay que hacer entonces experiencias con temperaturas de —2°, —4°, —6°, etc.; si no se obtiene crecimiento en ningún tubo, lo que es más raro aún; hay que operar con temperaturas mayores.

La temperatura máxima se obtiene de manera semejante a la anterior experimentando, al principio, con temperaturas de 34°, 36°, 38°, 40°, 42°, y 44°; si no se obtiene crecimiento en ninguna temperatura, se opera con grados inferiores, y si se obtiene en todas, se trabaja con grados superiores.

Para la temperatura óptima se colocan tubos a 22°, 24°, 26°, 28°, 30° y 32°, y a las 24 horas se observan todos los cultivos; aquél de todos que tenga un crecimiento más intenso, nos indicará que se ha desarrollado a la temperatura óptima de la multiplicación. Si el crecimiento más intenso lo da la temperatura de 22°, se hacen entonces experiencias con temperaturas inferiores; lo contrario se hará si el desarrollo más intenso lo proporciona el tubo de 32°.

ESPORULACION Y FORMACION DE VELOS. — Para obtener las temperaturas mínima, máxima y óptima de estos caracteres que algunas levaduras presentan, se procede exactamente de la misma manera que en el caso anterior. Las temperaturas límites (máxima y mínima) serán aquellas arriba y abajo de las cuales, respectivamente, ya no formen esporas ni velos; la óptima será aquella en que con más rapidez se obtengan las esporas y los velos.

CARACTERES BIOQUIMICOS DE LAS LEVADURAS

Son los caracteres fundamentales en que se basa la determinación del género y especie a que pertenece una levadura, y por lo mismo, ningún estudio sistemático puede hacerse, si no se obtienen con absoluta precisión. Los caracteres bioquímicos que se estudian son: poder fermentativo, asimilación de los azúcares, substancias nitrogenadas y alcohol etílico, así como la coagulación de la leche y la licuefacción de la gelatina.

FERMENTACIONES.—Como el poder fermentativo de las levaduras se basa en una de sus propiedades biológicas más importantes, su empleo se utiliza desde hace mucho tiempo para la clasificación de las mismas, pues se admite que dicho poder fermentativo, es suficientemente estable y constante. Sin embargo, el valor de las fermentaciones depende del rigor, precisión y sensibilidad de las técnicas empleadas.

A continuación anotamos los principales métodos conocidos para poner en evidencia la fermentación de una levadura.

1.—**Método de las pequeñas fermentaciones de Lindner.** — Se llena una cámara húmeda de Boettcher de caldo de levadura o de agua peptonada estériles, se agregan algunos cristales del azúcar

con que se va a experimentar, se coloca pequeña cantidad de levadura y se cierra la cámara con una laminilla estéril la que se fija sobre el anillo con vaselina esterilizada. Es indispensable que la cámara húmeda quede completamente ocupada por el líquido sin ninguna burbuja de aire. (Fig. 17). La cámara húmeda se coloca a 25° C., y se examina a las 24 horas; si hay fermentación, el líquido se cubre de burbujas de anhídrido carbónico, las cuales son en cantidad más o menos considerable según que la fermentación haya sido más o menos activa. Cuando la fermentación ha sido muy intensa, el gas acumulado en gran cantidad, levanta la laminilla y

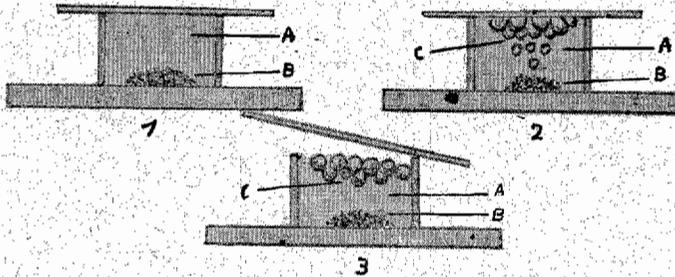


Fig. 17.—Método de las fermentaciones con la cámara húmeda de Boettcher: 1.—Manera de disponer la cámara con el medio de cultivo y la levadura; 2.—Burbujas de gas obtenidas durante la fermentación; 3.—Las burbujas levantan el cubreobjeto. A.—Medio de cultivo; B.—Levaduras; C.—Burbujas.

el líquido se derrama al exterior. Si no hay fermentación, el líquido no presenta burbujas. Se puede substituir perfectamente la cámara de Boettcher con los portaobjetos escavados y se obtiene el mismo resultado.

Stelling-Dekker, Langeron y Guerra. hacen críticas muy severas a este método, el cual según ellos debe desterrarse de la ciencia porque da lugar a muchos errores y contaminaciones. Agregan, además, que se deben poner en duda todos los resultados que se hayan obtenido por este procedimiento y que por lo mismo deben quedar sin ningún valor los estudios de las especies que se hayan realizado por esta técnica.

Por nuestra parte asentaremos que no estamos de acuerdo con todo lo expresado por los citados autores y creemos, que es el único método que se puede seguir por investigadores de recursos escasos, ya que permite usar cantidades muy pequeñas de azúcares, los cuales, en su mayoría, son muy costosos. Por las razones que acabamos de anotar, es el único procedimiento que hemos usado en todos nuestros trabajos, y después de una práctica de varios años, en los que hemos efectuado cientos de fermentaciones, estamos en disposición de afirmar que los resultados obtenidos han sido siempre precisos y exactos, y que solamente en 1 ó 2% de los experimentos se nos han contaminado los cultivos; en este caso, los resultados los hemos rechazado y se han repetido las experiencias. Además, para subsanar las deficiencias, que los citados autores atribuyen a esta técnica, hemos efectuado siempre la experiencia con un mismo azúcar, un mínimo de 15 a 20 veces, y sólo la tomamos en cuenta cuando los resultados, positivos o negativos, han sido los mismos en todas las pruebas.

Si los azúcares se pueden tener en abundancia, creemos que es mejor seguir otros métodos, pero no porque el de **Lindner** proporcione resultados erróneos, sino porque su manipulación es difícil y requiere bastante pericia y paciencia.

2º—**Método de los tubos de fermentación.**—Se emplean los tubos acodados de **Einhorn**. El tubo tiene una base en codo y posee dos ramas: una larga y cerrada, y otra corta y abierta. Se llena el tubo con agua peptonada o caldo de levadura conteniendo 2% del azúcar que se va a experimentar, se coloca la levadura en el fondo, se tapa el tubo con algodón y se pone a 25° C. Si hay fermentación se nota el desprendimiento de las burbujas del fondo del tubo y van a acumularse en la parte cerrada del tubo; el anhídrido carbónico acumulado hace bajar el nivel del medio, el cual, si la fermentación es muy intensa, rebasa el tapón por el otro lado del tubo y se derrama. Si se quiere saber la cantidad de gas desprendido, basta usar un tubo de fermentación graduado en su rama más larga (Fig. 18).

3º—**Henrici** recomienda, para las pruebas de fermentación, el uso

de tubos de gran tamaño y diámetro (25 cms. por 150 mm.), dentro de los cuales se colocan pequeños tubos de Wassermann invertidos (10 cms., por 75 mm.), para recoger el gas. (Fig. 18). Se llenan ambos tubos del medio que lleva el azúcar y se ponen a 25° C. Si hay fer-

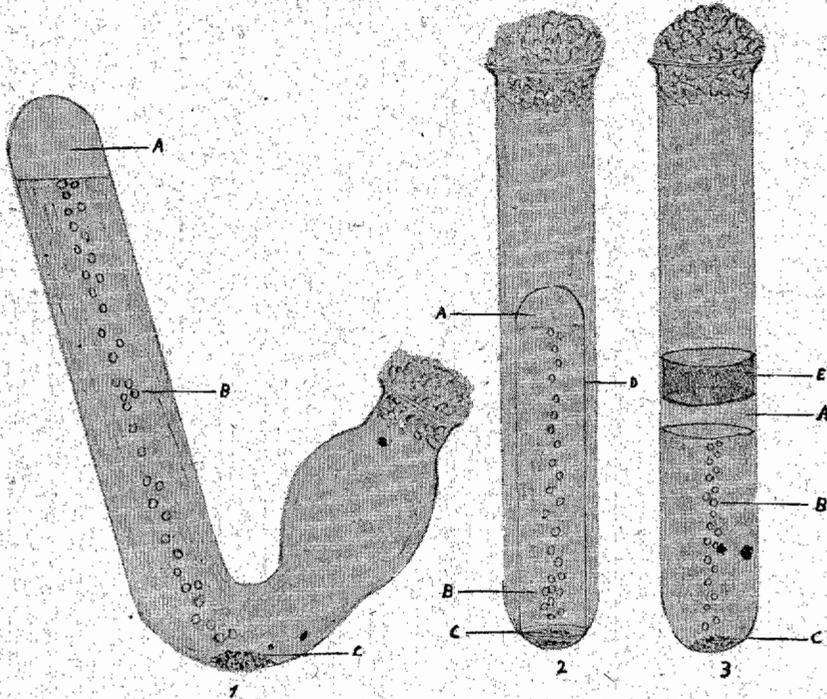


Fig. 18.—Esquema que muestra algunos de los procedimientos para efectuar las fermentaciones en tubos: 1.—Tubo de fermentación de Einhorn; 2.—Tubo de fermentación de Wassermann; 3.—Tubo de fermentación de Guerra. A.—Gas desprendido de la fermentación; B.—Burbujas de gas; C.—Levaduras; D.—Tubo de Wassermann; E.—Tapón de parafina.

mentación, se nota el desprendimiento del gas y su acumulación en la parte superior del tubo invertido. Con levaduras que forman película es bueno sacudir ésta después de uno o dos días, de manera que algunas células caigan al fondo del tubo. Se deben sacudir los tubos antes de leer los resultados, pues a veces la solu-

ción puede estar muy saturada de gas, y no se muestra éste en la parte superior; cuando se agita se nota el desprendimiento de las burbujas y su acumulación arriba del tubo de Wassermann.

4º—**Método de Guerra.**—Este procedimiento ha sido usado por **Guerra y Langeron**, los cuales aseguran que es el único que proporciona resultados completamente exactos. El método expuesto en sus rasgos generales y en pocas palabras consiste en lo siguiente: en un tubo de ensaye pequeño (12 cm. por 12 mm.), se coloca hasta una altura de 4 ó 5 cms., el líquido azucarado conteniendo las levaduras y luego se coloca en la superficie del medio un tapón de parafina con aceite parafinado (parafina de 55º, 5 partes; aceite de parafina, 1 parte) que ajuste perfectamente a las paredes del tubo, de manera que no penetre aire, ni se escape el gas. (Fig. 18). Si hay fermentación, el gas que se obtiene se acumula bajo el tapón de parafina y lo va levantando; si el tubo está graduado, se puede anotar la cantidad de gas desprendido.

Nosotros practicamos este método siguiendo paso a paso las indicaciones de su autor, y opinamos que es sumamente complicado: la colocación del tapón de parafina es una operación muy difícil, pero lo es aún más, la inoculación de las levaduras en el medio cuando ya está puesto el tapón.

La lectura de los resultados de una fermentación se debe hacer en 24 horas o en dos o tres días. Sin embargo, en ciertos casos, hay que conservar los tubos o cámaras húmedas hasta 20 días como mínimo, porque se pueden producir fermentaciones tardías.

De todos los métodos anteriormente expuestos, creemos, que el más fácil de lograr y que proporciona buenos resultados, es el recomendado por **Henrici**. Además, todos estos procedimientos sólo proporcionan fermentaciones cualitativas que son las únicas que se necesitan para la determinación sistemática de las levaduras; las fermentaciones cuantitativas, muy interesantes desde otros puntos de vista, no se utilizan en esta clase de estudios.

Azúcares fermentecibles.—Los únicos azúcares fermentecibles y con los cuales sólo se debe experimentar, son:

1.—Monosacáridos (Hexosas): glucosa, levulosa, manosa y galactosa. Los tres primeros fermentan con facilidad; el último difícilmente.

2.—Disacáridos: sacarosa, maltosa y lactosa.

3.—Trisacáridos: rafinosa.

Es completamente inútil emplear en la fermentación de las levaduras glúcidos como las pentosas (xilosa, arabinosa, ramnosa) y los polisacáridos (almidón, inulina, glicógeno.)

La fermentación de la rafinosa presenta caracteres particulares estudiados especialmente por varios investigadores. Algunas levaduras descomponen este trisacárido en levulosa y en el disacárido melibiosa, fermentando la primera pero no la segunda: son descritas como levaduras que fermentan "un tercio de rafinosa". Otras levaduras hidrolizan completamente a la rafinosa en sus componentes monosacáridos a los cuales fermentan y se dice entonces que fermentan completamente a la rafinosa. La fermentación de este azúcar requiere el uso de aparatos cuantitativos, que en muchos laboratorios no se poseen.

Leyes de Kluyver-Dekker sobre la fermentación de las levaduras.—En 1914, Kluyver publicó ciertas generalizaciones concernientes a la fermentación de los azúcares por las levaduras las cuales fueron comprobadas y apoyadas por Stelling-Dekker. Como son rigurosamente exactas, es interesante citarlas, pues en la práctica ayudan en gran manera:

1.—Toda levadura que no fermenta glucosa, no fermenta ningún otro azúcar.

Esta ley es sumamente lógica y práctica: una levadura inactiva para la zimasa, no puede obrar en ningún azúcar; por lo mismo, al hacer la prueba de las fermentaciones, se inicia con la glucosa y no con otro azúcar; si ésta no fermenta, es inútil hacer pruebas con los demás.

2.—Toda levadura que fermenta glucosa, hace fermentar siempre la levulosa y manosa.

Según esta ley, cuando una levadura fermenta la glucosa, es inútil experimentar con la levulosa y manosa.

3.—Ninguna levadura puede fermentar a la vez maltosa y lactosa.

Según esta ley, si en las experiencias se encuentra que dichos azúcares fermentan con una misma levadura, es que se ha cometido un error en las mismas.

En el curso de nuestros estudios hemos comprobado que estas leyes son sumamente precisas.

Constancia del poder fermentativo de las levaduras.—Algunos investigadores han negado la importancia al estudio de las fermentaciones e indican que son inconstantes y variables. Esta opinión es completamente inexacta y sólo se puede explicar por errores cometidos durante las pruebas de fermentación. Desde luego que con la edad, puede disminuir el poder fermentativo de una levadura, pero jamás desaparecer. **Langeron** comprobó con cepas de 5 años, que conservaban sus mismos caracteres de fermentación; en el Instituto de Parasitología de París, se hizo lo mismo con cultivos de 20 años y nosotros hemos llegado a las mismas conclusiones con cepas que conservamos en el Instituto de Biología desde hace 8 años. No hemos notado ningún cambio de propiedades, ni pérdida de poder fermentativo, a condición desde luego de emplear azúcares perfectamente puros y manejar las técnicas con toda exactitud.

EMPLEO DE LA LECHE TORNASOLADA.—En los trabajos de **Castellani** tienen gran importancia la coagulación y el viraje a rosa de la leche tornasolada y así es como distingue a ciertas especies. **Langeron** y **Guerra**, experimentaron con las mismas especies de levaduras que **Castellani** y obtuvieron resultados totalmente diferentes; por lo mismo opinan que las coagulaciones señaladas por este autor y otros son debidas a contaminaciones con bacterias y que si se purifican las cepas, con Raulin ácido, se obtienen cultivos puros que ya no coagulan la leche. Respecto al viraje a rosa, no tiene ningún valor, pues sólo se observa en las especies que fermentan a la lactosa.

LICUEFACCION DE LA GELATINA. — Según diversos autores, las pruebas sobre la licuefacción de la gelatina, carecen de valor, a menos que la reacción sea rápida y originada por cultivos completamente puros, pues casi todas las levaduras llegan a efectuar este proceso, al cabo de un tiempo más o menos largo. Además, la rapidez de dicha licuefacción, depende de factores como la concentración de la gelatina y de la esterilización que haya sufrido: una elevación muy alta y prolongada de la temperatura puede producir una lisis más o menos rápida y total.

Empleo del alcohol etílico como fuente de carbono.—Este carácter biológico para el estudio de las levaduras, fué introducido en la ciencia por los investigadores holandeses. El medio que se emplea es el siguiente: agua ordinaria, 100 c.c.; sulfato de amonio, 0.1 gr.; fosfato monopotásico, 0.1 gr.; sulfato de magnesio, 0.05 gr.; alcohol etílico 3 c.c. El medio se reparte en tubos, se esteriliza a 120°, se inocula con la levadura y se coloca a 25° C. Al cabo de 8 a 10 días la utilización del alcohol por las levaduras se aprecia según la abundancia del desarrollo en el fondo del tubo o sobre la pared; en ocasiones se nota anillo y velo. Cuando no existe desarrollo, es que el alcohol no se ha utilizado.

Para obtener resultados más concluyentes, nosotros hemos empleado al mismo tiempo, siembras en tubos testigos, en los cuales se coloca el mismo medio, pero sin el alcohol etílico.

Los caracteres que muestran las levaduras con respecto a la licuefacción de la gelatina y a la utilización del alcohol etílico, creemos que tienen interés en el estudio sistemático de estos microorganismos, puesto que en los trabajos monográficos de **Stelling Dekker y Lodder**, sobre gran número de especies, aparecen siempre anotados estos datos, ya sean positivos o negativos.

Asimilación de los azúcares.—(Es indispensable anotar, que el término "asimilación de los azúcares", no es suficientemente claro y que en el tema que vamos a desarrollar se refiere solamente al empleo de los azúcares en las oxidaciones respiratorias. A las especies de levaduras que efectúan este proceso, se les denomina "especies oxidativas"). En la actualidad, el estudio de una levadura

sería incompleto, y su clasificación errónea, si no se determinara la asimilación de los azúcares. Sin embargo, ésto sólo se hace en el caso de las levaduras que no fermentan, pues en el caso contrario, los azúcares fermentables son los mismos que se emplean en la asimilación.

Para poner en evidencia este carácter, se emplea el **método auxanográfico de Beijerinck**, el cual fué dado a conocer desde 1889 y es muy sencillo y exacto. El método, expuesto en todos sus detalles, es el siguiente:

1.—Se prepara el medio sintético que se va a utilizar, y cuya composición es la siguiente: agua destilada, 100 c.c.; sulfato de amonio, 0.5 gr.; fosfato monopotásico 0.1 gr.; sulfato de magnesio, 0.05 gr.; gelosa bien lavada, 2 gr.

La gelosa debe lavarse en agua corriente por lo menos dos horas y después con agua destilada; la manera de hacerlo, es encerrar dicha substancia en un lienzo. El medio se filtra y se esteriliza a 120° C.

2.—Se prepara una emulsión de levaduras jóvenes; para ello se toma con un sembrador, de un cultivo joven (24 ó 48 horas) de la levadura que se estudia, una cantidad de células que tengan el volumen de una cabeza de alfiler, y con ellas se hace una emulsión en 2 c.c., de agua destilada estéril, contenida en un tubo. La emulsión debe ser perfectamente homogénea, sin grumos.

3.—El medio de cultivo preparado con anticipación se licúa en baño maría y se conserva entonces para la siembra a una temperatura de 40° a 45° C.

4.—En una caja de Petri estéril y de fondo bien plano, se colocan los 2 c.c. de la emulsión de levaduras, e inmediatamente después se vacía en la misma caja el medio de cultivo que aún se ha conservado a 40° ó 45° C.; el medio no debe llegar a los bordes de la caja. En el momento de vaciar el medio, y antes de que se solidifique, se agita perfectamente la caja en sentido circular, de manera que las levaduras se repartan de manera uniforme dentro del medio. El medio se deja después enfriar y solidificar.

5.—Se coloca la caja en una estufa a 30° C. durante 24 horas para provocar la exudación del agua de condensación que impediría la lectura de los resultados. Después de este tiempo, se quita el agua de condensación acumulada en la tapa de la caja de Petri, con una pipeta estéril.

6.—Se colocan los azúcares sobre el medio y en la orilla de la caja de Petri; se reparten por sectores, en puntos ya previamente marcados y separados unos de otros a regular distancia. Se pueden colocar perfectamente cuatro azúcares en una caja; mayor número pueden confundir los resultados. La cantidad de azúcares que se colocan es aquella que puede tomar la punta fina de un bisturí o un sembrador estéril.

7.—Se cubre la caja de Petri con su tapa, sobre ésta se marcan con números o letras los sitios donde se pusieron los azúcares y se coloca a temperatura de laboratorio o a 25° C. Si se forma nuevamente agua de condensación, se evitará, por todos los medios posibles, que las gotas caigan al medio, pues harán difundir irregularmente los azúcares, y no resulta la experiencia.

La lectura de los resultados se hace a las 48 horas. Cuando una levadura asimila el azúcar, se nota la aparición, alrededor del punto donde se colocó el azúcar, de una zona semicircular, opaca y blanquizca, que corresponde a un crecimiento intenso de la levadura y que contrasta con los sitios del cultivo hasta donde no difundieron los azúcares. Si el azúcar no es aprovechado, no aparece la citada mancha blanquizca. Se obtiene así lo que se llama un **auxanograma**, que expresa las propiedades asimilatrices de una levadura frente a los azúcares.

Si los resultados no son suficientemente claros y precisos, a pesar de todas las precauciones tomadas, es necesario hacer nuevas experiencias.

Langeron y Guerra, indican haber obtenido mejores resultados, haciendo las siguientes modificaciones al método expuesto:

1.—Suprimen del medio de cultivo empleado, el sulfato de amonio que proporciona el nitrógeno necesario para el desarrollo de las

levaduras, y la gelosa la colocan sin lavarla. Ellos indican, que el nitrógeno necesario en este caso, es proporcionado por las impurezas que lleva la gelosa, lo que basta para asegurar el crecimiento de las células.

2.—Aumentan la proporción de gelosa de 2 gr. a 2.2. gr., reduciendo así la exudación del agua de condensación.

3.—Para eliminar con más facilidad el agua de condensación, impiden el cierre completo de la caja de Petri con una banda de papel filtro estéril colocada entre los bordes de la caja y la tapa. El agua que se va evaporando se escapa al medio externo por entre los bordes no bien ajustados de la caja, y si aún se llegan a formar gotas, éstas son absorbidas por el papel filtro.

Nosotros hemos experimentado con las modificaciones propuestas por **Langeron y Guerra** y, podemos asegurar, que no hemos obtenido buenos resultados. En la mayoría de las ocasiones el crecimiento de las levaduras no se obtiene, ni aún en glucosa, azúcar que siempre se asimila; creemos que esto se debe a la supresión del sulfato de amonio, puesto que las impurezas que lleva la gelosa no lavada, no llevan el nitrógeno suficiente para las necesidades de las células. Además, la gelosa puede llevar otras impurezas que no sean precisamente sustancias con nitrógeno.

El empleo del papel filtro, para eliminar el agua de condensación, en ningún caso nos dió resultado, pues las gotas que se forman en gran cantidad, no son absorbidas por el papel, y lo único que se logra es la contaminación del medio, debido a la separación que se obtiene entre los bordes de la caja y su tapa.

La operación más difícil es la eliminación del agua de condensación y nosotros jamás la logramos, ni usando la pipeta estéril como se aconseja en el método de **Beijerinck**, ni por el procedimiento de **Langeron y Guerra**. Sin embargo, logramos una sencilla modificación que nos dió resultados sorprendentes: cuando se ha acumulado el agua de condensación en la tapa de la caja de Petri, se cambia rápidamente por otra tapa previamente esterilizada y se pueden seguir haciendo tantos cambios como sean necesarios.

Otra dificultad con que se tropieza, es el momento en que se coloca la emulsión de levaduras y el medio de cultivo en la caja: puede haber contaminaciones del medio externo y además, el medio gelosado al caer en la caja, se solidifica rápidamente y no da tiempo a la agitación necesaria para que se repartan con uniformidad las células. Para subsanar estos tropiezos, nosotros hemos hecho esta operación dentro de un horno a 40° ó 45° C., y previamente esterilizado. Se reducen enormemente las contaminaciones puesto que el horno tiene atmósfera estéril y no se solidifica el medio de cultivo, puesto que se está manipulando a 40° ó 45° C.; ésto permite agitar cuanto se quiera el medio y repartir de manera homogénea las levaduras, de lo que depende en gran parte el buen resultado de la experiencia.

Elección de los azúcares.—Los azúcares que se emplean, para hacer la prueba de que tan extensamente hemos tratado, son exactamente los mismos utilizados para las fermentaciones, a saber: glucosa, levulosa, manosa, galactosa, sacarosa, lactosa, maltosa y rafinosa. Es inútil el empleo de otros glúcidos.

Como algo muy importante que puede servir en la práctica, citamos las siguientes generalizaciones con respecto a la utilización de los azúcares.

- 1.—Toda levadura asimila siempre, por lo menos, la glucosa.
- 2.—Toda levadura que asimila glucosa, siempre hace lo mismo con manosa y levulosa.

Si no se cumplen exactamente estas dos leyes, los resultados son erróneos.

La elección de azúcares determinados, constituye para las especies, una propiedad siempre fija e invariable, y como sus resultados son muy precisos, su empleo en la clasificación sistemática de las levaduras es indispensable.

Lodder, autor de la mejor monografía sobre levaduras anascorógenas, sólo ha empleado este método para las levaduras que carecen de poder fermentativo, pero otros autores opinan que debe

emplearse también con las levaduras que fermentan, pues si es cierto que toda levadura que fermenta un azúcar lo consume necesariamente, lo contrario no lo es siempre: un azúcar consumido no siempre es fermentado. Esto último ha sido demostrado por varios investigadores.

ASIMILACION DEL NITROGENO.—La técnica recomendada es la del método **auxanográfico de Beijerinck**, o sea, exactamente la misma que se utilizó para los azúcares. La única diferencia, muy lógica por supuesto, es que el medio de cultivo utilizado es un poco diferente, pues se le quita el sulfato de amonio que tiene nitrógeno y en cambio se le agrega glucosa que es necesaria para la nutrición de las levaduras. La fórmula del medio quedaría así: agua destilada 100 c.c.; fosfato monopotásico, 0.1 gr.; sulfato de magnesio, 0.05; glucosa pura, 2 gr.; gelosa lavada 2 gr.

En la manipulación, se sigue paso a paso todo lo recomendado a propósito de la utilización de los azúcares, con un escrúpulo aún mayor, porque esta prueba nunca presenta la claridad y nitidez de la anterior.

Teóricamente el medio propuesto no encierra ninguna sustancia nitrogenada, pero en la práctica no llega a suceder lo mismo, puesto que la gelosa aún bien lavada, siempre lleva impurezas y, además, las levaduras que van muriendo pueden ser fuentes de nitrógeno. Debido a ésto, las experiencias hay necesidad de hacerlas dos y tres veces por lo menos.

Para que los resultados sean lo más claro posibles, es indispensable seguir las siguientes recomendaciones:

1.—Lavar perfectamente la gelosa durante 5 a 6 horas con agua corriente, y de 8 a 10 horas con agua destilada.

2.—Usar glucosa químicamente pura, preparada por una casa de reconocido prestigio, pues de otro modo puede llevar impurezas.

3.—Las levaduras que se usen en la experiencia, deben pertenecer forzosamente a cultivos muy jóvenes (24 a 48 horas).

Substancias nitrogenadas utilizadas.—Las substancias nitrogenadas que todos los investigadores están de acuerdo que deben usarse son: peptona, asparagina, urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio.

Como la urea casi siempre presenta un semicírculo de asimilación poco opaco, que no se destaca bien sobre el resto del cultivo y sobre todo, que se extiende por más de la mitad de la caja, no deben ponerse en la caja donde esté la urea, varias de las substancias, sino solamente una, y esta será la asparagina que proporciona semicírculos pequeños y muy claros.

CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS

Desde que se conocieron las levaduras, han estado sujetas, en el transcurso de los años, a una serie de clasificaciones. En 1903 **Hansen** trató de establecer una clasificación de las levaduras y creó, para ellas, una familia: las **Saccharomycetaceae**, muy cercana a las **Exoascaceae**. En 1912, **Guilliermond** expone una clasificación inspirada en grandes rasgos, en la de **Hansen**. Consideró dos grandes familias: **Saccharomycetaceae** y **Non-Saccharomycetaceae**. La primera la dividió en 5 grupos y 14 géneros, comprendiendo todas las levaduras que forman ascosporas; en la segunda incluyó todas aquellas que no forman esporas y las dividió en 5 géneros. Además, relacionó la primera familia con las **Endomycetaceae**. Durante muchos años, fué la clasificación que privó en la ciencia y a ella solamente le hicieron ligeras modificaciones algunos autores. En 1916, **Will** agrupó las levaduras no esporógenas en una sola familia: las **Torulaceae**, con sólo tres géneros. En 1925, **Zender**, haciendo notar la similitud de las **Saccharomycetaceae** y las **Endomycetaceae**, y las dificultades para delimitar una de otra, propone reunir las en una sola familia: las **Endomycetaceae**. Por la misma época, **Ciferri** y **Redaelli** establecen, para las levaduras no-esporógenas las familias **Nectaromycetaceae**, **Mycotorulaceae** y **Torulopsidaceae**.

En 1925, **Klyver** y **Van Niel**, indican la existencia de levaduras que forman esporas con caracteres semejantes a las basidiosporas, a las que **Dery** las coloca, en 1930, dentro de la familia de las **Sporobolomycetaceae**. Por último, **Lodder** en 1934, crea la familia **Rhodo-**

torulaceae para todas aquellas levaduras no-esporógenas que tienen pigmentos rojo, rosa y amarillado, y las considero como formas imperfectas derivadas de las **Sporobolomycetaceae**. Estas dos últimas familias, se incluyen, entonces, dentro de los **Basidiomycetes** y las otras ya citadas en los **Ascomycetes**.

Con todos los datos anotados y después de un estudio muy detallado y completo de todas las familias, géneros y especies de levaduras conocidas, **Stelling-Dekker** (1931) y **Lodder** (1934) establecen una clasificación que todos los autores reconocen ser la única que puede aceptarse en la actualidad, por ser la más completa y racional que se conoce. **Guilliermond**, reconocido por uno de los primeros investigadores sobre levaduras, dice respecto a esta clasificación: "es una clasificación muy racional; ella se apoya sobre hechos en la actualidad bien establecidos tomados a la vez del desarrollo y sexualidad de las levaduras y de los hongos cercanos: ella debe ser aceptada".

A continuación anotamos la clasificación de **Stelling-Dekker** y **Lodder**, de la cual sólo damos a conocer sus datos fundamentales. Se incluyen todas las familias y los principales géneros; nos es imposible citar las especies, las cuales se pueden encontrar extensamente descritas en las monografías publicadas en Holanda por **Stelling-Dekker** y **Lodder** y en los diversos trabajos que se anotan en la bibliografía.

CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS SEGUN STELLING-DEKKER y LODDER.—(Tomada de los trabajos de estos autores, **Henrici** y **Guilliermond**).

Estos autores establecen fundamentalmente dos grandes grupos basándose en la ausencia o presencia de ascosporas: **Levaduras ascosporógenas** y **Levaduras anascosporógenas**. Las levaduras que no forman ascosporas, pero sí esporas semejantes a las basidiosporas, las separan de estos grupos y las incluyen en la familia **Sporobolomycetaceae**, propuesta por **Dex.**

LEVADURAS ASCOSPOROGENAS.

(Según **Stelling-Dekker**).

Stelling-Dekker incluye todas las levaduras que forman ascosporas en una sola familia: **Endomycetaceae**, del orden **Plectascales**, clase **Ascomycetes**, división **Eumycetes**.

FAMILIA ENDOMYCETACEAE.

Desarrollo en forma de micelio, pseudomicelio, oidios o células de levaduras (conidios) juntos o aislados. Multiplicación vegetativa por división transversal o por brote. Ascas desnudas que resultan de una conjugación isogámica o heterogámica, o bien, por partenogénesis. Ascosporas esféricas, hemiesféricas, angulares, fusiformes, de pared lisa, rugosa o con un reborde circular. Especies tanto oxidativas como fermentativas.

Subfamilia A.—**Eremascoideae**.

Desarrollo solamente en forma de micelio. Multiplicación vegetativa por división transversal. Esporas en forma de sombrero, que resultan de una conjugación isogámica. Son exclusivamente oxidativas. Sólo se conoce el género **Eremascus**.

Subfamilia B.—**Endomycoideae**.

Desarrollo en forma de micelio con oidios, o solamente en oidios. Multiplicación vegetativa por división transversal. Esporas circulares, ovales o en forma de sombrero que resultan de una conjugación isogámica o heterogámica. Especies oxidativas o fermentativas. Hay dos géneros. **Endomyces**, que tiene micelio y oidios y cuya respiración es oxidativa y fermentativa, y **Shizosaccharomyces** que carece de micelio, sólo tiene oidios que se multiplican por división transversal y cuya respiración dominante es fermentativa.

Subfamilia C.—**Saccharomycoideae**.

Desarrollo en forma de micelio con células de levaduras (conidios), ocasionalmente también oidios, o solamente células de levaduras y entonces también pseudomicelio. Multiplicación vegetativa por división transversal, brotes multipolares o bipolares; en este último caso sobre la base más ancha. Esporas es-

féricas, hemiesféricas, angulares, fusiformes o con un reborde circular. Se forman las esporas por una conjugación isogámica o heterogámica y en otras ocasiones por partenogénesis. Se encuentran todas las transiciones entre las especies oxidativas y fermentativas. Esta subfamilia se divide en tres tribus:

Tribu A.—Endomycopsace.

Desarrollo en forma de micelio con brotes (conidios) y a veces oidios. Multiplicación vegetativa por división transversal y por brotes multipolares. Esporas partenogénicas o resultando de una conjugación isogámica. Sólo existe un género, **Endomycopsis**. La respiración es principalmente oxidativa y a veces también fermentativa.

Tribu B.—Saccharomyceteae.

No tienen micelio, solamente células de levaduras o pseudomicelio. Multiplicación vegetativa por brotes multipolares. Las esporas se originan por partenogénesis o por conjugación isogámica o heterogámica. Esta tribu incluye el mayor número de especies de levaduras que forman esporas comprendidas en los géneros: **Saccharomyces**, **Torulaspóra**, **Pichia**, **Hansenula**, **Debaryomyces** y **Schwanniomyces**.

Tribu C.—Nadsonieae.

No forman micelio, solamente células de levaduras y a veces pseudomicelio. Multiplicación vegetativa por brotes bipolares más o menos sobre la base más ancha. Las esporas se originan por partenogénesis o por conjugación heterogámica. Existen tres géneros: **Saccharomycodes**, con esporas circulares que se conjugan durante la germinación; **Hanseniaspora**, con esporas partenogénicas; y **Nadsonia**, en cuyas especies después de una conjugación heterogámica entre el brote y la célula madre, un segundo brote se desarrolla en el asca.

Subfamilia D.—Nematosporoideae.

Desarrollo en forma de micelio y células de levadura. Multiplicación vegetativa por brotes multipolares. Esporas fusiformes o en forma de aguja, con o sin flagelos y las cuales se forman por partenogénesis o por una conjugación isogámica. Especies oxi-

dativas y fermentativas. Se conocen tres géneros: **Monsporella**, con una espora en forma de aguja; **Nematospora**, con dos a ocho esporas fusiformes y flageladas que se originan por partenogénesis, y **Coccidiascus**, con ocho esporas fusiformes, no flageladas y originadas por conjugación isogámica.

CLAVE DE LOS GENEROS DE LA FAMILIA ENDOMYCETACEAE

1. a. Esporas fusiformes. (2)
b. Esporas no fusiformes. (4)
2. a. Una espora. **Monsporella**
b. Por lo menos 4 esporas por asca. . . (3)
3. a. Esporas con un flagelo no móvil. . . **Nematospora**
b. Esporas sin flagelos. **Coccidiascus**
4. a. Multiplicación vegetativa por división transversal. (5)
b. Multiplicación vegetativa por división transversal, brotes multipolares y por ambos procedimientos. (6)
c. Multiplicación vegetativa por brotes bipolares con bases más o menos anchas en los brotes. (11)
5. a. Verdadero micelio y oidios. **Endomyces**
b. Solamente oidios, no hay micelio. . . **Schizosaccharomyces**
6. a. Verdadero micelio con tabiques transversales y conidios que dan brotes, a veces oidios. **Endomycopsis**
b. No hay micelio, a veces pseudomicelio, conidios con brotes y sin oidios. . (7)
7. a. En mosto un velo mate y seco desde el principio. (8)
b. En mosto no se produce velo o si se origina es mucoso y después de algún tiempo. (10)
8. a. Los nitratos son utilizados. **Hansenula**
(Lodder (1932) describió una nueva levadura que tiene los caracteres de **Hansenula**, pero produciendo esporas

en forma de sombrero después de una conjugación isogámica; de aquí que ella creó un nuevo subgénero: **Zygo-hansenula**).

- b. Los nitratos no son utilizados.(9)
- 9. a. Esporas circulares, angulares o en forma de sombrero y con pared lisa; células en cultivos jóvenes largo-ovales a filamentosas. **Pichia**
 - aa. Las esporas se forman por partenogénesis. Subgénero **Pichia sensu strictu**
 - bb. Las esporas se forman por sexualidad. Subgénero **Zygo-pichia**
- b. Esporas circulares con membrana rugosa; células en cultivos jóvenes circulares a corto-ovales. **Debaryomyces**
- 10. a. Células corto-ovales a elongadas, esporas circulares, en forma de riñón o de sombrero, de pared lisa y de 1 a 4 por asca. **Saccharomyces**
 - aa. Las esporas se forman por partenogénesis. Subgénero **Saccharomyces sensu strictu**
 - bb. Las esporas se forman por sexualidad. Subgénero **Zygosaccharomyces**
- b. Células circulares, esporas circulares y de pared lisa con un glóbulo de grasa en la parte media; se forman tubos de copulación antes de la formación de las esporas. **Torulaspóra**
- c. Células principalmente circulares, pero también ovales; son pequeñas. Esporas circulares con membrana rugosa, casi siempre 1, rara vez 2 por asca y que se forman por sexualidad. . . **Debaryomyces**
- d. Células ovales, y de preferencia alargadas; esporas circulares con una pa-

- red rugosa y un reborde en la parte media; se forman tubos de copulación. **Schawanniomyces**
11. a. Células pequeñas, brotes bipolares, esporas en forma de sombrero, de pared suave, 2 a 4 por asca y partenogénicas. **Hanseniaspora**
- b. Células grandes, brotes bipolares en una base ancha, esporas circulares a ovales, de pared lisa y 1 a 4 por asca. Las esporas se conjugan durante su germinación. **Saccharomyces**
- c. Células grandes, con brotes bipolares con una base ancha, esporas circulares con membrana rugosa y una espora por asca. La conjugación antes de la formación de las esporas; el asca es formada por un brote que se origina de la célula fertilizada. **Nadsonia**

LEVADURAS ANASCOSPOROGENAS

Las levaduras anascosporógenas son todas aquellas que no forman esporas. **Lodder** incluyó en la monografía de estas levaduras todas aquellas que forman pseudomicelios, pero no aquellas que forman verdaderos micelios. En la práctica es muy difícil distinguir un verdadero micelio de un pseudomicelio. Además, frecuentemente sucede en los cultivos puros, que aparecen tanto pseudomicelios como verdaderas micelios, dominando unos u otros, según la edad de los cultivos o la composición del medio. Debido a estas circunstancias, **Lodder**, en un trabajo posterior, admite entre las levaduras anascosporógenas, aún aquellas que forman verdadero micelio.

Lodder divide a las levaduras anascosporógenas en tres familias: **Nectaromycetaceae**, **Rhodotorulaceae** y **Sporobolomycetaceae**.

FAMILIA NECTAROMYCETACEAE

Son levaduras típicas de los nectarios de las flores y que en algunas especies se muestran en grupos de cuatro células en forma

de una cruz. No forman ascosporas, pero a veces generan conidios en la superficie de las colonias. Se excluyen de esta familia los géneros **Sporobolomyces** y **Bulleria**, que **Ciferri** y **Redaelli** habían incluido, pues las levaduras de estos géneros forman basidiosporas y no conidios.

FAMILIA RHODOTORULACEAE

Se incluyen en esta familia todas aquellas levaduras anascospógenas que poseen pigmentos carotinoideos rojos, amarillos y anaranjados. Sus células son esféricas, ovales, alargadas o en salchicha; carecen completamente de poder fermentativo; utilizan para la respiración siempre la glucosa, levulosa y manosa, y a veces otros azúcares; siempre asimilan asparagina, urea y peptona; el alcohol etílico es por lo común buen sustrato de crecimiento. Son muy abundantes en el aire por lo que causan muchas contaminaciones en los medios de cultivo; es raro que siendo abundantes en el aire poco se encuentren en la tierra. Como son bioquímicamente inertes, en lo que se refiere a la fermentación, tienen poca importancia práctica.

Las **Rhodotorulaceae** comprenden un solo género, **Rhodotorula**, en el cual se incluyen 13 especies y 10 variedades. Se dividen en dos grupos según su habilidad para utilizar los nitratos. Dentro de estos grupos las especies se diferencian según el tono de su pigmento, el tamaño y forma de las células y la mayor o menor mucosidad de los cultivos en mosto. Sin embargo, estos caracteres pueden ser muy variables.

FAMILIA TORULOPSIDACEAE

En esta familia se encuentran la mayoría de las levaduras silvestres que constantemente contaminan los medios de cultivo. Viven en el aire, tierra, raíces, tallos, hojas, flores, frutos, excrementos, jugos vegetales, sobre los animales, cadáveres, etc., Sus células son circulares, ovales, cilíndricas, triangulares, apiculadas, en clava e irregulares. Reproducción por gemación, siendo los brotes principalmente uni- o bipolares, pero pueden existir multipolares; en algunos casos los brotes se separan por formación de tabique. En ciertas

especies las células forman prolongaciones que semejan tubos de copulación. Pueden o no integrar velos en los medios líquidos desde el principio del cultivo o después de varios días. En ciertos géneros se constituyen pseudomicelios que poseen aparatos esporíferos. No forman ascosporas ni basidiosporas. Carecen de pigmentos de naturaleza carotinoide. Asimilan algunos azúcares y sustancias nitrogenadas. Son formas imperfectas de las levaduras ascosporógenas, o sea, de las **Endomycetaceae**, de las cuales seguramente han derivado.

Tomando en cuenta la ausencia o presencia de pseudomicelio o micelio verdadero con aparato esporífero, se clasifican en dos subfamilias:

1.—**Torulopsidoideae**: no forman pseudomicelio, micelio verdadero, ni aparato esporífero.

2.—**Mycotoruloideae**: forman pseudomicelio, micelio verdadero y aparato esporífero.

SUBFAMILIA TORULOPSIDOIDEAE

Clave de los Géneros

1. a. Células principalmente en forma apiculada y con brotes bipolares. **Kloeckera**
- b. Células principalmente triangulares y con brotes en los tres ángulos. **Trigonopsis**
- c. Células principalmente en forma de clava o botella, brotes a menudo sobre la base ancha. **Pityrosporum**
- d. Células de otras formas: usualmente esféricas, ovales o cilíndricas. (2)
2. a. No se forma película o velo en cultivos de mosto, o solamente un velo blando y mucoso después de algún tiempo. . . . (3)
- b. Un velo seco y mate en cultivos de mosto desde el principio. (4)
3. a. Se forman tubos largos y delgados que se parecen a los tubos de copulación

- del género **Zygosaccharomyces** en Gordkowa gelosado **Asporomyces**
- b. No se forman tubos **Torulopsis**
4. a. Células α menudo cilíndricas, multiplicación por brote, y los brotes no se separan de la célula madre por formación de tabique **Mycoderma**
- b. Células polimorfas, multiplicación por brote, los brotes a menudo se separan de la célula madre por formación de tabique. **Schizoblastosporion**

El género más importante de esta familia es **Torulopsis**, el cual comprende la mayoría de las especies. En la actualidad los géneros **Torula**, **Cryptococcus** y **Blastomyces**, quedan como sinonimia de **Torulopsis**.

LEVADURAS QUE FORMAN BASIDIOSPORAS FAMILIA SPOROBOLOMYCETACEAE

Las levaduras que forman basidiosporas fueron comprendidas por **Derx** dentro de una sola familia descrita de la siguiente manera: "Hongos microscópicos que se propagan principalmente por brote como en los **Saccharomycetes**; de algunas de sus células vegetativas se producen esterigmas simples, bifurcados y más rara vez ramificados que se proyectan hacia el aire y en los cuales se forman esporas apiculadas, brillantes y hialinas que, cuando maduran, son arrojadas de una manera semejante a las esporas múltiples de los verdaderos **Basidiomycetes**. Las esporas cuya forma es semejante a las basidiosporas múltiples pueden formar esporas secundarias como las basidiosporas múltiples de los **Protobasidiomycetes**".

Dentro de esta familia **Derx** incluyó dos géneros: **Sporobolomyces** y **Bullera** (éste último género ha sido denominado **Bulleria** por **Ciferri** y **Verona**).

El género **Sporobolomyces** es definido por **Derx** de la siguiente manera: "Desarrollo vegetativo de color rosa, rojo o salmón. Esporas más o menos comprimidas lateralmente, en forma de riñón, plana y asimétricas".

El género **Bulleria** se define: "Desarrollo vegetativo blanco, blanquizco, crema, pajizo, o amarillo sin ninguna huella de pigmento rojo. Esporas circulares, ovoides, globulares y simétricas".

Las especies del género **Sporobolomyces** se distinguen por el color del desarrollo vegetativo, la forma de las esporas, la estructura de las colonias y el olor de los cultivos. **Ciferri y Verona** proponen que el género se subdivida en dos grupos: el subgénero **Blastoderma** con pseudomicelio, y el subgénero **Eusporobolomyces** sin pseudomicelio.

Del género **Bulleria** sólo se han descrito dos especies, las cuales difieren por el tamaño de sus células vegetativas y el tamaño y forma de las esporas.

PRINCIPALES LEVADURAS DEL AGUAMIEL Y DEL PULQUE

Observando el aguamiel al microscopio, se notan una gran cantidad de bacterias de distintas especies, en su mayoría bacilos y cocos y pequeña cantidad de levaduras. Hicimos varias cuentas de bacterias en las distintas clases de aguamieles y obtuvimos como resultado un promedio de 800,000 a 1.000,000 por milímetro cúbico. Existen en menor cantidad en los aguamieles finos que en los corrientes.

Respecto a las levaduras, existen en mínima proporción comparadas con las bacterias: 3,000 a 6,000 levaduras por milímetro cúbico. En los aguamieles de mejor calidad, como el que proporciona el maguey manso, se encontraron desde 8,000 hasta 15,000 por milímetro cúbico; en cambio en aguamieles de calidad inferior se contaron desde 800 hasta 3,000.

La cantidad de levaduras y bacterias contenidas en el aguamiel y en el pulque, es muy distinta, pues en el primero existen muy pocas levaduras y muchas bacterias; en cambio en el segundo sucede lo contrario. En el pulque encontramos un promedio de 200,000 a 400,000 levaduras por milímetro cúbico y de bacterias 100,000 a 200,000. Esto se debe seguramente a la acidez del pulque, que favorece el desarrollo de las levaduras y no el de las bacterias,

muchas de las cuales mueren en el medio ácido. Por lo anterior se puede notar que la riqueza del pulque en levaduras es admirable, lo que le proporciona un gran poder nutritivo, por las vitaminas que éstas contienen.

Innumerables investigadores se han ocupado del estudio del pulque, pero la mayor parte de los trabajos son meramente literarios y pocos son los de verdadero mérito, especialmente en lo que se refiere a las levaduras, que son los gérmenes esenciales de la fermentación alcohólica.

El primer investigador que observó el pulque ante el microscopio, fué el doctor **Leopoldo Río de la Loza en 1864**, el cual creyó haber observado grandes cúmulos de sustancias albuminoides pero no microorganismos vivos.

El primer estudio de verdadero interés, referente a las levaduras, se debe al doctor **José Barragán en 1870**. Este investigador observó con toda claridad estos microorganismos, de los cuales anotó su forma, dimensiones, agrupamiento, reproducción y estructura. el mismo autor clasificó a las levaduras estudiadas dentro del género **Criptococcus**, sin llegar a la especie, pero semejándolas a las levaduras de la cerveza.

En 1896, el doctor **Gaviño**, logró aislar algunas levaduras y obtuvo colonias con diversos caracteres, pero no hizo ningún estudio especial de las mismas.

Carbajal en 1901, efectuó estudios experimentales y bastante completos y logró aislar y estudiar dos levaduras que denominó: **Saccharomyces cervisiae agavica sylvestre** y **Torula rosada**. La primera fué la que estudió con bastante atención y de ella da a conocer los caracteres en diversos cultivos, su forma, dimensiones, reproducción, esporulación, fermentación, etc.

En 1917, **Guilliermond**, aisló y estudió dos levaduras del aguamiel y del pulque a las cuales denominó "**Levadura del pulque número 1**" y "**Levadura del pulque número 2**"; la primera la colocó dentro del género **Pichia** y la segunda en el género **Saccharomyces**, pero sin determinar las especies.

En 1924, **Lindner** vino a México a efectuar estudios especiales sobre el pulque; conocemos sus trabajos muy interesantes sobre las bacterias, pero ninguno sobre las levaduras.

Por nuestra parte, estimamos que los estudios sobre las levaduras del aguamiel y del pulque son aún muy incompletos, y por

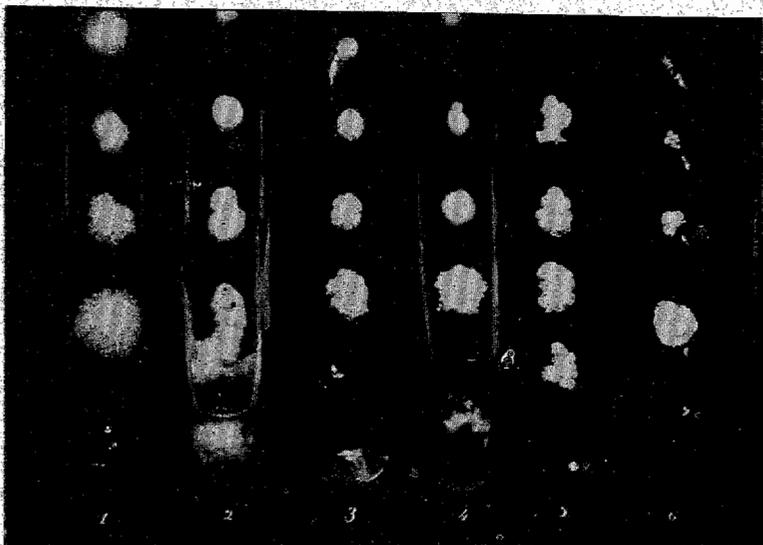


Fig. 19.—Tubos con distintos medios de cultivo, mostrando las colonias de *S. Carabajal*: 1.—Mosto gelosado (27 días); 2.—Aguamiel gelosado (27 días); 3. Raulin gelatina (24 días); 4. Sauraud (24 días); 5. Aguamiel gelatinizado (19 días); 6. Mosto gelatinizado (10 días); (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I Larios).

lo mismo, esperamos contribuir con este modesto trabajo a un mejor conocimiento de estos microorganismos que tan importante papel desempeñan en la fermentación de una de las bebidas más usadas en nuestro pueblo.

Hasta la fecha, hemos logrado aislar, de distintas clases de aguamiel y pulque, tomados en los sitios de producción, varias especies de levaduras, de las cuales ya hemos terminado los estudios

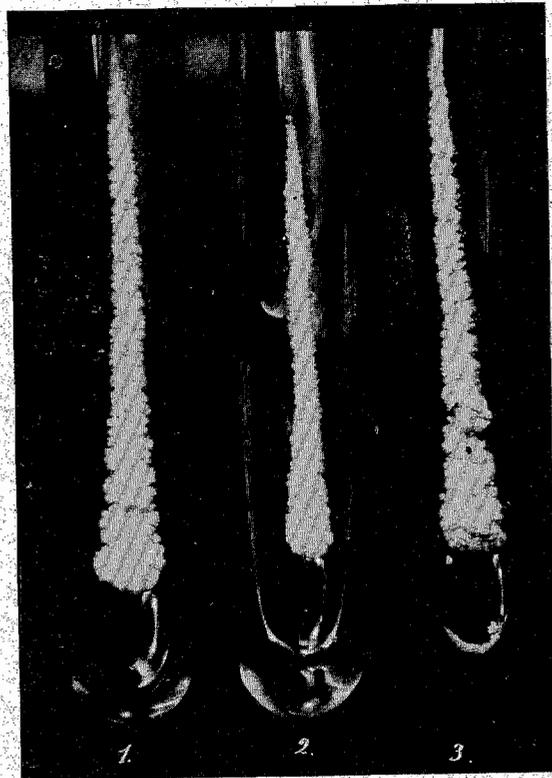


Fig. 20.—Tubos mostrando cultivos en estria: 1. Aguamiel gelatinizado (20 días); 2. Raulin gelatinizado (20 días); 3. Mosto gelatinizado (20 días). (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

completos correspondientes a las siguientes: **Saccharomyces carballi**, **Pichia barragani**, **Torulopsis hydromelitis** y **Torulopsis aquameilis**, todas ellas especies nuevas y cuyo estudio presentamos a continuación.

En la actualidad tenemos en estudio, una levadura muy distinta a las anteriores, pues produce un pigmento rojo; pertenece seguramente al género **Rhodotorula**, pero la especie no la determinamos hasta este momento:

SACCHAROMYCES CARBAJALI n. sp.

Purificación del cultivo: por medio de cultivos sucesivos en aguamiel adicionado de ácido láctico.

Aislamiento de la cepa pura: por el método de las "pequeñas gotitas" de Lindner en aguamiel y mosto de cerveza líquidos.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios líquidos.— En mosto de cerveza, a las 24 horas y a temperatura de laboratorio, se obtiene un depósito abundante de color lechoso, intensa fermenta-

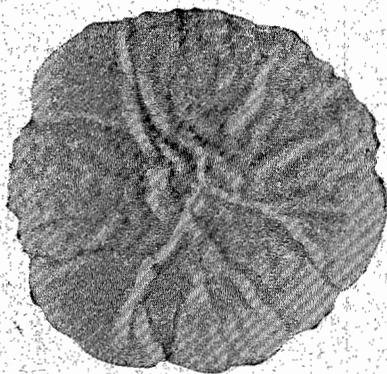


Fig. 21.—Colonia gigante de *S. Carajali*, a los 40 días de cultivo en aguamiel gelosado. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larics).

ción y olor a manzana. En ningún caso se forma velo ni anillo y solamente aparecen en la superficie corto número de colonias esféricas muy pequeñas. El depósito, después de 30 días toma color moreno.

En aguamiel líquido se obtienen los mismos caracteres que en mosto, pero el desarrollo es más abundante.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios sólidos.— En mosto gelosado, a los 12 días y a temperatura de laboratorio, se

obtienen colonias de forma circular, rizada e irregular, superficie muy rugosa, elevación convexa o pulvinada, bordes ondulados o lobulados, húmedas, brillantes y de color blanco grisáceo. Las colonias crecen en abundancia hacia la parte interna del medio, en forma de láminas anchas, delgadas y terminadas en punta. Después de 30 días el color toma un ligero tinte moreno y el brillo se atenúa.

Haciendo cultivos en picadura, en diversos medios sólidos, se obtiene un desarrollo semejante en casi todos y bastante intenso, excepto en gelatina y gelosa, en donde los cultivos fueron tan pobres que no fué posible tomar sus caracteres. Los demás medios de cultivo se opacan completamente y se llenan de burbujas debido a la fermentación y sólo el Raulin gelatina se conserva bastante transparente notándose un cultivo interno en forma laminar, transparente, color blanco y arrosariado.

Por medio de cultivos en estría, se obtienen colonias con desarrollo bastante intenso y regular. En mosto gelosado, aguamiel, gelosa y Sabouraud, se obtienen cultivos de forma equinulada, superficie al principio lisa y después rugosa, húmedos y brillantes. Un desarrollo más intenso se obtiene en aguamiel, mosto y Raulin gelatinizados en donde las colonias son de forma equinulada, bastante elevadas sobre el medio, superficie rugosa desde los primeros días, secas, sin brillo y de color blanco grisáceo que lentamente se va tornando moreno.

Colonias gigantes.—En aguamiel gelosado, a los 15 días y a temperatura de laboratorio, se obtiene una colonia de gran desarrollo, forma circular, superficie lisa, elevación convexa o pulvinada, bordes ondulados, húmedas, brillantes, color blanco grisáceo en la periferia y en el centro moreno. En la periferia se notan fisuras poco profundas en forma radial que no llegan hasta el centro. A los 40 días la superficie se torna rugosa y las fisuras radiales se extienden hasta el centro. En mosto gelosado las colonias gigantes son muy semejantes a las anteriores, a excepción de que, se forman con tiempo, escotaduras en la periferia que dan a los bordes un aspecto festonado. En mosto y aguamiel gelatinizados se obtienen colonias muy típicas que presentan estrías radiales y numerosas capas de crecimiento, circulares y concéntricas que se elevan a medida que se

colocan más hacia el centro.

Caracteres microscópicos de las células.—Las células, en la mayor parte de los cultivos, muestran caracteres semejantes: formas esférica, oval, elíptica, alargada, en huevo y especialmente en forma de pera; la membrana es gruesa y oscura, el protoplasma es claro, transparente, con granulaciones oscuras y una vacuola con 1 a 3 granos metacromáticos con movimiento browniano. Su reproducción se efectúa por brote unipolar y sus dimensiones están compren-

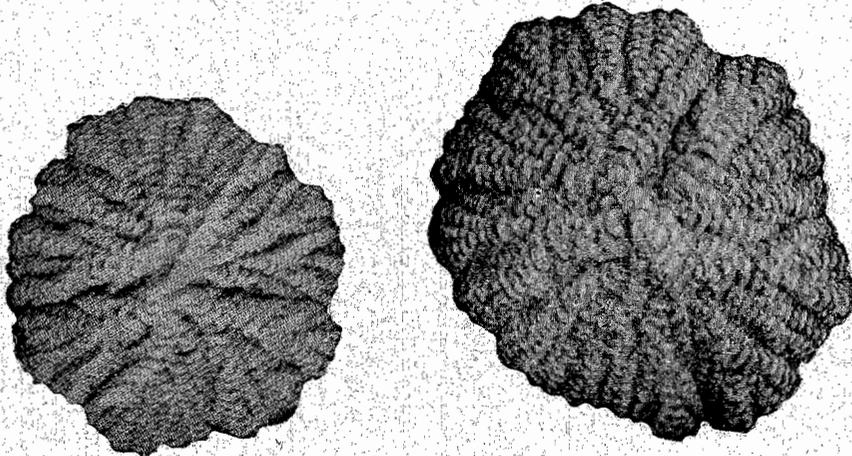


Fig. 22.—Colonias gigantes de *S. carbajali*.
A. En aguamiel gelatinizado a los 40 días B. En mosto gelatinizado a los 40 días.
(Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

didadas entre 6 a 9 micras de longitud, por 4 a 7 de anchura. Después de los 30 días aparecen glóbulos de grasa y muchas células se unen formando largas cadenas que semejan micelios. En mosto y aguamiel gelosados, desde los primeros días de cultivo se notan gran cantidad de levaduras de forma alargada unidas en cadenas y con brotes laterales.

Temperaturas límites y óptima para el brote.—Las experiencias se hicieron con aguamiel y mosto gelosados, obteniéndose los siguientes resultados: temperatura mínima, 3° a 5°; óptima, 29° a 31°.

y máxima 38° a 39°.

Esporulación.—Las ascas y ascosporas se forman en todos los medios de cultivo, de manera que no hay necesidad de recurrir a los métodos especiales de esporulación. Antes de la esporulación

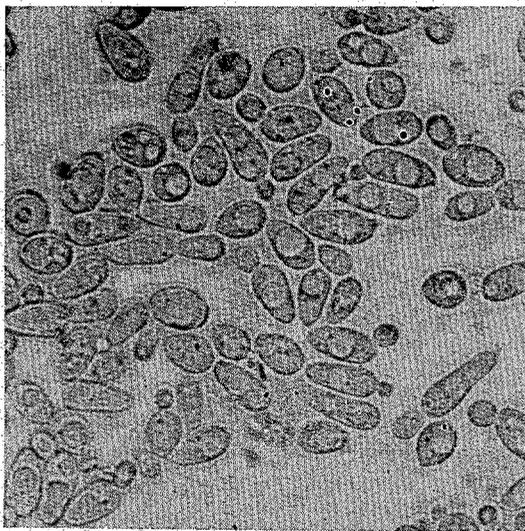


Fig. 23.—Microfotografía que muestra las células del *Saccharomyces carbajali*, en mosto de cerveza, a los 4 días de cultivo. Con claridad se notan los brotes, vacuolas y gránulos metacromáticos. (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

se nota la disminución de las células con brotes, el protoplasma muestra gran cantidad de glóbulos de grasa, granos metacromáticos y sin vacuolas. Las ascosporas empiezan a aparecer como pequeñas vacuolas de membrana oscura, delgada y de contenido claro.

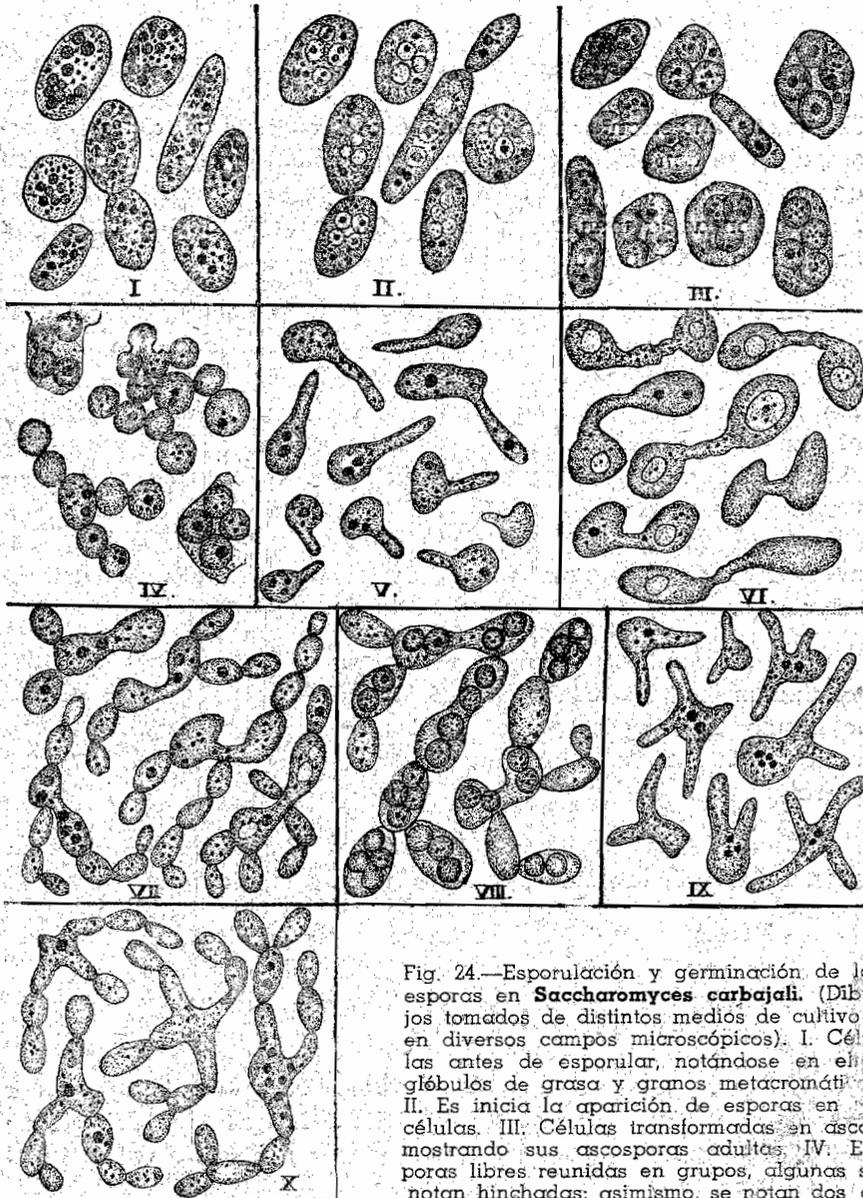


Fig. 24.—Esporulación y germinación de las esporas en *Saccharomyces carbajali*. (Dibujos tomados de distintos medios de cultivo en diversos campos microscópicos). I. Células antes de esporular, notándose en ellas glóbulos de grasa y granos metacromáticos. II. Es inicia la aparición de esporas en las células. III. Células transformadas en ascas mostrando sus ascosporas adultas. IV. Esporas libres reunidas en grupos, algunas se notan hinchadas; asimismo, se notan dos ascas cuya pared se está disolviendo y dejando libres a las ascosporas. V. Esporas hinchadas y lanzando sus prolongaciones protoplásmicas por las que se conjugan. VI. Esporas conjugándose por medio de un canal de copulación y formando huevos. VII. Huevos generando brotes por distintas partes de la superficie. VIII. Huevos con sus brotes transformados en ascas, cuando se hacen germinar las esporas en medios pocos nutritivos. IX. Esporas que no logran conjugarse lanzando varias prolongaciones protoplásmicas. X. Esporas que han intentado conjugarse y sin lograrlo germinan sin copulación, dando brotes especialmente por la extremidad de sus prolongaciones protoplásmicas. (Prep. y dibujo de M. Ruiz O.)

ando libres a las ascosporas. V. Esporas hinchadas y lanzando sus prolongaciones protoplásmicas por las que se conjugan. VI. Esporas conjugándose por medio de un canal de copulación y formando huevos. VII. Huevos generando brotes por distintas partes de la superficie. VIII. Huevos con sus brotes transformados en ascas, cuando se hacen germinar las esporas en medios pocos nutritivos. IX. Esporas que no logran conjugarse lanzando varias prolongaciones protoplásmicas. X. Esporas que han intentado conjugarse y sin lograrlo germinan sin copulación, dando brotes especialmente por la extremidad de sus prolongaciones protoplásmicas. (Prep. y dibujo de M. Ruiz O.)

Las ascas encierran por lo común cuatro ascosporas, aunque existen algunas con dos y tres; éstas son esféricas y con un diámetro que oscila entre 2.5 y 3.5 micras. Las ascosporas quedan libres por reabsorción de la membrana del asca, lo cual puede efectuarse por la parte lateral o por uno de los extremos.

En la germinación de las ascosporas se nota claramente un proceso sexual, pues una vez libres éstas y en medio apropiado, lanzan prolongaciones protoplásmicas por las cuales se unen dos a dos, integrándose así un canal de copulación y se forma el huevo, el cual genera gran cantidad de brotes por toda la superficie. Muchas ascosporas lanzan prolongaciones pero no logran unirse y entonces generan brotes por diversos sitios. Existen aún otras, que ni siquiera hacen tentativas para conjugarse y producen brotes como una célula vegetativa común. La germinación en estos dos últimos casos, se hace entonces, por partenogénesis.

Las temperaturas límites y óptima para la esporulación se determinaron en tubos con gelosa al 5%, medio poco nutritivo y, por lo mismo, las ascosporas se forman rápidamente. Los resultados obtenidos fueron: temperatura mínima, 6° a 8°; óptima 25° a 26°, y máxima, 37°

Caracteres bioquímicos.—Se hicieron únicamente las pruebas de fermentación obteniéndose los siguientes resultados:

glucosa	+	Sacarosa	+	inulina	—
levulosa	+	maltosa	+	almidón	—
manosa	+	lactosa	—	dextrina	—
galactosa	+	rafinosa	+	arabinosa	—

Se le ha dado el nombre de **Saccharomyces carbajali**, en honor del ilustre doctor **Carbajal**, investigador mexicano que fué el primero que clasificó estas levaduras en su género correspondiente.

PICHIA BARRAGANI n. sp.

Purificación del cultivo: por medio de cultivos sucesivos en aguamiel adicionado de ácido láctico.

Aislamiento de la cepa pura: por el método de las "pequeñas gotitas" de Lindner, en aguamiel y mosto de cerveza líquidos.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios líquidos.— En mosto de cerveza, a las 24 horas y a 16° - 18° C., se forman pequeños islotes en la superficie: a los tres días se obtiene un velo membranoso muy plegado, seco, opaco y de color blanco grisáceo que después se torna moreno; a los 35 días desaparece el velo y sólo quedan islotes. A los tres días se forma un anillo seco, sin brillo

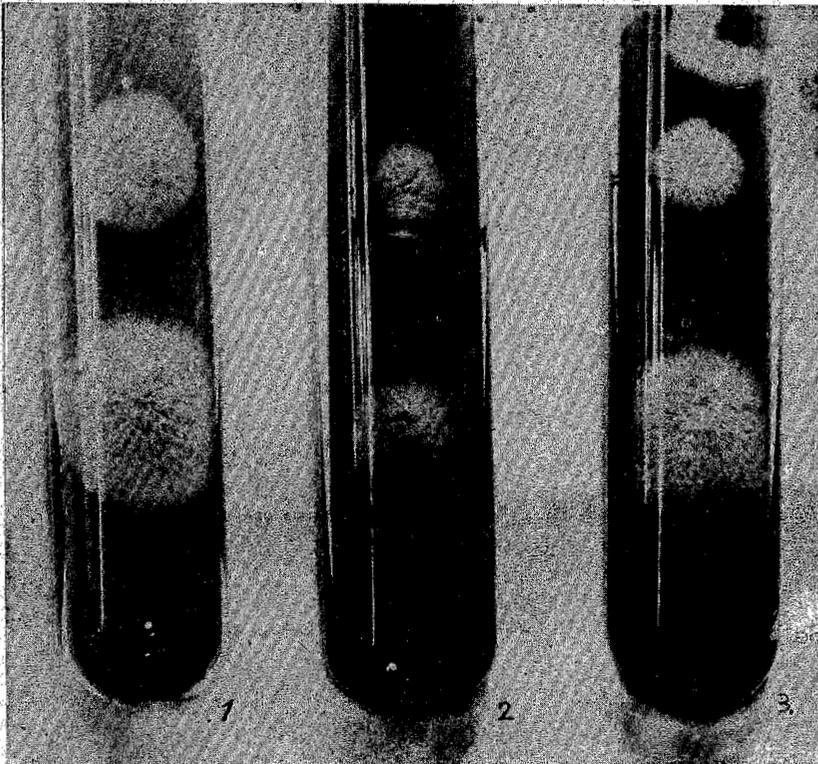


Fig. 25.—Cultivos en medios sólidos de *P. barragani* (16 días): 1.—Aguamiel gelosado; 2.—Sabouraud; 3.—Mosto gelosado. (Prep. de M. Ruiz O. Fot. I. Laríos).

y de color blanco grisáceo. El depósito es muy abundante, no hay enturbiamiento, ni fermentación. En aguamiel líquido se obtienen los mismos caracteres anteriores y en caldo lactosado y Raulin se forman solamente islotes, no se integra anillo y el depósito es muy escaso.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios sólidos.—

En mosto gelosado, a los 10 días y a temperatura de laboratorio, se obtienen colonias de forma circular, superficie rugosa y con estrías en la periferia, elevación convexa, bordes ondulados, color blanco grisáceo, opacas y sin brillo.

En mosto gelatinado, las colonias son circulares u ovales, con el centro deprimido, bordes aserrados, color blanco grisáceo sin brillo y que a los 130 días licúan ligeramente el medio. En agua-

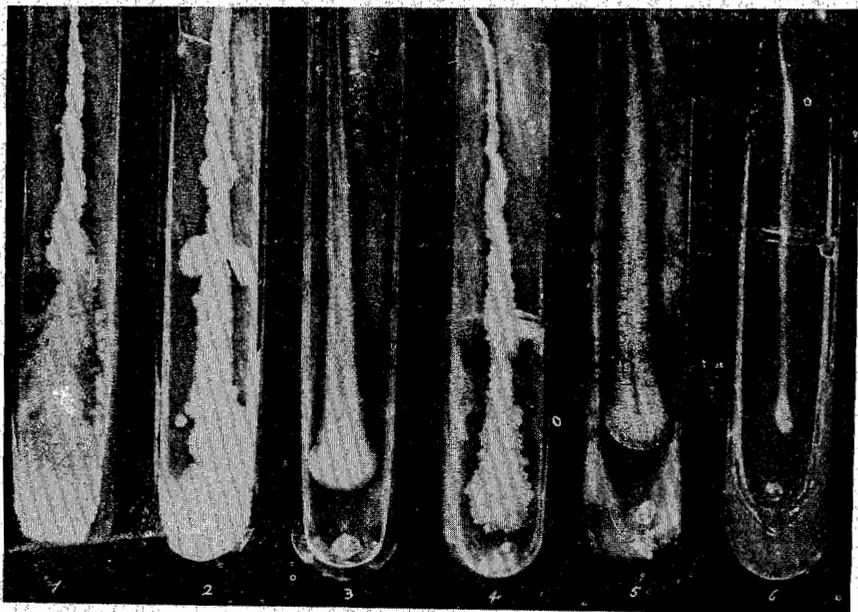


Fig. 26.—Cultivos en estria de *P. barragani* (25 días): 1.—Mosto gelosado; 2.—Aguamiel gelosado; 3.—Aguamiel gelatinado; 4.—Sabouraud; 5. Raulin gelatinado; 6.—Gelosa (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

miel gelosado y gelatinado, los caracteres son más o menos semejantes que los citados para los medios anteriores. En gelosa, gelatina y patata, la superficie es lisa.

Los cultivos en estría, en los diversos medios de cultivo muestran caracteres semejantes: forma equinulada, bordes dentados, aserrados, carcomidos y auriculados, superficie rugosa y en algunos se

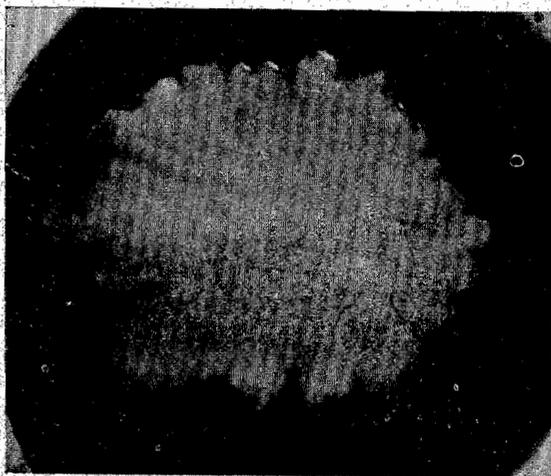


Fig. 27.—Colonia gigante de *P. baragani* en agua-miel gelosado (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

forman estrías en la periferia. En gelosa y gelatina los cultivos tienen desarrollo muy escaso, forma filiforme, superficie lisa, opalescentes y de bordes enteros.

El desarrollo en picadura muestra, según los diversos medios utilizados, formas arborescente, equinulada, rizoide y filiforme y en general, los cultivos son bastante raquíticos a lo largo del piquete. En los medios con gelatina, se inicia una ligera licuefacción entre los 25 y 30 días.

Colonias gigantes.—En mosto gelosado, a los 30 días y a tem-

peratura de laboratorio, se obtienen colonias de forma circular con lóbulos anchos en la periferia, superficie rugosa, elevación convexa con el centro un poco hundido, bordes finamente ondulados, color blanco grisáceo con ligero tono amarillento, opacas y sin brillo. En aguamiel gelosado, su forma es irregular con grandes lóbulos en la periferia, superficie rugosa con finas estrías radiales en la periferia, elevación convexa con el centro elevado, bordes dentados, color blanco grisáceo, opacas y sin brillo. En Sabouraud las colonias

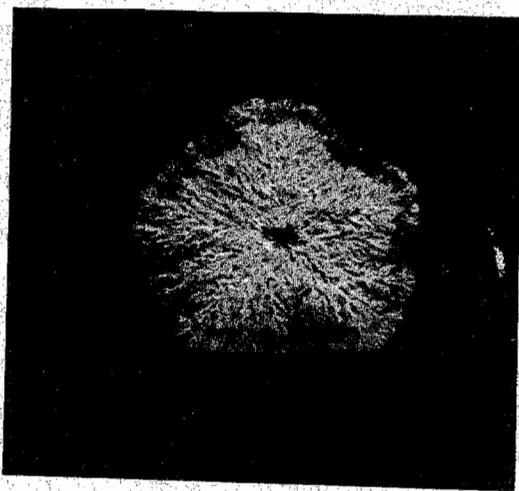


Fig. 28.—Colonia gigante de *P. barragani* en mosto gelosado (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

son circulares o rizadas, superficie rugosa con estrías arborescentes, elevación plana, bordes dentados, opacas y sin brillo. En gelatina la forma es irregular, superficie lisa, elevación extendida, bordes enteros, color blanco grisáceo, translúcidas, brillo regular y una leve hincufacción a los 30 días. En zanahoria la forma es irregular, superficie rugosa en el centro, periferia lisa, elevación plana, bordes finamente ondulados, color grisáceo, opacas y con un leve brillo. En patata la forma es irregular, superficie levemente ondulada, ligera-

mente húmeda y con brillo mediano. Las colonias adquieren gran desarrollo en mosto y aguamiel gelosados; desarrollo mediano en Sabouraud, patata y zanahoria, y en cambio son pequeñas en los medios gelatinados, especialmente en la gelatina.

Caracteres microscópicos de las células.—En mosto de cerveza, a las 48 horas y a temperatura de laboratorio, muestran las células formas ovales, elípticas y algunas alargadas; pocas se encuentran aisladas, pues la mayoría forman cadenas con ramificaciones la-

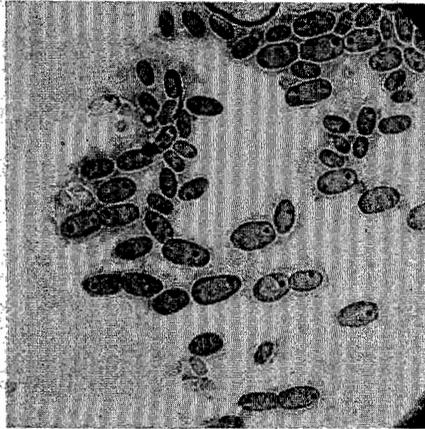


Fig. 29.—Microfotografía de *Pichia barragani* en mosto gelatinado a las 48 horas de cultivo. (Prep. de Ruiz O.; Fot. I. Larios).

terales. Los brotes son por lo común unipolares, pero también se notan algunos bipolares y otros laterales. El citoplasma es oscuro y sin granulaciones. La mayoría de las células tienen de 1 a 3 vacuolas grandes, de contenido apenas distinto al citoplasma, de manera que es difícil distinguirlas. En todas las vacuolas se observan uno o dos glóbulos de grasa muy pequeños y con movimiento browniano. Al principio, aparecen uno o dos glóbulos de grasa muy pequeños pero después aumenta su tamaño y en algunas células,

su número. Muy pocos gránulos metacromáticos llegan a observarse hasta los 20 ó 30 días. Como dimensiones medias, alcanzan de 7 a 8 micras de longitud, por 4 a 5 micras de anchura; ciertas formas alargadas llegan a tener 10 a 16 micras de largo.

Las células observadas en el depósito son muy semejantes a las obtenidas en el velo; sin embargo, existen mayor número de grupos y cadenas, siendo éstas más largas y con mayor número de

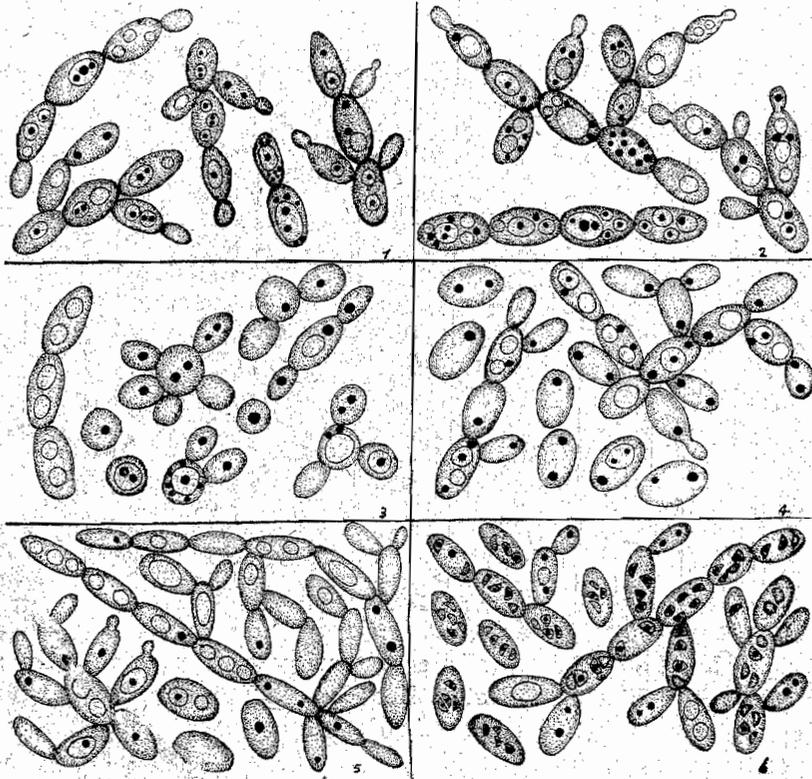


Fig. 30.—Aspecto que muestran las células de *Pichia barragani* en diversos medios de cultivo. 1.—Mosto de cerveza (48 horas). 2.—Aguamiel simple (48 horas). 3.—Gelatinizado (50 horas). 4.—Mosto gelosado (48 horas). 5.—Patata (10 días). 6.—Células en aguamiel simple mostrando sus ascas y ascosporas (30 días). (Prep. y dibujo de M. Ruiz O.)

ramificaciones laterales; algunas células alcanzan hasta 20 micras de longitud.

En todos los demás medios de cultivo empleados, tanto líquidos como sólidos, se encontraron caracteres de las células semejantes a los ya anotados y sólo en algunos de ellos se observaron ligeras diferencias que no creemos sean dignas de anotar en este corto trabajo.

Temperaturas límites y óptima del crecimiento.—Velo y anillo. Las experiencias se efectuaron en tubos con mosto de cerveza y aguamiel líquidos, obteniéndose los siguientes resultados: temperatura mínima 10°—12° C.; óptima, 27°—30° C.; y máxima 36°—38° C.

Brote.—Las experiencias se hicieron en tubos con mosto y aguamiel gelosados. Los resultados fueron los siguientes: temperatura mínima, 3°—5° C.; óptima, 27°—29° C.; y máxima 38°—40° C.

Esporulación.—En los medios de cultivo más usados, como mosto, caldo, Raulin, gelosa, gelatina, etc., no se obtiene esporulación; ni en los medios especiales para dicho objeto como Gorodkowa, patata, zanahoria y discos de yeso. Se recurrió entonces al medio sobre el cual viven las levaduras en la naturaleza, que es el aguamiel; se forman algunas ascas, pero sus ascosporas no se notan con claridad. En vista de estos resultados tan poco satisfactorios, se utilizó aguamiel tindalizado, único medio en el cual logramos obtener con toda precisión las ascas con sus ascosporas. Las ascas se forman, en su mayoría, a expensas de células que están aisladas. Aunque pueden contener de 1 a 4 ascosporas, la cifra más común es 4; en pocos casos el número es mayor. Las ascosporas son de forma hemisférica, en raras ocasiones ovoides y triangulares; su contenido es muy claro y transparente, de manera que es muy difícil distinguirlas in vivo; poseen la mayoría un glóbulo de grasa y alcanzan de dimensiones de 1 a 1.5 micras en su diámetro mayor.

Las ascosporas quedan libres, una vez que han llegado a la madurez, por el rompimiento de la membrana del ascá. En estas condiciones, las ascosporas inician su germinación, para lo cual se

hinchon, aumentan de dimensiones, toman forma ovoide o esférica y generan brotes de manera semejante a las células vegetativas.

Caracteres bioquímicos.—Se hicieron únicamente las pruebas de fermentación, obteniendo los siguientes resultados:

Glucosa	—	Sacarosa	—	Inulina	—
Levulosa	—	Maltosa	—	Almidón	—
Manosa	—	Lactosa	—	Dextrina	—
Galactosa	—	Rafinosa	—	Arabinosa	—

Se le ha dado el nombre de **Pichia barragani**, en honor del ilustre investigador, **doctor José Barragán**, quién fué el primero que observó las levaduras del pulque en el año de 1870.

TORULOPSIS HYDROMELITIS n. sp.

Purificación del cultivo: por medio de cultivos sucesivos en aguamiel adicionado de ácido láctico.

Aislamiento de la cepa pura: por el método de las "pequeñas gotitas" de **Lindner** en aguamiel y mosto de cerveza líquidos.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios líquidos.—

En mosto de cerveza, a las 48 horas y a 25° C., se esboza apenas la formación de un anillo, el cual completa su desarrollo hasta los 4 días. Es muy fino, delgado, transparente y de color blanco grisáceo; después de los 20 días el color se torna moreno. El sedimento se observa desde las 48 horas y llega a ser muy abundante a los 30 días, en que toma un color moreno oscuro. En ningún caso se forma velo y sólo a los 20 días se notan pequeños islotes que a los 30 días alcanzan su máximo desarrollo y llegan a cubrir casi toda la superficie; tienen un aspecto mucoso y un color grisáceo que después se torna moreno grisáceo y moreno oscuro. Se produce una ligera fermentación y un enturbiamiento que persiste durante mucho tiempo.

En aguamiel líquido se obtienen caracteres semejantes a los anteriores con excepción a los siguientes: los islotes se forman hasta los 60 días, son muy pequeños, apenas visibles a simple vista,

de color moreno grisáceo y pronto desaparecen; el anillo y depósito obtenidos alcanzan escaso desarrollo.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios sólidos. —

En mosto gelosado, a los 10 días y a temperatura de 25° C., se obtienen cultivos de forma circular, superficie lisa con algunas estrías radiales, elevación plana, bordes enteros, color blanco grisáceo, opacas y de brillo intenso. A los 30 días se forman numerosas estrías radiales y poco profundas en la superficie, el centro se eleva y aparecen pequeñas granulaciones en el mismo, los bordes se tornan dentados o aserrados, el color se conserva en la perife-

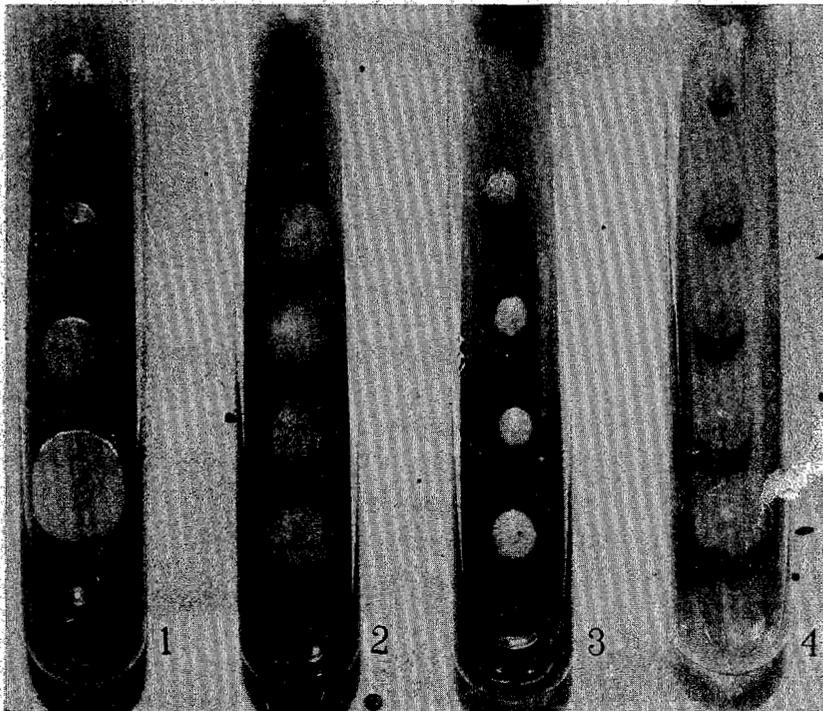


Fig. 31.—Cultivos en medios sólidos de *T. hydromelitidis* (20 días): 1. Aguamiel gelosado; 2. Mosto gelosado; 3. Aguamiel gelatinado; 4. Gelatina. (Prep. de M. Ruiz O., Est. I. Larios).

ria, pero en el centro se nota amarillento; a los 3 meses el color se torna moreno amarillento.

En aguamiel gelosado, las colonias circulares son de superficie lisa, planas, de bordes enteros y color moreno amarillento. En mosto gelatinado son circulares, levemente convexas con el centro elevado, superficie con estrías radiales, bordes ondulados, escaso brillo, opacas y de color moreno grisáceo. En aguamiel gelatinado



Fig. 32.—Cultivos en estaca de *T. hydromelitis* (30 días): 1. Mosto gelosado; 2.— Aguamiel gelosado; 3.— Gorockowa. (Prep. de M. Ruiz O.; * I. Larios)

vexa, bordes ondulados y recortados, color moreno amarillento, opacas y con poco brillo. En aguamiel gelosado las colonias de forma equinulada poseen gran número de estrías paralelas en la superficie, la cual es levemente convexa, de bordes ondulados y recortados, color moreno amarillento, opacas y con muy poco brillo. En mosto gelatinado la forma equinulada es muy extendida y la superficie rugosa y cruzada por numerosas estrías en todas direcciones; la co-

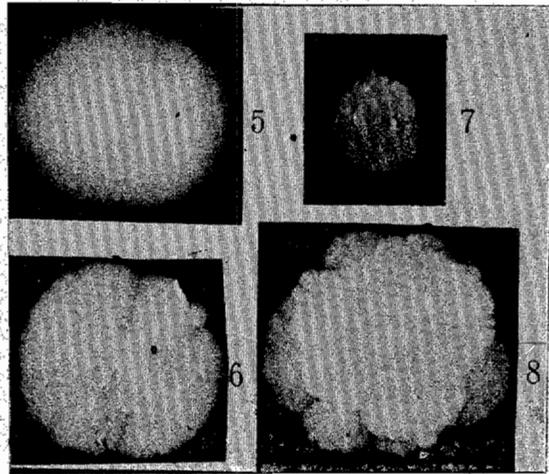


Fig. 34.—Colonias gigantes de *T. hydromelitis*.— 5. Colonia gigante en mosto gelatinado (30 días). 6. Colonia gigante en aguamiel gelatinado (30 días). 7.—Colonia gigante en gelatina (30 días). 8.—Colonia gigante en medio de Gorodkova (30 días). (Prep. de M. Ruiz O., Fot. I. Larios).

lonia por su elevación es plana, con el centro elevado, bordes ondulados, opaca, con brillo intenso y de color moreno grisáceo. En aguamiel gelatinado la forma equinulada es poco extendida; en gelatina y Gorodkova las colonias son filiformes, con superficie plana, color blanco lechoso, opalescentes y con intenso brillo.

Los cultivos en picadura muestran, a los 30 días, los siguientes caracteres: en mosto gelosado, la forma es equinulada; el cultivo

son circulares, con superficie granulosa y provista de estrías poco marcadas; con el tiempo las granulaciones superficiales se hacen más numerosas y aumentan de dimensiones; la elevación es convexa, bordes finamente ondulados, color blanco grisáceo, opacas y de brillo intenso. En gelatina la superficie tiene estrías radiales en corto número y poco profundas, su elevación es plana, un poco elevada en el centro, bordes finamente ondulados, color blanco grisáceo, opalescentes y con poco brillo. En fragmentos de patata

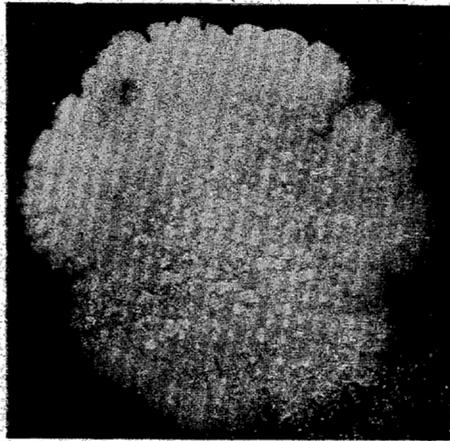


Fig. 33.—Colonia gigante en mosto gelosado de *T. hydromelitis* (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

las colonias circulares poseen superficie rugosa, con algunas estrías radiales bien marcadas, elevación plana, bordes lobulados, color moreno y sin brillo. En fragmentos de zanahoria la forma es irregular, superficie levemente granulosa, elevación convexa, bordes auriculados, color blanco grisáceo y con intenso brillo.

Los cultivos en estria poseen los siguientes caracteres, según los medios de cultivo: en mosto gelosado, a los 30 días y a 25° C., muestran forma equinulada superficie rugosa con numerosas estrías paralelas colocadas del centro a la periferia, elevación con-

opaco y se nota ligera fermentación lo que se deduce por las numerosas burbujas que se forman. En aguamiel gelosado el crecimiento es arborescente, especialmente en la base, opaco y sin fermentación; su desarrollo es menos abundante que en el medio anterior. En mosto gelatinado, aguamiel gelatinado y Gorodkowa, las colonias adoptan forma vellosa y son opacas en los dos primeros medios y translúcidas en el último. En gelatina el crecimiento es filiforme y translúcido.

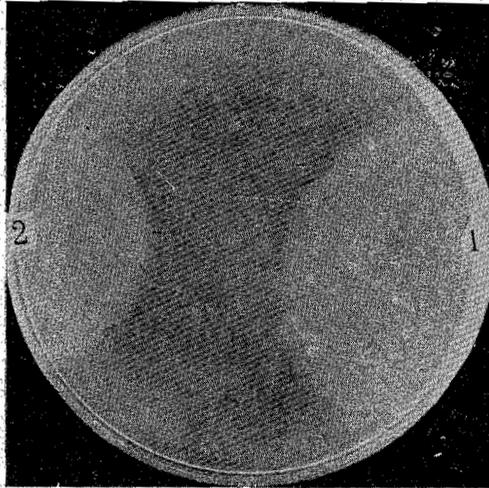


Fig. 35.—Auxanograma de la asimilación de sustancias nitrogenadas con *T. hydromelitis*. 1. Urea; 2. Asparagina. (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

Las colonias gigantes, en mosto gelosado, a los 30 días y a 25° C., tienen forma circular y a veces irregular con lóbulos anchos y poco profundos, superficie levemente ondulada con la parte central granulosa y en la periferia estrías radiales muy finas, elevación convexa, bordes ondulados, color moreno amarillento con la periferia grisácea, opacas y con intenso brillo.

En otros medios empleados, la forma de las colonias es circu-

lar o irregular, la superficie lisa, con algunas estrías radiales poco marcadas, o granulosa, elevación plana o convexa, bordes recortados u ondulados, translúcidas, opalescentes u opacas y el brillo intenso, mediano o ausente.

Caracteres microscópicos de las células.—En mosto de cerveza, a las 48 horas y a 25° C., las células tienen forma esférica, elíptica y, algunas alargada; a los 10 días la mayor parte son ovales;

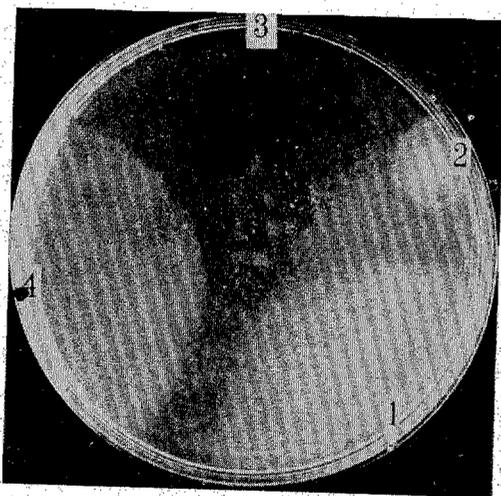


Fig. 36.—Auxanograma de la asimilación de sustancias nitrogenadas con *T. hydromelitis* 1. Sulfato de amonio; 2. Peptona; 3. Nitrito de potasio (no fué asimilado); 4. Sulfato de amonio. (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. L. Larios).

a los 30 días las alargadas son muy numerosas y a los 3 meses se integran abundantes y grandes cadenas de células, aunque casi todas éstas viven aisladas, o sea, sin reunirse en grupos o cadenas. Los brotes son en número de uno o dos; el citoplasma claro, transparente, homogéneo y sin granulecillas; en muy pocas células se nota una vacuola (a veces dos y tres) grande de contenido poco distinto al protoplasma y a los 10 días casi todas las células tienen una

vacuola pequeña o grande; las formas alargadas poseen mayor número de vacuolas. En los primeros días se notan pocas células con glóbulos de grasa, pero a los 10 días casi todas tienen un glóbulo junto a la vacuola. No se observan granos metacromáticos, ni ascas y ascosporas; las dimensiones oscilan entre 3 a 6 micras de longitud, por 2 a 5 de anchura, aunque puede haber algunas de mayores dimensiones.

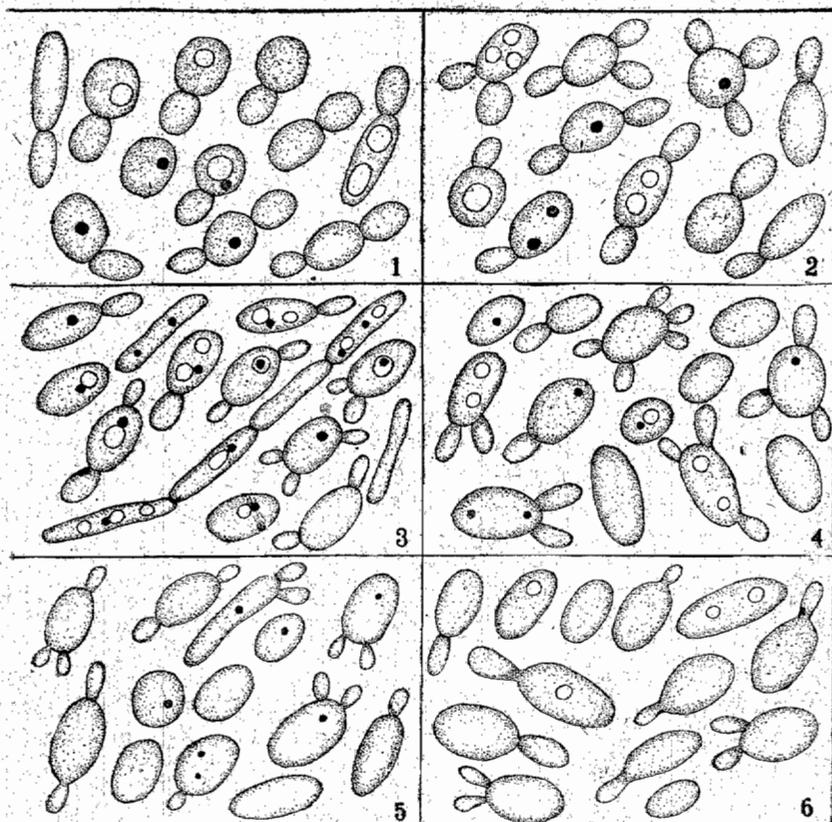


Fig. 37.—Aspecto que muestran las células de *Torulopsis hydromelitis* en diversos medios de cultivo: 1. Mosto de cerveza (48 horas); 2. Aguamiel simple (3 días); 3. mosto gelosado (8 días); 4. Aguamiel gelosado (3 días); 5. Gelatina (48 horas); 6. Mosto gelatinado (4 días). (Prep. y Dib. de M. Ruiz O.)

En aguamiel gelosado las células ovales o elípticas se muestran aisladas y muy pocas formando grupos; existen muy pocas esféricas; se integra por lo común un sólo brote, pero puede haber dos o más; el citoplasma es claro, transparente y sin granulaciones; al principio no hay vacuolas, pero después todas las células las poseen; sus dimensiones son más regulares que en el medio anterior. En los demás medios de cultivo, los caracteres son semejantes, notándose diferencias muy ligeras.

Temperaturas límites y óptima del crecimiento.—Las experiencias se efectuaron en tubos con mosto y aguamiel gelosados. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: temperatura mínima, 1° 3° C.; óptima, 30°-32° C.; máxima 40°-42° C.

Caracteres bioquímicos.

Licuefacción de la gelatina: resultados completamente negativos a los 90 días.

Fermentación:

Dextrosa	+	Lactosa	—
Levulosa	+	Sacarosa	—
Manosa	+	Maltosa	—
Galactosa	+	Rafinosa	—

Asimilación del nitrógeno.

Nitrato de potasio	—	Asparagina	+
Sulfato de amonio	+	Peptona	+
	Urea		+

Alcohol etílico como substrato de crecimiento.—A los 8 días el crecimiento es muy raquítico; a los 30 días alcanza un desarrollo regular.

A esta levadura se le ha dado el nombre de **Torulopsis hydromelitidis**, debido a que fue aislada del aguamiel del maguey que se emplea para elaborar pulque.

TORULOPSIS AQUAMELLIS n. sp.

Purificación del cultivo: por medio de cultivos sucesivos en aguamiel adicionado de ácido láctico.

Aislamiento de la cepa pura: por el método de las "pequeñas gotitas" de Lindner, en aguamiel y mosto de cerveza líquidos.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios líquidos.—

En mosto de cerveza, a las 48 horas y a temperatura de 25° C., se observa un depósito con desarrollo muy escaso y de color moreno; a los 20 días el crecimiento es mayor, pero en ningún caso llega a ser abundante. A los 5 días se inicia la formación de un anillo, cuyo desarrollo se completa a los 9 días, y el cual es delgado, fino, transparente y de color blanco grisáceo; a los 20 días toma color moreno blanquizco y se hace opaco; a los 30 ó 40 días, se torna moreno amarillento. Por lo que se refiere al crecimiento en la superficie, se nota, que a las 20 días se forman pequeños islotes de velo de color grisáceo; a los 30 días los islotes se han extendido y casi cubren toda la superficie del medio, tomando un color moreno amarillento. Entre los 45 y 60 días se integra un velo mucoso, brillante, denso y de color moreno oscuro. No se observa fermentación y sí en cambio un ligero enturbiamiento del medio hasta los 30 y 40 días, después de los cuales el medio se torna límpido y transparente.

En aguamiel líquido y a 25° C., el anillo se comienza a formar hasta los 7 días, notándose al principio pequeñas colonias aisladas en las paredes del tubo; a los 10 días el anillo completa su formación, siendo translúcido y de color grisáceo; a los 30 días, ciertos sitios del anillo se vuelven opacos y de color moreno amarillento; a los 50 días todo el anillo es opaco y de color moreno oscuro. Los islotes de velo se comienzan a formar hasta los 30 días, y son de color moreno amarillento; entre los 45 y 50 días se integra un velo mucoso, brillante, de superficie granulosa y color moreno claro. El sedimento presenta, a los 30 días, los mismos caracteres que los observados en el sedimento obtenido en mosto de cerveza, pero a los 50 días, se nota muy abundante y de color moreno obscuro. No hay fermentación y en lo que respecta al enturbiamiento, el medio es claro y transparente hasta los 30 días en que se nota un ligero enturbiamiento que en pocos días desaparece.

Caracteres macroscópicos de los cultivos en medios sólidos.—

En mosto gelosado, a los 10 días y a 25° C., las colonias muestran

forma circular, superficie lisa con algunas estrías muy finas que irradian del centro a la periferia, elevación convexa y pulvinada, bordes enteros, color moreno oscuro, opacas y con brillo regular. A los 60 días la superficie se torna muy rugosa, los bordes ondulados, se pierde el brillo y el color moreno se hace más oscuro.

En aguamiel gelosado, las colonias circulares tienen superficie lisa con estrías radiales, elevación convexa, bordes enteros, poco brillo y son opacas.

En mosto gelatinado la forma es circular, superficie lisa con estrías en la periferia apenas visibles y que no llegan al centro, elevación convexa y algo pulvinada, bordes enteros, sin brillo, opacas, y a los 15 días se nota una ligera licuefacción que a los 30 días es completa.

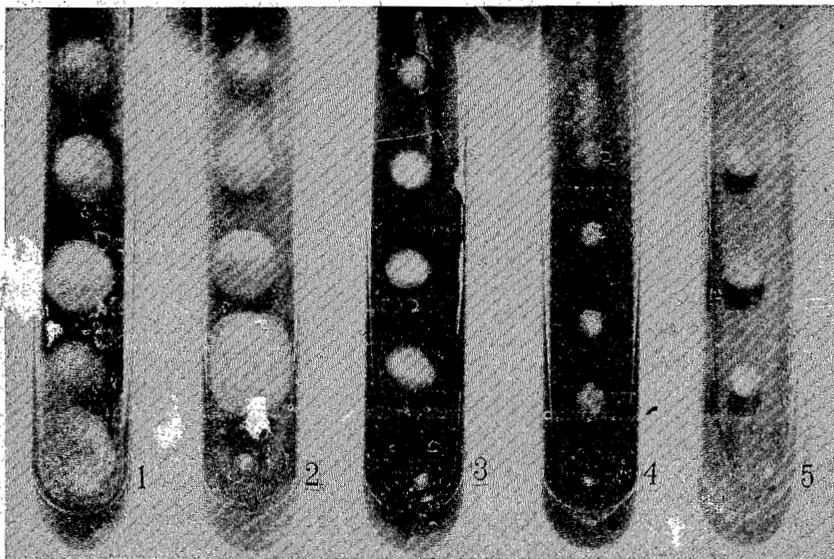


Fig. 38.—Cultivos en medios sólidos de *T. aquamellis* (20 días): 1.—Mosto gelosado; 2.—Aguamiel gelosado; 3.—Mosto gelatinado; 4.—Aguamiel gelatinado; 5.—Gelatina. (Prep. de M. Ruiz O.; Fet. I. Larios).
Ruiz O.; Fot. L. La (o).

En aguamiel gelatinado la forma es circular, superficie surcada por numerosas estrias muy finas dispuestas en radios, elevación convexa, bordes irregularmente ondulados, opalescentes, con brillo y una ligera licuefacción que se acentúa con el tiempo.

En gelatina la licuefacción se inicia hasta los 30 días y las colonias son circulares, de superficie lisa, ligeramene convexas, opalescentes y con poco brillo.

Los cultivos en estria, muestran los siguientes caracteres: en mosto gelosado a 25° C. y a los 30 días, la forma es extendida,

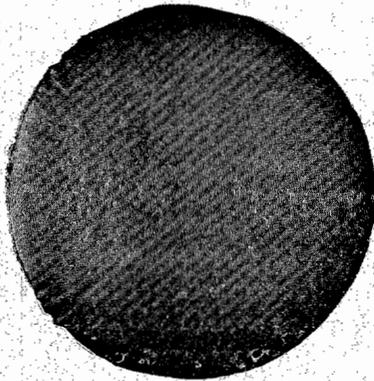


Fig. 39.—Colonia gigante en aguamiel gelosado de *T. aquamellis* (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

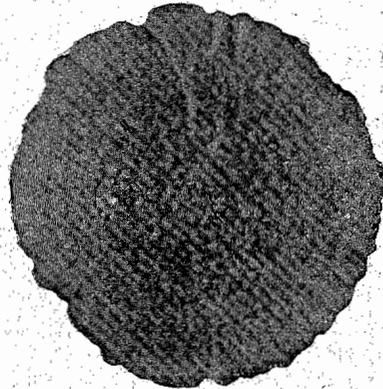


Fig. 40.—Colonia gigante en mosto de Gorodkova de *T. aquamellis* (30 días). (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Larios).

abarcando todo el ancho del tubo, superficie rugosa en el centro y lisa en la periferia, elevación convexa, bordes ondulados, opacas, con brillo regular y de color moreno oscuro. En aguamiel gelosado, la forma es equinulada, superficie muy rugosa, especialmente en el centro y se forman pequeños orificios que después se hacen más grandes; elevación umbonada, bordes ondulados, color moreno oscuro, opacas y con brillo mediano. En mosto gelatinado tienen forma equinulada, superficie lisa, elevación convexa, bordes enteros, color moreno amarillento y muy brillantes. En aguamiel gela-

tinado la forma es equinulada, superficie lisa, brillo intenso y se efectúa ligera licuefacción. En gelatina y Gorodkova encontramos caracteres semejantes a los ya anotados, a excepción de los siguientes: elevación plana, bordes ondulados y color blanco grisáceo; en gelatina el crecimiento es filiforme y hay ligera licuefacción; en Gorodkova la forma es equinulada.

Los cultivos en picadura muestran, entre los 15 y 30 días, los siguientes caracteres: en mosto gelosado el crecimiento es filiforme y translúcido; a las 24 horas se nota el desarrollo a lo largo del piquete, pero en ningún caso llega a ser abundante; en aguamiel gelosado las colonias filiformes son opalescentes y el desarro-

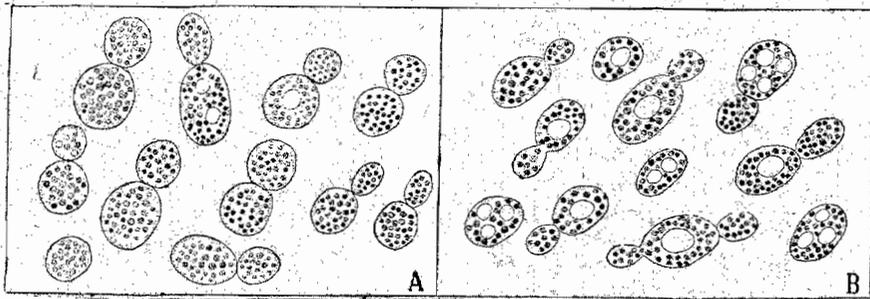


Fig. 41.—Aspecto que muestran las células de *Torulopsis aquamellis*.—A.—Mosto de cerveza (48 horas); B.—Mosto gelosado (3 días). (Prep. y dib. de M. Ruiz O.)

llo es semejante al del medio anterior. En mosto gelatinado el crecimiento es filiforme, translúcido y a los 15 días se inicia una licuefacción del medio, que es casi completa a los 45 días; el desarrollo es muy raquítico. Seemjantes caracteres a los anteriores, se notan en aguamiel gelatinado y gelatina, sólo que en ésta última la licuefacción se inicia a los 30 días. En medio de Gorodkova los cultivos son transparentes y filiformes.

Colonias gigantes.—En mosto gelosado, a 25° C., y en 30 días, la forma es circular, superficie granulosa, elevación pulvinada, bordes ondulados, color moreno obscuro, opaca y con intenso brillo.

En aguamiel gelosado la elevación es pulvinada, superficie

granulosa o lisa y con numerosas estrias radiales y poco profundas en la periferia, con brillo, y color moreno que en el centro es levemente amarillento.

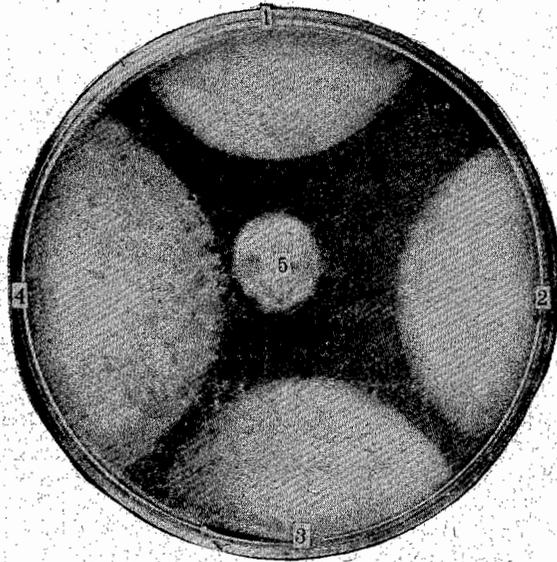


Fig. 42.—Auxanograma de la asimilación de sustancias nitrogenadas con *T. aquamellis*. 1.—Sulfato de amonio; 2.—Asparagina; 3.—Úrea; 4.—Nitrato de potasio; 5.—Peptona. (Prep. de M. Ruiz O.; Fot. I. Laríos).

En gelatina la forma es circular o irregular, superficie lisa con algunas estrias radiales poco visibles, elevación plana, centro un poco levantado, bordes ondulados, color moreno grisáceo, brillo intenso y ligera licuefacción.

En medio de Gorodkova la superficie es muy granulosa y con estrias radiales y muy finas en la periferia; su color es moreno amarillento y solamente se nota una delgada faja en la periferia que es moreno grisáceo; las colonias son opalescentes y carecen de brillo.

Caracteres microscópicos de las células.—En mosto de cerveza, a las 48 horas y a 25° C., se notan células en su mayoría circulares y algunas ovales; a los 10 días aparecen algunas elípticas. No llegan a formarse cadenas, conservándose las células aisladas durante todo el tiempo que dure el cultivo. Los brotes son unipolares; el citoplasma obscuro y muy granuloso; en pocas células se notan

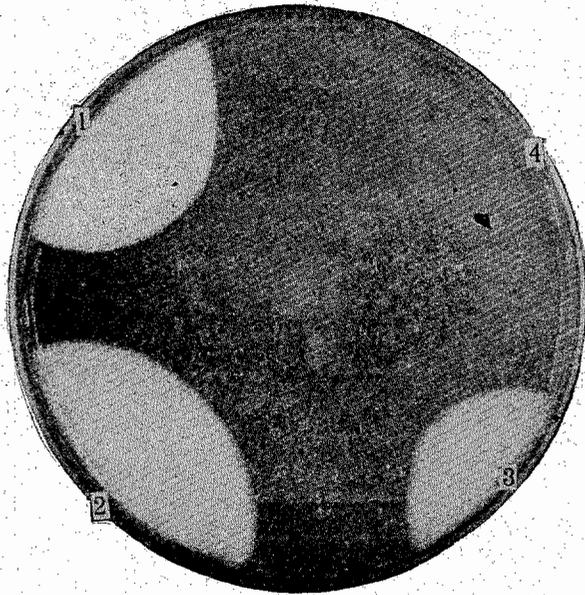


Fig. 43.—Auxanograma de la asimilación de azúcares con *T. squamellis*. 1.—Dextrosa; 2.—Levulosa; 3.—Manosa; 4.—Galactosa (no fué asimilada). (Prep. de M. Ruíz O.; Fot. I. Larios).

una o dos vacuolas pequeñas o grandes; los glóbulos de grasa son muy numerosos, pequeños y sólo después de varios días aumentan de dimensiones; muy pocos gránulos metacromáticos se notan durante todo el tiempo del cultivo. Dimensiones: esféricas de 4 a 7 micras de anchura; ovales: 5 a 8 micras de longitud, por 4 a 7 de anchura.

En aguamiel simple los caracteres de las células son muy semejantes a los anteriores, aunque existen mayor número de formas elípticas.

En mosto gelosado las células son principalmente ovales, aunque de los 10 días en adelante predomina la forma esférica; las células están aisladas y con un sólo brote; se nota una vacuola gran-

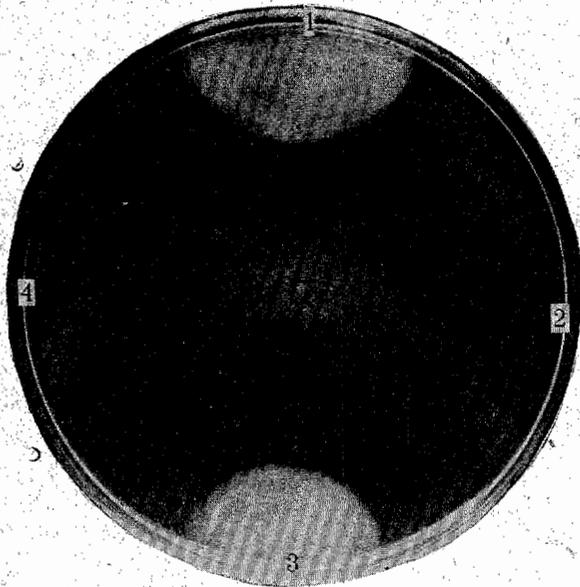


Fig. 44.—Auxanograma de la asimilación de azúcares con *T. aquamellis*. 1.—Sacarosa; 2.—Lactosa (no fué asimilada); 3.—Maltosa; 4.—Rafinosa (no fué asimilada). (Prep. de M. Ruiz C. Fot. I. Larios).

de apenas distinta del citoplasma; los glóbulos de grasa son muy numerosos y pequeños. Las dimensiones son semejantes a las ya anotadas.

En los demás medios de cultivos utilizados, los caracteres son muy parecidos a los ya indicados y sólo existen leves diferencias que no ameritan citarse.

Temperaturas límites y óptima del crecimiento.—Las experiencias se efectuaron en tubos con mosto y aguamiel gelosados. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: temperatura mínima, 0°-2° C.; temperatura óptima, 24°-26° C.; temperatura máxima, 33°-35° C.

Caracteres bioquímicos.

Licuefacción de la gelatina: en mosto y aguamiel gelatinados se inicia la licuefacción a los 15 días, a los 30 es muy intensa y a los 45 es completa. En medio de gelatina pura, la licuefacción es menos intensa: se inicia a los 30 días y es completa hasta los 75.

Fermentación: resultados completamente negativos con todos los azúcares empleados: dextrosa, levulosa, manosa, galactosa, lactosa, sacarosa y maltosa.

Asimilación del nitrógeno (según método auxanográfico de Beijerinck).

Nitrato de Potasio	+	Peptona	+
Sulfato de amonio	+	Asparagina	+
	Urea		+

Asimilación de los azúcares (según método auxanográfico de Beijerinck).

Dextrosa	+	Sacarosa	+
Levulosa	+	Maltosa	+
Manosa	+	Lactosa	
Galactosa	—	Rafinosa	

Alcohol etílico con o su efecto sobre el crecimiento.—A los 15 días el crecimiento es muy raquítico; a los 30 días alcanza un crecimiento regular. Se asimila el alcohol etílico pero en pequeña cantidad y de manera muy lenta.

A esta especie nueva de levaduras, le hemos dado el nombre de **aquamellis**, debido a que fué aislada del aguamiel que produce el maguay pulquero.

BIBLIOGRAFIA

- ALMON, L., and STOVALL, W. D.—Serologic reactions of cultures of *Monilia* and of some other yeastlike fungi. *J. Inf. Dist. T.* 55, 1934, p. 12.
- BADIAN, J.—Sur la cytologie des levures.—*Bull. Int. Acad. Polon. Sc. et Lettres.* B. (1). No. 1-5 B 1, 1937, p. 61-87.
- BARRAGAN, J.—El *Cryptococcus* del Pulque.—*La Naturaleza.* T. 1, 1870, p. 288.—México.
- BEAMS, H. W., ZELL, L. W. y SULKIN, N. M.—Cytological studies on yeast cells special reference to the budding process.—*Cytologia.* V. 11, No. 1, 1940, p. 30-36.
- BERAUD, P.—Influence de la nutrition azotée sur le pouvoir respiratoire et le pouvoir fermentative d'une levure de boulangerie.—*Compt. Rend. des S. de la Soc. de Biol.*—T. CXXXI, 1939, p. 708-709.
- BOULARD, H.—*Etudes et Recherches sur les Levures.* Vigot Freres, Editeurs, Paris, 1915, p. 1-93.
- CAPITAIN, E.—Contribution à l'étude morphologique et physiologique des levures de poires. Thèse doctorat des Sciences, Lyon, 1930.
- CARBAJAL, A. J.—La fermentación racional del pulque. *Mem. y F. de la Soc. "Antonio Alzate".* T. 32, 1912, p. 219, México.
- CARBAJAL, A. J.—Estudio sobre el pulque, considerado principalmente desde el punto de vista zomotécnico. *Bol. Soc. Acti. Méx.* Nos. 33 y 34, 1912, p. 1-10.
- CASTELLI, T.—Sulla validità del genere *Torulopsis*.—*Archv. F. Mikrobiol.* V. 11, No. 2, 1940, p. 119-125.
- CASTELLI, T.—Considerazioni sulla *Torulopsis pulcherrima*.—*Archv. F. Mikrobiol.* V. 11, No. 2, 1940, p. 126-136.
- CIFERRI, R., and REDAELLI, P.—Monografia della *Torulopsidaceae* a pigmento rosso.—*Atti dell'Ist. Bot. R. Univ. Pavia.*—Vol. II, 1925, p. 147-303.
- CIFERRI, R., and REDAELLI, P.—Contribuzioni alla sistematica delle *Torulopsidaceae*.—*Archv. Mikrobiol.* V. 6, 1935, p. 9-72.
- CIFERRI, R., and VERONA, O.—A species of *Sporobolomyces* (*Nectaromyces*) isolated from man and revision of the genus. *Mycopathologia.* 1, 1938, p. 162-164.

- CONN, H. W.—Bacteria, Yeasts, and Molds in the Home.—Ginn and Company, Boston, 1912, p. 1-295.
- CORDROC' H. M.—Nouvelle espece de levure du genre Zygosaccharomyces: *Z. Ashbyii*.—Ann. des Ferment. T. 3, 1937, p. 87-104.
- DE ALMEIDA, F. e DA SILVA, J. C.—Estudo micológico sobre 6 amostras de Lévedo isoladas do Escarro.—Anais da Fac. Med. Univ. S. Paulo. V. XVI. T. I, 1940, p. 257-279.
- DERX, H.—Etude sur les Sporobolomycetes. Ann. Mycologici. V. 28, 1930, p. 1-23.
- DODGE, C. W.—Medical mycology.—C. V. Mosby Co., 1935, St. Louis.
- DODGE, C. W. and DODGE, B. S.—Some effects of methyl cholanthrene on the morphology and growth of yeasts.—An. Miss. Bot. Gard. V. 24, 1937, p. 583-590.
- DODGE, C. W. and DODGE, B. S. and JOHONSON, G. T.—Some effects of carcinogens on yeasts.—An. Miss. Bot. Gard. V., 28, 1941, p. 1-30.
- EMING, W. H.—The occurrence in Nature of certain yeast-like fungi with reference to their possible pathogenicity in the higher animals. An. Miss. Bot. Gard. V. 3, 1916, p. 243-307.
- FABIAN, F. W., and MC. CULLOUGH, N. B.—Dissociation in yeast.—J. of Bact. T. 27, 1934, p. 583.
- FANG SIN-FANG (TIEN-TSIN).—Etude de quelques levures isolées des levains chinois.—Rev. Mycologic. T. II, 1937, p. 169-177.
- FISHER, C. V., and ARNOLD, L.—Classification of Yeasts and Yeast-like Fungi. Distribution of mycological flore on normal skin and mucous membranes. University of Illinois Bulletin. V. XXXIII, 1936, No. 51 (Illinois med. and dental monographs, I, No. 3) p. 1-92. 10 láminas.
- GALVAO, J.—Comparacao entre os trabalhos do Laci-Delta em dois periodos de vida. Rev. Pernambucana de Chim. Anno II, No. VI.
- AVINO, A.—Micro-organismos del pulque.—Bol. Inst. Pat. T. I, p. 14 y 44. México.
- AVINO, A.—Estudio higiénico-bacteriológico del pulque.—Bol. Inst. Anat. Pat. y Quím. Méd. Quir. T. I, 1896, p. 246.—México.
- GENEVOIS, L. and CAHILL, P.—Sur les rapports entre fermentation et respiration chez les levures.—Ann. des Ferment. T. 1, 1935-1936, p. 361-369.
- GENEVOIS, L.—L'attaque des disaccharides par les levures. Ann. des Ferment. T. 3, 1937, p. 600-615.
- GLAUBITZ, M.—Atlas des organismes de fermentation. Traduit de l'allemand par R. Lancau. Ed. Uystpruyst, Louvain, 1936.
- GONCALVES DE LIMA, O.—Estudos sobre una levadura isolada em rhyzomas de Zingiber officinale, Rosc.—Jornal de Medicina de Pernambuco, No. 1, 1941, p. 1-12.
- GRAHAM, V. E. y HASTINGS, E. G.—Studies on Film-forming yeasts, I, Media and Methods. C. Jour. Res. V. 19, 1941, p. 251-256.
- GRAHAM, V. E. y HASTINGS, E. G.—Studies on Film-forming yeasts. II. Film-Forming Yeasts in Rennet Brine.—C. Jour. Res. Vol. 20, 1942, p. 63-67.

- GRAY, P. H.—A Solution for Staining Differentially the spores and Vegetative cells of Micro-organisms.—C. Jour. of Res. V. 19. 1941, p. 95-98.
- GRONCHI, V.—Influenza dei Reggi Röntgen sul potere fermentativo del "Saccharomyces cerevisiae". Boll. Inst. Sierot. Milanese. Vol. X, 1931, p. 759.
- GUILLIERMOND, A.—Levaduras del Pulque. Bol. de la Dir. de Est. Biol. Tomo II, 1917, p. 114.—México.
- GUILLIERMOND, A.—La sexualité, le cycle de développement, la phylogénie et la classification des levures. Masson et Cie. Editeurs, Paris, 1937, p. 1-72.
- GUILLIERMOND, A.—La coloration vitale des cellules des levures. Ann. Ferment. V. 5, 1940, p. 449-466.
- GUILLIERMOND, A.—Recherches cytologiques sur les Levures et quelques Moisissures à formes Levures. Paris, 1902, p. 1-289, con 12 láminas.
- GUILLIERMOND, A.—Sur la division nucléaire des levures. Ann. Inst. Past., 31, 1917, p. 107-113.
- GUILLIERMOND, A.—Zygosaccharomyces nadsonii: nouvelle espèce de levures à conjugaison hétérogamique.—Bull. de la Soc. Mycol. de France. T. 34, 2^o Fascicule, 1918.
- GUILLIERMOND, A.—The Yeasts.—Translated by F. Tanner. John Wiley and Sons, New York., 1920, p. 1-424.
- GUILLIERMOND, A.—Etude cytologique et taxonomique sur les levures du genre Sporobolomyces. Bull. Soc. Mycol. de France. V. 43, 1927, p. 245-258.
- GUILLIERMOND, A.—Cléf dichotomique pour la détermination des levures.— Libraire Le François, Paris, 1928, p. 1-124.
- GUILLIERMOND, A.—Sur la sexualité des levures et sur les relations de ces champignons avec les Exoascées.—Compt. Rend. S. A. Ac. des Sciences. T. 201, 1935, p. 1163.
- HARTELIUS, V.—The growth of yeast in synthetic media and the factors which limit this growth. Comp. Rend. des trab. L. Car. T. 20, 1934.
- HENRIC, —Molds, Yeasts, and Actinomycetes.—John Wiley and Sons, New York, 1930, p. 1-296.
- HILL, A. T.—The Yeasts: Genetics, Cytology, Variation, Classification and Identification. Bacteriological Reviews, V. 5, 1941, p. 97-179.
- HOLST, E. C.—Zygosaccharomyces pini, a new species of yeasts associated with bark beetles in pines.—J. Agric. Res. Vol. 53, No. 7, 1936
- HOPKINS, R. H., and ROBERTS, R. H.—The Kinetics of alcoholic fermentation of sugars by brewer's yeasts.—Biochem. Jour., T. 29, 1935, p. 919.
- KATER, J. M.—Cytology of Saccharomyces cerevisiae with special reference to nuclear division.—Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. V. LII, 1927, p. 436.
- KAYSER, E.—Les Levures.—Masson et Cie., Editeurs, Paris, 1905, p. 1-212.
- KUFFERATH, H.—Quelques expériences sur la sporulation des levures. Ann. de la Soc. Zymol. V. 2, 1930.
- KUFFERATH, H.—Recherches sur les Levures.—Ann. des Ferment. T. 1, 1935-1936.

- p. 46-50, 162-164.
- LANGERON, M. et GUERRA, P.—Nouvelles recherches de zymologie médicale.—*Ann. Parasitol.* T. 16, 1932, p. 36-84, 162-179, 429-476, 481-525, 481-525.
- LANGERON, M., et TALICE, R. V.—Nouvelles méthodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes. *Ann. de Paras.*—T. X, 1932, p. 1-80.
- LEONIAN, L. H. and LILLY, V. G.—The response of some yeasts to 5 different growth factors.—*J. Bact. Balt.* V. 43, 1942, p. 17
- LEVY, L.—*Microbes et Distillerie.*—Georges Carré et C. Naud, Editeurs. Paris, 1900, p. 1-323.
- LINDNER, P.—La importancia práctica y científica del estudio del pulque. *Rev. Mex. de Biol.* T. 6, 1926, p. 221.—México.
- LINDNER, P.—Resultados biológicos de un viaje de estudio a Méjico. *Investigaciones y Progreso*, Año VI, 1932, p. 98.
- LOCHHEAD, A. G.—*Zygosaccharomyces nectarophilus*, n. sp. and *Zygosaccharomyces rugosus*, n. sp.—*C. Jour. Research.* V. 20, No. 2, 1942, p. 89-91.
- LODDER, J.—*Torulopsis* or *Cryptococcus*? *Mycopathologia*, Vol. I., 1938, p. 62-67.
- LODDER, J.—Die Hefesammlung des "Centraalbureau voor Schimmelcultures". *Beitrage zu einer monographie der Hefearten*, II. Teil. Die Anaskosporenen Hefen. Erste Hälfte. Amsterdam, 1934, p. 1-256.
- LOHWAG, H.—*Sporobolomyces.*—Kein Basidiomyzet.—*Ann. Mycologici.*, V. 24, 1926, p. 194-202.
- MANEVAL, W. E.—Staining bacteria and yeasts with acid dyes.—*Stain Techn.* 16, p. 13-19. 1941, No. 1.
- MELLIGER, R.—Contribution à l'étude des ferments figurés et des fermentations de la datte. Thesis, Univ. of Geneva, 1931.
- MOREAU, L. et VINET, E.—Les levures sélectionnées en vinification.—*Ann. des Ferment.* T. 1, 1935-1936, p. 100-107.
- NADSON, G. A.—Sur les variations héréditaires provoquées expérimentalement chez les levures.—*C. R. Acad. Sciences.* T. 200, 1935, p. 1875.
- NICKERSON, W. J., and THIMANN, K. V.—The chemical control of conjugation in *Zygosaccharomyces*.—*Amer. Journ. Bot.*, 28, No. 7, 1937, p. 617-621.
- NADSON, G. A.—Creation de nouvelles races stables chez les levures. *Actualités Scientifiques et Industrielles*, 514, 1937, p. 1-36.—Hermann et Cie. Editeurs. Paris.
- NIÑO, F. L.—Blastomycosis humana generalizada por *Cryptococcus* (n. sp.)—Misión de Estudios de Patología Regional. Univ. de Buenos Aires, Argentina. *Monografía No. 3*, 1934.
- NIYESCU, M. Al.—Contribution à l'étude de levures roumaines. Theses, 1915, p. 1-60. Jouve et Cie, Editeurs, Paris.
- PERCHER, G.—Les levures froides. *Rev. Viti.* V. 89, 1938, p. 219-222.
- PORCHET, B.—Etude comparative de quelques levures de fruits: raisins, poires, cerises, pruneaux. *Bull. de la Murithienne.* Fasc. L, 1932-1933, p. 49-69.
- PUNKARI, L., and HENRICI, A.—A study of variation in α chromogenic asporo-

- genous yeast. Jour. Bact. V. 26, 1933, p. 125-138
- RENAUD, J.—Sur la stabilité des races de levures de vin. Comp. Rend. de S. de la Soc. de Biol. T. CXXXI, 1939, p. 681-682.
- RENAUD, J.—Recherches morphologiques sur les levures des vins blancs de Pouilly.—Ann. des Ferment. T. 1, p. 468-480.
- ROUKHELMAN, N.—Sur un nouveau champignon à pigment noir du genre *Torula* (*Torula schoenii*). Ann. des Ferment. T. 3, 1937, p. 149-155.
- SCHULTZ, A. S., ATKIN, L., and FREY, C. N.—The biochemical classification of yeast strains.—J. Bact., 40, 1940, p. 339-346.
- SERGENT, E. et DUEROS-ROUGE BICH, H.—Repartition elective des levures sur les raisines murs dans la nature. Arch. Inst. Past. Algerie.—T. X, 1932, p. 464-465.
- SORIANO, S.—Método para obtención y observación de filamentos en levaduras no esporuladas. Folia Biol. Nos. 83-84, 1939, p. 354-358.
- STANTIAL, H.—The sporulation of yeasts. Trans. Roy. Soc. Canada, 28, Sect. III, 1935, p. 175-188.
- STELLING-DEKKER, N. M.—Die Hefesammlung des "Centraalbureau voor Schimmelcultures". I Teil. Die Sporogenen Hefen. Amsterdam. 1931, p. 1-547.
- TALICE, R. V. y MACKINNON, J. E.—Determinación de algunas cepas argentinas de hongos levuriformes.—Octava Reunión de la Soc. Arg. de Pat. Reg. del Norte, 1934.
- TORO, R.—Generic Ranks in the Mycotulace.—The Puerto Rico Jour. P. H. and Trop. Med. Vol. VIII, 1933, p. 414.
- VARELA, G.—Contribución al estudio de la Bacteriología del pulque. Bol. Inst. de Higiene. T. I, 1932.—México.
- VENTRE, J.—Les levures en vinification. Ann. des Ferment. T. 2, 1936-1937, p. 301-320.
- VIALA, P., et PACOTTET, P.—Recherches sur les maladies de la vigne. Levures et Kystes des Gloesporium.—An. Inst. Nat. Agron.—T. V., 1906, p. 1-55.
- WAGER, H.—The nucleus of the yeast-plant. Ann. Botany, V. 12, 1898, p. 499-543.
- WINGE, O., and LAUSTSEN, O.—On 14 new yeast types, produced by hybridization. Comp. rend. trav. lab. Carlsb., V. 22, 1939, p. 337-352.