

ESTUDIO DE *HANSENULA FABIANII* AISLADA DEL POZOL

TEÓFILO HERRERA *

MIGUEL ULLOA *

RESUMEN

Hansenula fabianii Wickerham fue aislada por primera vez en México del pozol, masa fermentada de maíz utilizada como alimento básico en el sureste de México. En el presente trabajo se describen algunas características morfológicas y fisiológicas de esta levadura, cultivada en varios medios sólidos y líquidos. Se discute la procedencia de este microorganismo, así como algunos aspectos de su identificación y de su posición taxonómica.

ABSTRACT

Hansenula fabianii Wickerham was isolated for the first time in Mexico, from the fermented maize dough called pozol, used as a basic food in southeastern Mexico. In the present paper, some morphological and physiological characteristics of this yeast, cultivated in several solid and liquid media, are described. It is discussed the source of this microorganism as well as some aspects of its identification and taxonomic position.

INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores (Herrera y Ulloa, 1970, 1971; Ulloa, Herrera y De la Lanza, 1971) se han tratado diversos aspectos relacionados con la microbiología del pozol, incluyendo la descripción de dos levaduras: *Candida krusei* (Cast.) Berkhout, y *Trichosporon cutaneum* (de Beurm, Gougerot et Vaucher) Ota.

Aquí se registra, por primera vez en México, el aislamiento de *Hansenula fabianii* Wickerham. La cepa estudiada procede del pozol (masa fermentada de maíz) elaborado en Tapachula, Chiapas. El aislamiento de la misma se hizo

en medio 77 de Fred y Waksman para *Azotobacter*, utilizando alcohol etílico como única fuente de carbono (Allen, 1951); posteriormente, como en este medio sólo creció de manera raquílica, se transfirió a los medios de cultivo que después se indican al hacer la descripción de los cultivos de esta levadura. Con excepción de los medios naturales (trozos de papa, zanahoria y pepino), trozos de yeso y el medio V8, los demás medios de cultivo utilizados fueron de la marca Difco.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

1. Medio 77 de Fred y Waksman con alcohol etílico como única fuente de

carbono. Colonias blancas, cremosas, lisas, algo brillantes, de borde entero,

* Instituto de Biología, UNAM.

puntiformes (1-3 mm), raquílicas, de crecimiento lento. Las colonias son semejantes en medio 77G, el cual contiene

glucosa como única fuente de carbono (Fig. 2).

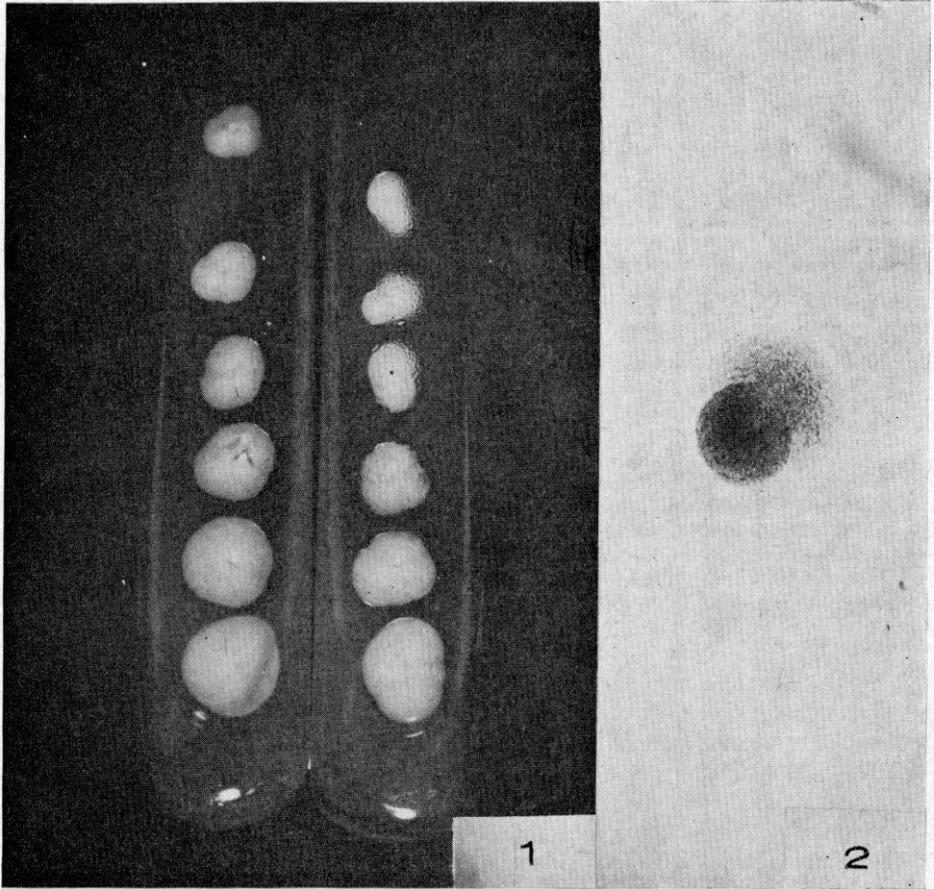


Fig. 1. Colonias de *H. fabianii* en medio V8.

Fig. 2. Satelitismo de *H. fabianii* en medio 77G.

Levaduras aisladas, esferoidales o elípticas, de 2.0-3.5 por 2.5-4.5 micras, generalmente con una o dos yemas (Figs. 3, 4, 5).

2. Czapek agar. Colonias blancas, opacas, cremosas, de borde entero, irregulares, de unos 4 mm de diámetro a las dos semanas.

Levaduras aisladas, esferoidales, de 3.0-4.0 por 3.5-4.5 micras de diámetro, la mayoría con una sola yema.

3. Sabouraud agar. Colonias blancas,

lisas, brillantes, cremosas, opacas, circulares, de bordes enteros, aproximadamente de 1 cm de diámetro a las dos semanas.

Levaduras aisladas, esferoidales, ovoides o elípticas, de 2.0-3.5 por 3.0-4.5 micras, la mayoría con una sola yema.

4. Malta agar. Colonias blancas, cremosas, circulares, brillantes, lisas, de bordes enteros, algo fluorescentes, aproximadamente de 1.0-1.5 cm de diámetro a las dos semanas.

Levaduras aisladas, esferoidales o elípticas, de 2.5-5.0 por 3.5-6.0 micras, generalmente con una yema polar o subpolar, a veces con dos yemas unipolares o bipolares; ocasionalmente se forma pseudomicelio o micelio verdadero con blastosporas en las articulaciones de las hifas; estas últimas de 2.0-2.5 micras de diámetro.

5. Extracto de malta agar y papa dextrosa agar. Las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos son muy semejantes a las descritas en malta agar.

6. Jugo de ocho verduras marca Campbell (V8 agar). Colonias blancas marfileñas, cremosas, brillantes, lisas, algo elevadas, de borde lobulado irregularmente, de 1-2 cm a las dos semanas (Fig. 1).

7. Papa en trozo. Crecimiento vigoroso, elevado sobre el substrato, cremoso, blanco, algo brillante, de borde lobulado, viscoso; produce ligera pigmentación morena en la papa, la cual se acentúa a los siete días.

8. Gelatina 15%: Crecimiento ligero y translúcido a los cinco días, el cual aumenta un poco después de una o dos semanas, granuloso-filamentoso en la parte sumergida; con el tiempo se vuel-

ve nebuloso en la parte superficial; no hay licuefacción.

9. Agua peptonada al 1%. Crecimiento ligero, sedimentado en su mayor parte, blanco cremoso; se produce algo de turbidez en el medio y escaso crecimiento superficial, aun después de una semana.

10. Agua peptonada 1%, con 0.5% de glucosa. Crecimiento regular después de dos o tres días, sedimentado en su mayor parte, blanco cremoso; se produce turbiedad en el medio y ligero crecimiento superficial que se adhiere a la pared del tubo formando un anillo delgado.

11. Extracto de malta. A los dos días se produce sedimento blanco y turbiedad en el medio; se forma un delgado anillo fluorescente. Las células son esferoidales, generalmente con una o dos yemas, pero a veces forman varias yemas.

12. Leche tornasolada. Ligero crecimiento sedimentado, de color moreno rojizo; no hay cambio en la leche aun después de treinta días.

13. Fermentación de glicerol y glúcidos al 2% en extracto de levadura al 2% utilizando tubos de Durham. Se siguió el método indicado por Lodder y Kreger-van Rij (1952):

Glucosa +	Lactosa -	Dextrina -
Galactosa -	Rafinosa + $\frac{1}{3}$	Almidón soluble -
Sacarosa +	Glicerol -	Inulina -
Maltosa -	Xilosa -	

Wickerham (1965), en la descripción original de *H. fabianii*, registra la fermentación de la maltosa como débil y latente. La cepa obtenida del pozol no fermentó la maltosa aun después de 30 días. En cambio, las cepas NRRL Y-1871 y NRRL Y-1873, usadas como testigos, sí la fermentaron después de 20 días.

14. No hay crecimiento en medio sin vitaminas (vitamin free yeast base, según fórmula Difco).

15. Asimilación de azúcares al 2% en medio de base nitrogenada (yeast nitrogen base Difco) y por el método auxanográfico de Diddens y Lodder (Lodder y Kreger-van Rij, 1952):

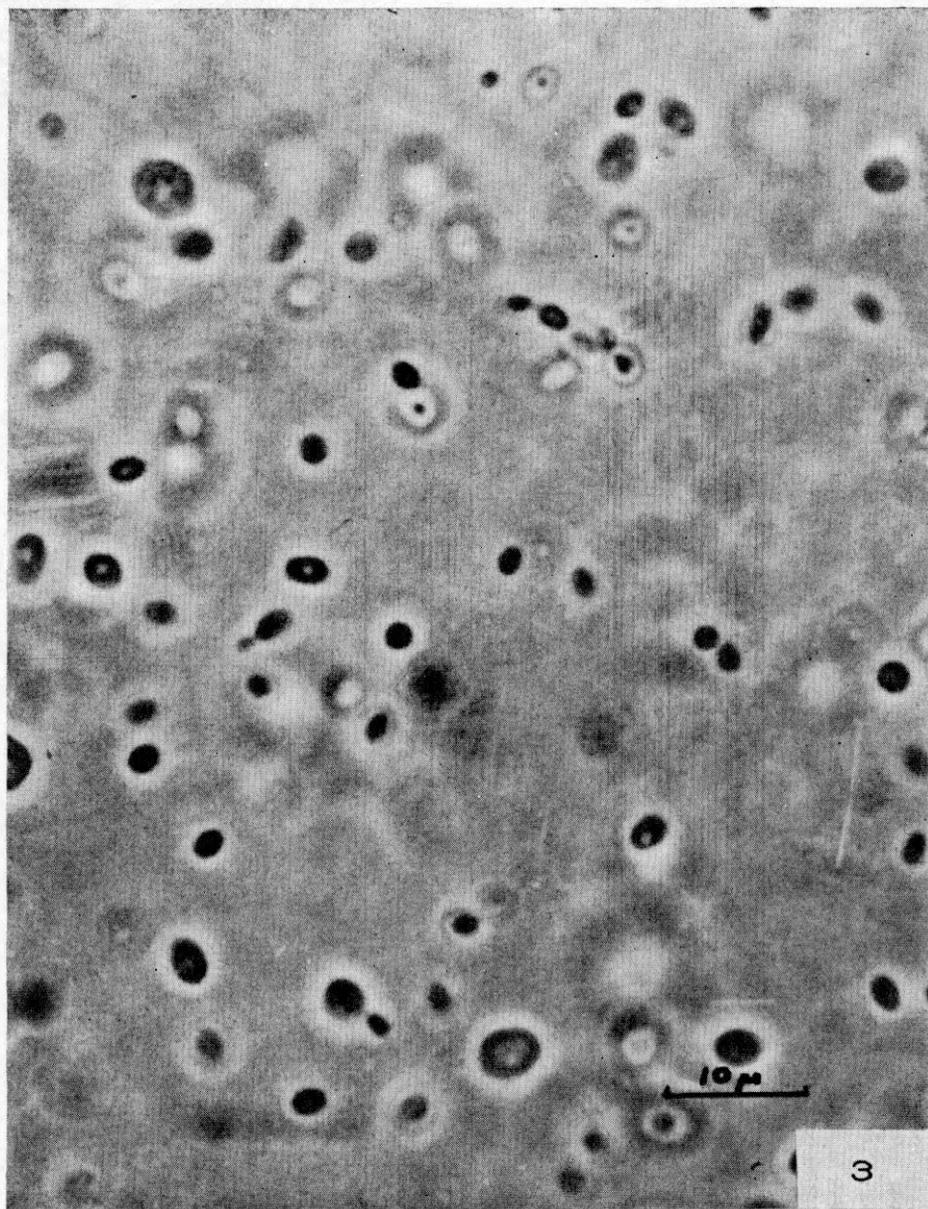


Fig. 3. Aspecto microscópico de la cepa haploide de *H. jabinii* del pozol, en extracto de malta agar. Fotomicrografía en contraste de fases de una preparación fresca en glicerina.

Glucosa +	D-Ribosa —
Galactosa —	L-Rammosa —
L-Sorbose —	Etanol +
Sacarosa +	Glicerol +
Maltosa +	Eritritol —
Celobiosa +	Ribitol —
Trehalosa +	Galactitol —
Lactosa —	D-Manitol +
Melibiosia —	D-Glucitol +
Rafinosa + (débil)	α -Metilo-D-Glucósido +
Melezitosa +	Salicina +
Inulina —	DL-Ácido láctico +
Almidón soluble +	Ácido succínico +
D-Xilosa +	Ácido cítrico +

16. Asimilación de nitrato de potasio en medio de base carbonada para levaduras (yeast carbon base Difco). Se siguió el mismo método auxanográfico indicado en el inciso 14: KNO_3 +.

17. Crecimiento en medio con NaCl al 10% y glucosa al 5%: lento, moderado.

18. Formación de ascas y ascosporas en trozo de zanahoria: Ascas con 1-4 ascosporas en forma de sombrero, las cuales son liberadas cuando las ascas maduran (Figs. 4 y 5).

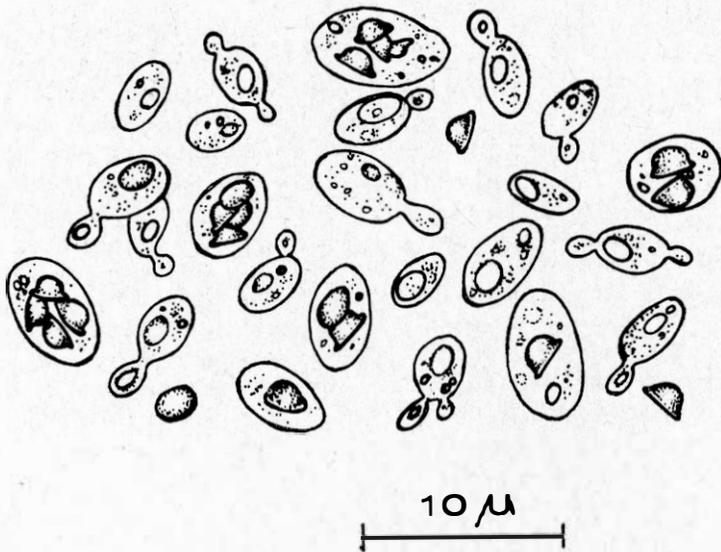
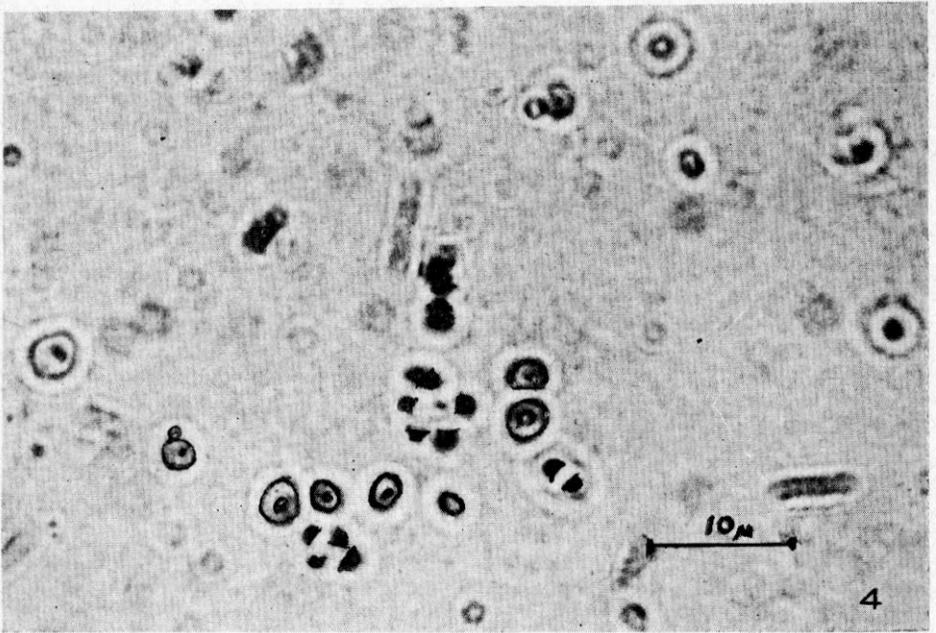
19. Producción de ésteres en diversos medios: +.

DISCUSIÓN

La especie aquí estudiada se aisló originalmente del pozol en un medio carente de nitrógeno (Ulloa, Herrera y De la Lanza, 1971); no obstante, en investigaciones posteriores no se demostró la capacidad de la misma para fijar nitrógeno atmosférico elemental, ya que la prueba de la reducción del acetileno, utilizada para este propósito, resultó negativa (Taboada, Herrera y Ulloa, 1971); además, el crecimiento de esta levadura en dicho medio, después de varias resiembras sucesivas, resultó ser cada vez más raquítico, motivo por el que consideramos que el desarrollo original de las colonias de esta especie se debió a las impurezas del agar (pese a que se utilizó agar purificado: ionagar, Oxoid), a las sustancias introducidas con el inóculo o a fenómenos de satelitismo (Fig. 2), pues frecuentemente se desarrollaban las colonias de *H. fabianii* cerca de colonias de otras levaduras, o bien de bacterias, algunas de las últimas con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico elemental (Taboada, He-

rera y Ulloa, 1971; Ulloa y Herrera, 1972). Como el principal objetivo de este trabajo no es el estudio de la capacidad de la especie para asimilar nitrógeno elemental o sus compuestos, sólo se indica el interés que podría tener una investigación posterior más detallada, sobre el metabolismo de la especie en discusión, pues en el presente estudio sólo se pretende precisar la identificación de esta levadura del pozol, aportando así una contribución más al conocimiento de la flora zimológica de esta masa de maíz fermentada, de la cual sólo se han descrito, anteriormente, dos hongos del tipo de las levaduras (Herrera y Ulloa, 1971).

En un trabajo anterior se identificó provisionalmente la levadura aquí estudiada, de acuerdo con las claves más usadas en la taxonomía del grupo (Lodder y Kreger-van Rij, 1952), como *Torulopsis* sp. considerando la predominancia de la fase unicelular gemante y la ausencia de micelio en los cultivos obtenidos inicialmente (Ulloa, Herrera



Figs. 4 y 5. Ascas y ascosporas resultantes del cruzamiento de una cepa de *H. fabianii*, aislada del pozol, con la cepa *H. fabianii* Y-1873 NRRL, en trozos de zanahoria. Fig. 4. Fotomicrografía de una preparación teñida con solución acuosa de verde de malaquita al 5%. Fig. 5. Dibujo de una preparación fresca en solución de potasa al 4%. Fot. T. Herrera; Dib. M. Ulloa.

y De la Lanza, 1971). Debido al desarrollo posterior de micelio en las resembras de dichos cultivos, en otro trabajo (Taboada, Herrera y Ulloa, 1971), se hizo referencia a esta levadura como *Candida* aff. *utilis* (Henneb.) Lodder; no obstante, un estudio taxonómico reciente sobre levaduras (Lodder, 1970) permitió diferenciar los cultivos de la especie antes citada, principalmente por su incapacidad para asimilar la inulina y, por el contrario, la facultad de los mismos de asimilar el sorbitol, como *Candida fabianii* Kodama, Kyono, Iida et Onoyama.

Candida fabianii es heterotálica; su fase perfecta corresponde a *Hansenula fabianii*, pero ésta sólo se obtiene cuando se cultivan juntas dos cepas haploides compatibles. Los aislamientos puros, generalmente, provienen de células vegetativas haploides y, por lo tanto, no se puede obtener de ellos la fase perfecta; éste fue el caso de la cepa obtenida del pozol. La fase perfecta se obtuvo después de cruzar dicha cepa con la cepa complementaria NRRL Y-1873 de *H. fabianii* y de cultivarlas en trozos de zanahoria durante 20 días. Esto no se logró en extracto de malta agar, trozos de yeso o de pepino y el medio de Fowel para esporulación de levaduras.

Wickerham (1965) considera que *H. fabianii* es la primera especie de vida

libre dentro de su línea evolutiva, que se ha independizado de una existencia asociada con algunos escarabajos de la corteza de coníferas; es también la última especie de su línea que se encuentra en la naturaleza con el número haploide de cromosomas. *H. fabianii* está estrechamente relacionada con *H. subpelliculosa*, pero esta última es diploide en condiciones naturales y asimila el eritritol. Ambas especies han sido encontradas casi exclusivamente como contaminantes de fermentaciones industriales, y ambas han sido utilizadas en países orientales en la elaboración de alimentos y bebidas alcohólicas. Es interesante señalar que la cepa NRRL Y-1873 de *H. fabianii* que resultó ser compatible con la cepa aislada del pozol para obtener la fase perfecta, fue originalmente aislada de una planta fermentadora, para hacer alcohol a partir de camote, en el sur de Corea. Es conveniente insistir en el hecho de que la cepa aislada del pozol es incapaz de fermentar la maltosa aun después de 30 días; pero no se considera como una variedad nueva por este carácter, debido a que las cepas tipo sólo muestran una fermentación lenta y débil de la maltosa, lo cual puede ser interpretado como una tendencia a perder la facultad de fermentar dicho azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al doctor C. P. Kurtzman, del Fermentation Laboratory, Northern Utilization Research and Development Division, Peoria, Illinois, por haber facilitado las cepas NRRL Y-1871 y NRRL Y-1873 de *H. fabianii* que se cruzaron con la cepa aislada del pozol para tratar de obtener la fase perfecta. También se agradece al doctor L. R. Batra del Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland su ayuda por el envío de material bibliográfico sobre

taxonomía de levaduras, así como por sus comentarios sobre la microbiología del pozol.

Los cultivos estudiados se encuentran depositados en las colecciones del Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Agricultural Research Service, Peoria, Illinois (USA), en donde han sido registrados con la clave NRRL Y-7414.

LITERATURA CITADA

- ALLEN, O. N., 1951. *Experiments in Soil Microbiology*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn., pp. 58-59.
- HERRERA, T. y M. ULLOA, 1970. Aspectos generales sobre la microbiología del pozol. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 12: 103-108.
- HERRERA, T. y M. ULLOA, 1971. Estudio de *Candida krusei* y *Trichosporon cutaneum* aislados del pozol. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 13: 255-261.
- LODDER, J., 1970. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 245, 272-274, 902, 909.
- LODDER, J. y N. J. W. KREGER-VAN RIJ, 1952. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. North Holland Publishing Co., Amsterdam, 735 p.
- TABOADA, J., T. HERRERA y M. ULLOA, 1971. Prueba de la reducción del acetileno para la determinación de microorganismos fijadores de nitrógeno aislados del pozol. *Rev. lat-amer. Quím.* 3: 188-191.
- ULLOA, M., T. HERRERA y G. DE LA LANZA, 1971. Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del pozol. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 13: 113-124.
- ULLOA, M. y T. HERRERA, 1972. Descripción de dos nuevas especies de bacterias aisladas del pozol: *Agrobacterium azotophilum* y *Achromobacter pozolis*. *Rev. lat-amer. Microbiol.* 14: 15-24.
- WICKERHAM, L. J., 1965. New heterothallic species of *Hansenula*. I. *Hansenula fabianii*. *Mycopath. Mycol. Appl.* 26: 79-86.