

LEVADURAS DEL MANÁ

PICHIA FARINOSA LINDNER

SYN: *Saccharomyces farinosus* Lindner.

Por MANUEL RUIZ O.,
del Instituto de Biología.

LAS levaduras del presente estudio fueron aisladas del maná que escurre de los fresnos, colectado por mi maestro el Profesor Ochoterena, en Morelia, Mich. El cultivo original estaba contaminado con una gran cantidad de bacterias y otros microorganismos, y por lo mismo se procedió a hacer el aislamiento de las levaduras, para obtenerlas en estado puro. Al efecto, hicimos varios cultivos sucesivos en mosto simple, adicionado de ácido láctico, hasta eliminar por completo las bacterias, y después, practicamos cultivos en estría en cajas de Petri. De esta manera llegamos a obtener cultivos puros de las levaduras que ahora estudiamos.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS LIQUIDOS

Mosto simple.—A las 48 horas y a 15°-20°, se nota en los tubos de cultivo la formación de un anillo alrededor de sus paredes, de color blanco lechoso y muy delgado. Sobre el medio se nota un velo, aunque no completo, sino en forma de islotes pequeños del mismo color que el anillo, y que al menor movimiento caen al fondo del tubo. Los islotes semejan membranitas aisladas, muy ténues y transparentes. A los tres días el anillo es completo, los islotes se han unido, formando un velo de color blanco lechoso, húmedo y brillante. En el fondo del tubo hay un depósito formado por los fragmentos de velo que han caído.

El velo va desapareciendo con lentitud, haciéndose primero muy delgado, y al cabo de 12 días desaparece completamente.

El anillo persiste por algún tiempo, y en cambio el depósito aumenta constantemente. El medio, durante los primeros días, se conserva transparente, pero a los 20 días toma aspecto opaco, debido a que una gran cantidad de pequeñas colonias flotan en el líquido. No hay fermentación y se desprende un olor aromático bastante agradable del medio. Después de dos meses, el depósito blanco lechoso se encuentra muy desarrollado. El anillo ha aumentado de altura, debido especialmente a la evaporación del líquido, y por lo mismo a su baja de altura en las paredes del tubo; en algunos sitios se ha tornado bastante denso y con un color amarillento. La opacidad del medio es bastante intensa, y ello se debe a una gran cantidad de levaduras que flotan en el líquido.

Caldo de carne.—Desarrollo poco abundante, generando un anillo delgado y de color blanco grisáceo, así como un velo muy transparente del mismo color, que pronto se fragmenta, quedando constituídos pequeños islotes que a los 15 días caen al fondo del tubo. El anillo persiste igual tiempo que el formado en mosto simple pero es menos denso y no toma coloración amarillenta. Se forma un depósito en el fondo del tubo, poco abundante, y el líquido se enturbia debido a la gran cantidad de levaduras que flotan en el medio, del cual se desprende un olor aromático agradable.

Caldo de levadura con glucosa.—Se obtiene un cultivo muy semejante al descrito en mosto simple, pero el desarrollo es un poco menor, el velo desaparece en pocos días, y el anillo es menos persistente. Se obtiene un depósito poco abundante y el enturbiamiento del líquido es escaso.

Caldo de levadura simple.—El desarrollo es muy escaso y únicamente se diferencia un pequeño depósito, pues el anillo y velo apenas se esbozan sin llegar a integrarse.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LOS CULTIVOS EN MEDIOS SOLIDOS

Los cultivos se hicieron en tubos y se dejaron a la temperatura del laboratorio (15°-20°).

Mosto gelosado.—A los tres días se pueden notar pequeñas colonias de color blanco lechoso, que crecen con rapidez to-

mando una forma circular, con bordes enteros, globulosas, húmedas y brillantes. A los 10-15 días toman un color blanco grisáceo, los bordes se tornan levemente ondulados y el centro se eleva un poco sobre el resto de la colonia. Al cabo de un mes aún conserva su forma circular, estando el centro un poco más elevado que el resto de la colonia, y con una coloración rosa muy leve. Este color se atenúa hacia la periferia, en donde es blanco lechoso, y además allí se forman pequeños radios. Después, los bordes se vuelven otra vez enteros, el color rosado se transforma en café muy pálido, y los radios se profundizan, transformándose en fisuras.

Mosto gelatinizado.—Los cultivos tienen un aspecto semejante al descrito en el medio anterior con las siguientes diferencias: las colonias son ligeramente ovoides, el aspecto es poco húmedo y brillante, los radios se forman con más rapidez y se transforman pronto en fisuras profundas, los bordes son ondulados y el desarrollo es menor. A los 15-20 días se empieza a licuar el medio y después lo hace completamente.

Gorodkowa.—A las 48 horas se notan pequeños colonias circulares y ovoides, de color blanco lechoso, bordes un poco ondulados, húmedas y brillantes. A los cuatro días el medio comienza a licuarse, las levaduras siguen desarrollándose en la superficie en forma de velo irregular, y hacia el fondo del tubo en capas sucesivas. A los 12 días en el medio aún semi-líquido las levaduras forman un velo granuloso incompleto de un color blanco y un anillo muy delgado y transparente en las paredes del tubo. Con el tiempo el velo se fragmenta en islotes, el anillo se torna denso y se observa un depósito en el fondo.

Sabouraud.—Se obtienen cultivos bastante desarrollados, muy exuberantes y con las mismas características anotadas al referirnos al mosto gelosado.

Papa.—Pequeñas colonias de forma irregular, globulosas, húmedas, brillantes y de color blanco lechoso. Después se van tornando secas, opacas, y de color café. El desarrollo es escaso, y a los dos meses se seca el medio muriendo los cultivos.

Zanahoria.—Los cultivos son aún más pobres que en el medio anterior, obteniéndose colonias semejantes, pero más peque-

ñas que pronto se secan y mueren. Únicamente humedeciendo constantemente el medio de cultivo con agua estéril, nos fue posible prolongar la vida de las colonias por tres y cuatro meses.

Papa gelosa.—Cultivo semejante al obtenido en papa, siendo el desarrollo mayor, y no llegan a morir las colonias.

Caldo de levadura gelosado.—Escaso desarrollo, formándose colonias circulares y poco globulosas, con bordes enteros y de color blanco, con un tinte ligeramente café.

Gelosa.—Desarrollo un poco mayor que el anterior, generándose colonias de color blanco lechoso, circulares u ovoides, bordes ondulados, húmedos, brillantes y de color blanco lechoso, que con el tiempo se torna café.

Gelatina y caldo gelatinizado.—Las características de los cultivos son muy semejantes a las descritas con anterioridad, al referirnos al medio de Gorodkowa, pues, asimismo, estos medios se licúan y las levaduras siguen vegetando en forma de velo que se fragmenta en islotes y desaparece, quedando el anillo y el depósito. Desarrollo muy escaso.

Raulín gelatina.—Cultivos semejantes a los anteriores, sin llegar a licuarse el medio totalmente.

COLONIAS GIGANTES

Para obtener las colonias gigantes empleamos los mismos medios de cultivo sólidos que hemos citado anteriormente, colocándolos en cajas de Petroff y de Petri. Como las características son semejantes en la mayoría de los medios, citaremos únicamente las referentes a los principales de ellos.

En Sabouraud, es el medio donde las colonias alcanzan mayor desarrollo. En los primeros días la colonia es circular, con bordes enteros, aplanada, húmeda, brillante y de color blanco lechoso. Al cabo de un mes, los bordes se han tornado ligeramente ondulados, y se han formado fisuras poco profundas de la periferia al centro, que dan a la superficie un aspecto plegado. La parte central está un poco elevada sobre el resto de la colonia y posee un pequeño orificio; el color blanco lechoso se

ha oscurecido, tomando un ligerísimo tinte café, acentuado en el centro. En un mes la colonia tiene 20 mm. de diámetro.

En mosto glosado, las colonias gigantes obtenidas son de menor diámetro, pero más globulosas. Toman forma circular u ovoide, bordes enteros que se hacen ondulados, se forman pocas fisuras, el aspecto es húmedo y brillante, y el color que al principio es blanco lechoso, se torna levemente café a los dos meses, tiempo en que también el aspecto de la colonia se va haciendo seco y opaco. En un mes el diámetro alcanza 14 mm.

En gelosa se obtienen pequeñas colonias de forma circular

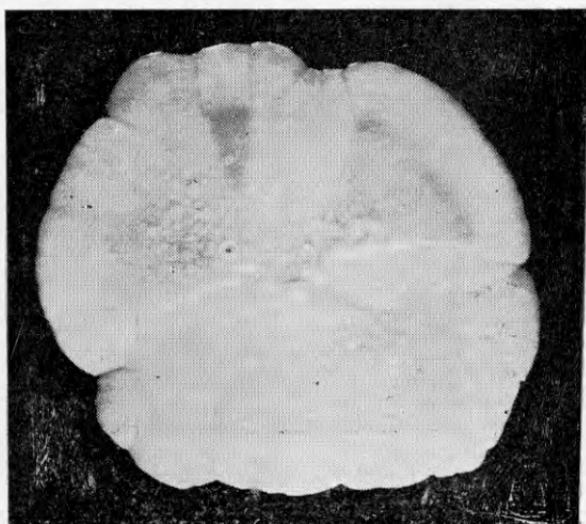


Fig. 1.—Colonia gigante de levaduras del maná de dos meses de cultivo, en medio de Sabouraud. (Fot. I. Larios).

muy regular, bordes enteros, húmedas, brillantes y de color blanco lechoso. Después de un mes el centro se ha elevado un poco y el color se torna café. El diámetro alcanza 9 mm.

En gelatina, Gorodkova, mosto gelatinizado, caldo gelatinizado y Raulín gelatina, se obtienen colonias circulares, de bordes finamente ondulados, húmedas, brillantes y de color blanco lechoso. La superficie se nota un poco plegada y los medios son licuados lentamente.

En papa y zanahoria las colonias son pequeñas con las mismas características anotadas ya al hablar anteriormente de estos medios.

CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CÉLULAS EN
LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

Las características microscópicas de las células varían mucho en los diferentes medios de cultivo, sobre todo en lo que se refiere en su forma y dimensiones. A las 48 horas, en mosto simple se observan levaduras alargadas (tipo micoderma), elípticas (tipo ellipsoideus) y ovoides (tipo cerevisiae). Las dimensiones son muy variadas, correspondiendo a las alargadas 12 por 3 y 4 micras, a las elípticas 8 a 9 por 4 y 5 micras, y a las ovoides 6 y 7 por 4 y 5 micras. El protoplasma es homogéneo, claro, un poco refringente sin notarse granulaciones de ninguna especie. Sin embargo, en la mayoría de las células se nota una

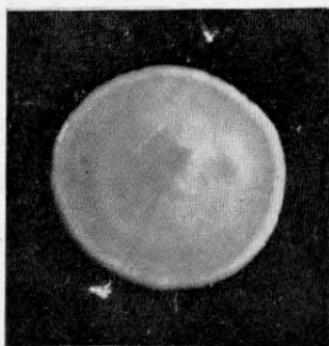


Fig. 2.—Colonia gigante de levaduras del maná, de dos meses de cultivo, en gelosa. (Fot. I. Larios).

vacuola en la parte media o en uno de los extremos, con un contenido muy claro y refringente, distinguiéndose así muy bien sus límites con los del protoplasma; a veces encierra uno o dos gránulos pequeñísimos con movimiento browniano. En las formas alargadas se observan dos vacuolas en las extremidades de las células y en pocos casos hasta tres, con sus granulaciones refringentes. La reproducción se efectúa por gemación, formándose en la célula pequeños brotes que, aumentando lentamente de dimensiones, se separan de la célula madre. A los cuatro días el protoplasma se ha tornado un poco obscuro y las vacuolas han aumentado de dimensiones. Al cabo de 10 días, el protoplasma se aclara, las formas alargadas aumentan en número y se unen en largas cadenas; aparecen granulaciones en

muchas células, que se establecen especialmente alrededor de las vacuolas y tienen movimiento browniano. Después de 45 días de cultivo no han cambiado la forma y dimensiones de las levaduras, pero sí la mayoría han comenzado a esporular, transformándose en ascas que poseen de una a cuatro ascosporas circulares u ovoides. En muy pocas se notan brotes y las que no tienen esporas, poseen una vacuola rodeada por granulaciones y uno o varios glóbulos de grasa. Entre los cuatro y cinco meses casi todas las células se han transformado en ascas, el protoplasma es muy oscuro, las esporas han aumentado de dimensiones, hay pocas granulaciones y los glóbulos de grasa han desaparecido. Pocas células conservan vacuolas y se observan algunas

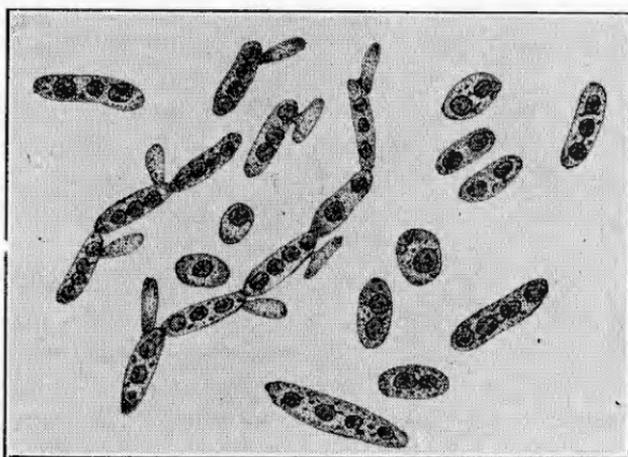


Fig. 3.—Células de *Pichia farinosa*, a los 45 días de cultivo en mosto simple, transformadas en ascas que muestran sus ascosporas.

de ellas alargadas, muy delgadas y llenas de una gran cantidad de granulaciones pequeñísimas; son probablemente formas degeneradas. Las características son las mismas para las células que vegetan en el anillo y en el velo, si acaso se encuentran diferencias, son tan poco notables que no ameritan citarse.

En caldo simple, observamos células ovoides, elípticas y alargadas con las mismas dimensiones que las del mosto. El protoplasma es claro, homogéneo, sin granulaciones y solamente a veces se notan uno o dos glóbulos de grasa; pocas celdillas poseen vacuolas y las formas alargadas poseen generalmente dos en sus extremidades. Estas, quedan unidas en cadenas de tres

hasta doce células, siendo rara la que se observa aislada. Se notan hasta dos brotes en las formas alargadas, siendo algunos laterales. A los 15 días las células han adquirido granulaciones, vacuolas y mayor número de glóbulos de grasa, aumentando asimismo el número de las células alargadas que se unen en cadena. A los 45 días el protoplasma se torna oscuro, granuloso y comienzan a desaparecer los glóbulos de grasa; aun cuando continuamos la observación del cultivo por cuatro y cinco meses, no se llegó a notar la esporulación de las levaduras y solamente observamos que la mayoría de ellas se llenan de vacuolas y granulaciones, muriendo el cultivo.

En caldo de levadura con glucosa, las características de las células son muy semejantes a las anotadas para el mosto simple, existiendo mayor número de glóbulos de grasa, menos formas alargadas, la formación de ascas es más tardada y su número mucho menor.

En caldo de levadura simple, se observan muy pocas células, especialmente de forma alargada, el protoplasma es claro y homogéneo; durante todo el tiempo se notan muy pocas granulaciones y vacuolas, ningún glóbulo de grasa, y no llegan las células a esporular.

En mosto gelosado, a las 48 horas y a 15°-20°, se obtienen levaduras de distintas formas, predominando las alargadas de tipo micoderma, con sus característicos brotes laterales, con dimensiones de 12 a 14 micras de longitud por 3.5 micras de diámetro y se unen formando largas cadenas. El protoplasma es homogéneo, un poco oscuro, sin granulaciones ni glóbulos de grasa, pero sí existen vacuolas, hasta dos y tres en algunas células, llegando algunas de ellas, en raros casos, a ocupar casi toda la celdilla. A los 10-15 días las células alargadas son numerosísimas, habiendo muy pocas circulares, ovoides y elípticas. Las dimensiones no han variado, el protoplasma es oscuro, sin granulaciones ni grasa y únicamente se notan en gran cantidad las vacuolas, existiendo, en algunos casos, hasta cuatro en cada célula. Las cadencias o falsos micelios que llegan a formarse poseen gran cantidad de células, alcanzando bastante longitud. A los 30 días, en las células se observan pequeñas granulaciones, muchas con movimiento browniano y glóbulos de grasa, éstos últimos perfectamente identificables, colorando con Sudán III, o sometiendo las levaduras a la acción del éter o del alcohol absoluto e inmediatamente se nota su desaparición. El número de granulaciones va aumentando con el tiempo, así como

los glóbulos de grasa, y a los dos meses se nota la formación de las primeras ascas con una o cuatro esporas, que tienen las mismas características citadas anteriormente. En este momento, las granulaciones y glóbulos de grasa comienzan a desaparecer, sirviendo seguramente de nutrición a las esporas. No todas las células esporulan, notándose menor número de ascas que en mosto simple.

En mosto gelatinizado se obtienen células cuya forma y dimensiones son muy semejantes a las del cultivo anterior, así como en la formación de cadenitas; pero las demás características son diferentes. A las 48 horas el protoplasma es claro, homogéneo, refringente, con vacuolas y sin ninguna granulación; a los 10 días se nota la aparición de uno o dos pequeños glóbulos

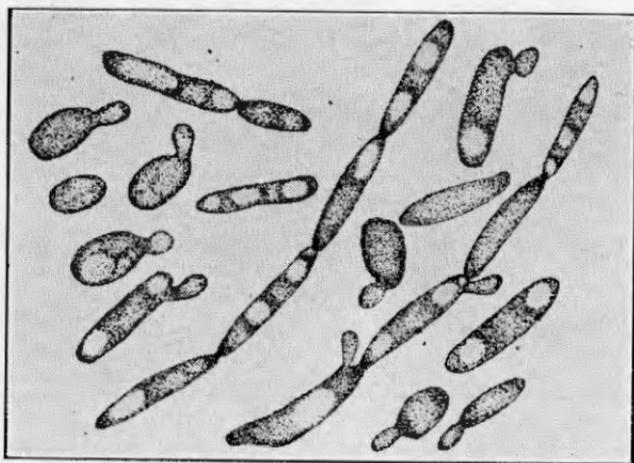


Fig. 4.—Aspecto de las células de *P. farinosa*, a las 48 horas de cultivo en mosto gelosado, mostrando con claridad las vacuolas.

de grasa, colocados alrededor de las vacuolas; éstas son menos numerosas y se observan con menor claridad que en mosto gelosado. Las cadenitas de levaduras se desintegran con mucha facilidad agitando el medio. Entre los 30 y 40 días es cuando más numerosos son los glóbulos de grasa y aparecen corto número de granulaciones, sin llegar a ser abundantes. Después el protoplasma se torna oscuro, los glóbulos de grasa tienden a desaparecer y solamente muy pocas células se transforman en ascas al cabo de tres meses de cultivo; se puede decir, que la mayoría de las levaduras han perdido la facultad de esporular.

En Sabouraud, predominan las formas ovoides y elípticas, habiendo pocas alargadas; entre éstas la mayoría quedan aisladas, existiendo pocas que forman cadenitas. El protoplasma es homogéneo, claro, refringente; en pocas células hay vacuolas, únicamente en las alargadas, en las que se notan hasta dos y tres. Asimismo, encontramos granulaciones en pequeña cantidad, en las levaduras de tipo micoderma. Los glóbulos de grasa se notan hasta los 20 días de cultivo, muy pequeños y en corto número y al mismo tiempo aumenta la proporción de células alargadas que forman falsos micelios. A los dos meses comienzan a esporular las células transformándose en ascas, con las mismas características ya citadas al referirnos al mosto gelosa-

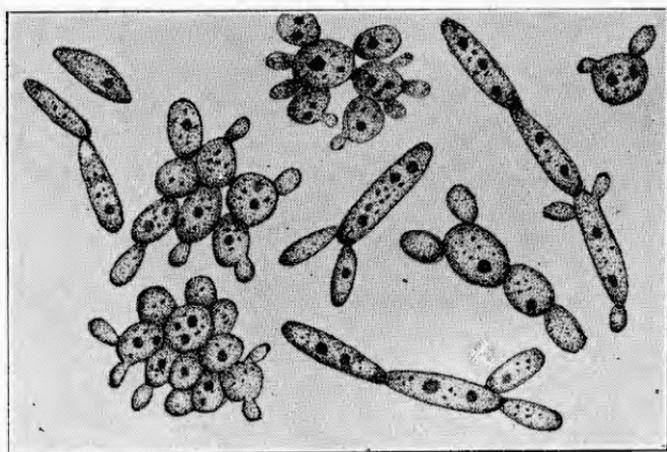


Fig. 5.—Células de un cultivo de 30 días en Gorodkova mostrando glóbulos de grasa y algunos gránulos metacromáticos.

do. Es necesario hacer notar que, aunque las células estén esporulando, muchas de ellas, sobre todo las formas alargadas, conservan aún sus brotes, especialmente en la parte lateral.

En medio de Gorodkova, encontramos en los primeros días levaduras de forma ovoide, elíptica y alargada, que se unen en cadenitas; en el protoplasma únicamente se notan vacuolas y no así glóbulos de grasa, ni granulaciones. A los 20 días aparecen granulaciones y glóbulos de grasa y el protoplasma se torna obscuro, siendo asimismo muy notable el número de brotes que se notan, contándose hasta dos y tres en cada célula. El número de glóbulos de grasa aumenta en los siguientes días y se observa que las células se unen en pequeños grupos, como formando ra-

cimos, excepción hecha de las alargadas que forman pequeñas cadenas. Aun cuando la observación del cultivo la prolongamos por espacio de cuatro y cinco meses, notamos que muy pocas células forman esporas, pues la mayoría se quedan unidas, formando grupos de cadenas y racimos con un protoplasma, en el que han desaparecido los glóbulos de grasa y las vacuolas.

En papa y zanahoria se obtienen células con características semejantes. Desde los primeros días se notan células especialmente alargadas, con gran cantidad de brotes y con protoplasma, en el que hay vacuolas, granulaciones y glóbulos de grasa; después se unen en cadenitas y al cabo de un mes se comienzan a formar las esporas dentro de las células, las que se transforman en ascas.

En papa gelosa, caldo de levadura gelosado y gelosa se observan células muy semejantes a las obtenidas en mosto gelosado, con diferencias muy ligeras: el número de brotes es mucho menor, las formas alargadas son menos abundantes, así como las vacuolas, los glóbulos de grasa y las granulaciones. La esporulación es más tardada, y el número de ascas que se forman es mucho menor. Las dimensiones son las mismas.

En gelatina, caldo gelatinizado y Raulín gelatina, se obtienen en los primeros días levaduras de forma ovoide y elíptica, con una gran cantidad de brotes, existiendo muy pocas formas alargadas. Las células quedan unidas, formando especies de racimos y muy pocas se notan aisladas; el protoplasma es homogéneo, claro, sin glóbulos de grasa ni vacuolas, y solamente se notan en algunas levaduras granulaciones refringentes. Al cabo de un mes, no ha cambiado el aspecto de las células, y solamente hay menos brotes y la anchura de las mismas es un poco mayor. La observación de los cultivos la prolongamos por cuatro y cinco meses, sin llegar a notar cambio en las células, y sin formarse las ascas con sus esporas; parece como si la levadura hubiera perdido la facultad de esporular cuando se cultiva en medios que tienen gelatina.

De las anotaciones anteriores podemos llegar a las siguientes conclusiones: que la mayoría de las levaduras tienen forma alargada (tipo micoderma), quedando unidas formando cadenitas; que hay también formas ovoides y elípticas, pero en menor abundancia, y solamente en ciertos medios su número sobrepasa a las anteriores; el protoplasma inmediatamente se provee de vacuolas, sobre todo en las formas alargadas; se llegan a formar pocos glóbulos de grasa y granulaciones, y en la mayoría de los me-

dios las levaduras llegan a esporular, excepción de los que contienen gelatina.

NUCLEO. GRANULOS METACROMATICOS. GRASA. GLICOGENO

Núcleo.—En algunos casos nos fue posible identificar el núcleo, tratando las células por una solución muy diluída de ácido acético, pues en este caso se aclara el protoplasma, y es posible notar su núcleo en forma de un cuerpecito ovoide o circular más obscuro que el resto de la célula, y con dimensiones desde 1.5 a 3 micras de diámetro. Sin embargo, este procedimiento puede inducir a errores y es conveniente dudar de él. Lo más seguro es recurrir a las coloraciones especiales a base de hematoxilina de

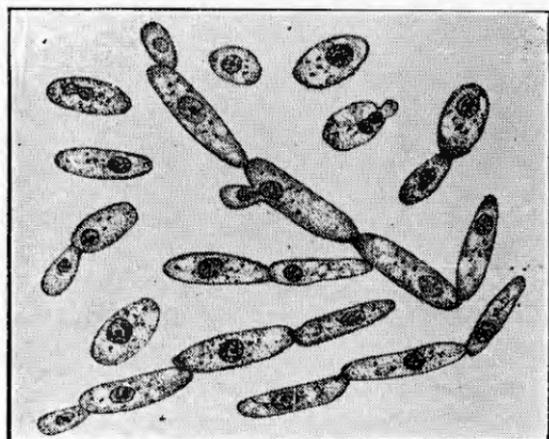


Fig. 6.—Células de *P. farinosa*, de 30 días de cultivo en mosto gelosado, teñidas con hematoxilina-eosina, mostrando sus núcleos, nucleolos y gránulos metacromáticos.

Heidenhein, haemalum-eosina, azul de toluidina, azul polícromo, azul de metileno, tionina y Leishmann, previa fijación con Bouin, Zenker, formol al 10%, alcohol metílico y al calor. Con hematoxilina-eosina, usando el calor como fijador, se notan muy bien los núcleos de color obscuro o violeto obscuro, así como la membrana del mismo color; el protoplasma se ve ligeramente rosa. En ciertas células se llega a distinguir el núcleo como un cuerpecito esférico, color obscuro y excéntrico, así como algunos gránulos metacromáticos de color vinoso. Con haemalum-eosina, el protoplasma se ve violeta rosado y el núcleo violeta obscuro,

no distinguiéndose el nucleolo ni las granulaciones metacromáticas. Con azul de toluidina, polícromo y de metileno, las tinciones son muy claras y precisas, pero duran muy poco tiempo; el núcleo se nota azul oscuro y en él se puede llegar a notar la cromatina y el nucleolo, que toman un color oscuro. En todas las preparaciones, el núcleo es esférico u ovoide, generalmente excéntrico y con dimensiones de 1.5 a 3 micras; en algunas células se notó, con perfección, su división directa para la formación del brote.

Gránulos metacromáticos.—Son poco abundantes en estas levaduras, y se pueden distinguir a veces, en las células vivas en forma de granulaciones pequeñas, con movimiento browniano, repartidas por todo el protoplasma o confinadas en una vacuola. Para su tinción y mejor diferenciación, recurrimos a los mismos colorantes y fijadores ya citados, y obtuvimos los mejores resultados con hematoxilina-eosina y con azul de toluidina. Con el primer colorante se notan de color vinoso y con el segundo de un color azul oscuro. En los cultivos de papa y zanahoria, aparecen los gránulos metacromáticos desde los primeros días, en mosto gelosado y Sabouraud hasta los 30 días, aumentando en número hasta los dos meses en que se empiezan a formar las esporas y desaparecen; en Gorodkova se notan a los 20 días de cultivo, sin llegar a ser numerosos después; en gelatina, caldo gelatinizado y Raulín gelatina, se observan en los primeros días del cultivo, en corto número, pero poco después desaparecen por completo.

Glóbulos de grasa.—Así como las granulaciones macromáticas son poco abundantes y se pueden distinguir en las células vivas con perfecta claridad, en forma de pequeños corpúsculos muy refringentes y de aspecto homogéneo, de una a dos micras de diámetro. Es muy importante distinguir los glóbulos de grasa de las ascosporas, a menudo de iguales dimensiones y aspecto semejante, y quien no esté habituado a la observación de las levaduras puede cometer el error; sin embargo, hay que tener en cuenta que las ascosporas están rodeadas de una pared refringente y tienen un contenido hialino, en el cual se distinguen a veces pequeñas granulaciones y glóbulos de grasa. Si hay duda, al observar las células vivas, de confundir los glóbulos de grasa, se trata la preparación con éter, alcohol absoluto o alcohol a 96° caliente, e inmediatamente dichos glóbulos desapa-

recen del protoplasma. Para su tinción, se recurre al método de Romeis, en el que se emplea como colorante el Sudán III; entonces observaremos los glóbulos de grasa teñidos de rojo dentro de las células. En los cultivos de papa y zanahoria, es donde encontramos desde los primeros días los glóbulos de grasa, sin llegar a ser muy numerosos. En mosto gelosado y gelatinizado, Sabouraud y Gorodkowa se forman entre los 20 y 30 días de cultivo, aumentan en los días siguientes, hasta que empieza la esporulación en que comienzan a desaparecer. En gelatina, caldo gelatinizado y Raulín gelatina, no se observan durante todo el tiempo de cultivo. Además de variar el número de glóbulos de grasa, según el medio de cultivo y la edad del mismo, también lo hacen según la temperatura, siendo más abundantes entre los 20° y 30°, entre los cuales está comprendida la temperatura óptima de crecimiento.

Glicógeno.—En las células vivas no es posible precisar si hay o no glicógeno, aunque se puede suponer su existencia dentro de las vacuolas; sin embargo, esto puede inducir a errores, puesto que la experiencia ha demostrado que no todas las vacuolas tienen dicho compuesto. Recurriendo a las tinciones por el método de Best, se puede identificar el glicógeno dentro de algunas vacuolas, y podemos decir que en ningún caso existe en gran cantidad. Varía, según el medio de cultivo y la edad del mismo, no teniendo la temperatura sino escasa influencia, notable únicamente en los grados límites de crecimiento, en los que no se logró demostrar su presencia dentro de las células. Existe en todos los cultivos que empleamos para nuestro estudio, a excepción de los de gelatina, caldo gelatinizado y Raulín gelatina; en los primeros días en pequeñas cantidades, aumentando después lentamente hasta que se inicia la formación de esporas, en que empieza a desaparecer de la misma manera que los glóbulos de grasa y los gránulos metacromáticos.

TEMPERATURAS LÍMITES Y ÓPTIMAS PARA EL BROTE Y LA FORMACION DE VELOS

Después de varias experiencias precisamos la temperatura máxima del brote, que resultó ser de 38°-40°; si se emplean temperaturas más elevadas, las levaduras no vegetan. Los cultivos los hicimos en mosto gelosado y Sabouraud, obteniendo, en los grados límites, pequeñas colonias circulares u ovoides, aplánadas, bordes recortados, aspecto húmedo, brillante y de color café

lechoso. Observando las levaduras al microscopio, se notan pocos brotes en las células, las cuales tienen forma ovoide y elíptica especialmente, habiendo muy pocas alargadas; el protoplasma es claro y homogéneo, encontrándose en pocas células vacuolas, glóbulos de grasa y gránulos metacromáticos en pequeña cantidad. Respecto a las dimensiones son las mismas ya anotadas al hablar de los medios que cultivamos a la temperatura del laboratorio.

La temperatura óptima, la determinamos después de comparar varios tubos de mosto gelosado, sembrados entre los 20° y los 40°, y llegamos a la conclusión que se encuentra comprendida entre los 24° y 27° grados, ya que en estas temperaturas se desarrollan las colonias con más intensidad, adoptando una forma circular, bordes enteros, globulosas, muy húmedas, brillantes y de color blanco lechoso; crecen rápidamente, y pronto llenan todo el tubo. Los caracteres microscópicos de las células son muy semejantes a los ya anotados para otras temperaturas, con la diferencia de que hay más brotes, mayor número de formas alargadas, que constituyen un gran número de cadenas, y los glóbulos de grasa son más abundantes; asimismo, las levaduras esporulan en menos tiempo.

La temperatura mínima del brote está colocada entre los 3° y 5°, obteniéndose pequeñas colonias circulares, globulosas, de bordes enteros, poco húmedas y brillantes, y de color café lechoso. Entre las células abundan poco las formas alargadas, hay pocos brotes y glóbulos de grasa.

La temperatura máxima para la formación del velo en mosto simple es de 37°, el cual se empieza a formar a las 72 horas, y se completa a los cinco días; pronto se desintegra y cae al fondo del tubo. Las células que se obtienen en el velo a esta temperatura tienen una característica muy importante: poseen una o dos vacuolas rodeadas de una gran cantidad de granulaciones refringentes muy pequeñas, que no nos fue posible identificar como gránulos metacromáticos. La temperatura óptima está entre los 25° y 28°, en que se forma el velo a las 24 horas, y la mínima entre los 5° y 8°, integrándose entonces el velo a los 6 días. El anillo es capaz de formarse aún a los 38° y 39°, siendo entonces opaco, amarillento e incompleto.

ESPORULACION

La esporulación se obtiene especialmente, colocando la levadura en discos de yeso y de Petri estériles, con humedad y

temperatura convenientes, aunque también se forman esporas en todos los medios de cultivo, exceptuando los que tienen gelatina. En el velo de los medios líquidos, es donde las levaduras se transforman en ascas con mayor rapidez y abundancia.

Para observar con precisión todas las fases de la esporulación, recurrimos a los cultivos en cámara húmeda, en discos de yeso y de Petri, haciendo con anterioridad varios cultivos sucesivos de la levadura en mosto gelosado, a fin de que se provea de bastantes materiales nutritivos para formar las esporas. A las 48 horas aún no se forman las esporas, notándose en las células gran cantidad de granulaciones, glóbulos de grasa y pocas vacuolas; a los cuatro días empiezan a formarse las primeras ascas, con una o dos ascosporas de forma esférica u ovoide, de dos a tres micras de diámetro y membrana muy clara que separa perfectamente su contenido del protoplasma del asca; generalmente quedan dentro de las esporas pequeños glóbulos de grasa, y granulaciones con movimiento browniano. En los días siguientes sigue con gran intensidad la esporulación, llegando a formarse una a cuatro ascosporas por asca; generalmente se encuentran una o dos esporas en las células de tipo ovoide y elíptico, y tres o cuatro en las alargadas, con la característica muy importante de que aun cuando estén ya formadas las esporas, se notan brotes laterales en muchas ascas. Según las ilustraciones de Lindner y Saito, publicadas en el estudio que efectuaron de esta especie de levaduras, parece que las ascas derivan de una copulación, ya que dichos autores muestran ascas formadas por dos células unidas por una canal. Guilliermond, en estudios posteriores (Quelques remarques sur la sexualité des levures), demostró que dichas ilustraciones representaban brotes. Nosotros, observando detenidamente los cultivos en cámara húmeda, llegamos a la misma conclusión que el ilustre sabio francés. En efecto, las células que esporulan son capaces de continuar dando brotes al mismo tiempo y las esporas se forman antes de la separación de la célula generada por gemación. En muchas ocasiones, el brote se forma en la parte lateral de la célula, se alarga en dirección paralela a ella y da un aspecto semejante a las levaduras del género *Zygosaccharomyces*, cuando están en copulación.

Una vez formadas las esporas, aumentan lentamente de dimensiones, alimentándose seguramente de las substancias de reserva que quedan fuera de su contenido, ya que se nota la desaparición, a los pocos días, de los glóbulos de grasa, gránulos

metacromáticos y de las vacuolas que indudablemente tienen glicógeno.

Se pueden teñir las ascosporas, siguiendo el método recomendado por Beauverie y que nosotros tomamos de Guilliermond. Consiste en fijar las levaduras en alcohol o formol y hacer la tinción con carbol-fuschina calentando lentamente hasta que empiece la evaporación. Después se decolora con una solución de ácido acético al 1 ó 3%, se lava con agua y se tinte con tionina. Con este procedimiento, llegamos a obtener resultados bastante satisfactorios, pero después de muchas pruebas. Las esporas quedan teñidas en rojo y el resto de la célula en azul.

Las esporas llegan a ocupar completamente el asca, sin romper la membrana que las encierra, lo cual sucede si se les coloca en un medio apto para su germinación. En este caso, se observa que las esporas rompen la membrana del asca que las contiene y germinan por simple brote, como lo hacen todas las levaduras de esta especie antes de la esporulación.

CARACTERES BIOQUIMICOS

Fermentación.—Empleamos el método de los porta-objetos escabados, haciendo tres pruebas con los siguientes azúcares y que colocamos a 25°: sacarosa, lactosa, maltosa, manosa, levulosa, glucosa, galactosa y con la dextrina e inulina: Únicamente hubo fermentación muy débil en la glucosa y levulosa; respecto a la lactosa obtuvimos resultados dudosos, ya que de seis pruebas efectuadas, tres fermentaron y las otras no. Los demás azúcares, no fermentaron, aun cuando se les observó por espacio de 25 días.

Inversión de la sacarosa.—Hicimos cultivos de levaduras tomadas del medio Sabouraud, en soluciones de 5% de sacarosa en agua destilada estéril; varios tubos se colocaron a 25°, y a las 48 horas, haciendo las pruebas respectivas con el licor de Fehling, los resultados fueron completamente negativos. Algunos tubos los llegamos a dejar hasta 5 y 10 días, pero en ningún caso se obtuvo la inversión de la sacarosa.

AFINIDADES Y CLASIFICACION

Las levaduras que estudiamos en el presente trabajo fueron aisladas y clasificadas por Lindner en 1893, quien las encontró en la cerveza fabricada en Danzig. Poco después, en 1908,

Saito encontró esta misma especie, con otras levaduras, en la salsa de frijol, que se emplea mucho en China y Japón. Atendiendo únicamente a la forma de las células, podríamos relacionar estas levaduras con *Sacchromyces cerevisiae*, *Sacch. ellipsoideus* y con las del género *Mycoderma*; pero atendiendo a que producen un velo y anillo en los medios líquidos, a sus ascosporas esféricas u ovoides rodeadas de una membrana simple, a su débil poder fermentativo y a que forman un micelio rudimentario sus células, las colocamos dentro del género *Pichia*, y por sus características fisiológicas particulares la identificamos con la especie *farinosa*, Lindner.

S U M M A R Y

The yeasts of this study were collected by Professor Ochoterena in the manna that was running out of an ash tree in the gardens of Morelia.

After isolating the yeasts in a pure culture we began to study them in different media, both liquid and solid. In all of them the cells show characteristics similar to the following: they form a scum, a ring or a deposit in the liquid media; in the solid media they form colonies which are milky white, circular, have entire borders, are globular, humid and shiny; later they become gray and finally brown. They are generally elongated, some being elliptical and ovoid; they are 12 microns long and 3 to 4 microns wide. In the protoplasm can be seen vacuoles, a few drops of oil and metacromatic granules.

By using special dyes we were able to differentiate the nucleus with its chromatin and nucleolus, the metacromatic granules, the oil and the glycogen.

The maximum temperature of growth is from 38° to 40°; the optimum from 24° to 27°, and the minimum from 3° to 5°. The maximum temperature for the formation of the scum is 37°; the optimum 25° to 28°, and the minimum 5° to 8°.

Ascospores are formed easily in almost all of the media, specially in the scum, but apparently lose this property when the cells are cultivated in media with gelatine. There are from 1 to 4 ascospores in each asc; they are circular or ovoid, 2 to 3 microns in diameter and have a shiny granule in the center. According to the illustrations of Lindner and Saito it seems that the ascs are formed by a copulation; but Guilliermond showed that the illustrations of these authors represented simple buds; we arrive at the same conclusions.

These yeasts ferment glucose and levulose weakly, but has no reaction on the other sugars.

We identify the yeasts of the present study as *Pichia farinosa*, isolated and studied by Lindner in 1893.

BIBLIOGRAFIA

- BOULARD, H.—Etudes et recherches sur les levures, 1915.
- GUILLIERMOND.—The Yeasts, 1929.
- Clef dichotomique pour la détermination des levures, 1928.
- Recherches cytologiques sur les levures et quelques moisissures a formes de levures, 1902.
- Quelques remarques sur la sexualité des levures. *Annals. Mycologici*, 8. 1910.
- HENRICI, A. T.—Molds, yeasts, and actinomycetes, 1930.
- LEVY, L.—Microbes et distillerie, 1900.
- LINDNER, P.—*Saccharomyces farinosus* and *Bailii*. *Wochensch. f. Brau.* 1895.
- ROUSSY.—Ferments et fermentations, 1901.
- VUILLEMIN, P.—Les champignons. 1912.