

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LAS LEVADURAS DE LA MELAZA DEL COCO COMUN (COCOS NUCIFERA L.)

ZYGOSACCHAROMYCES OCHOTERENAI SP. N.

Por MANUEL RUIZ O.,
del Instituto de Biología.

EL doctor Narciso Sauza se sirvió remitirnos de Mérida, Yuc., cierta cantidad de melaza obtenida con pulpa del coco común (*Cocos nucifera* L.) y azúcar; dicho producto se emplea en Yucatán especialmente para hacer dulces.

El líquido que recibimos tenía un color negruzco, parecido al dulce piloncillo en estado líquido, bastante denso y con un gran número de manchas de color blanco amarillento flotando en la superficie. La forma de las manchas es muy irregular y variada; su aspecto, ligeramente granuloso, como formadas por una multitud de burbujas muy pequeñas; sus dimensiones son de unos cuantos milímetros de diámetro. Entre unas y otras manchas, se encuentra, uniéndolas, una especie de velo muy tenue formado por burbujitas aún más pequeñas, del mismo color que las manchas y abarcando casi toda la superficie del líquido. El olor que despide es muy desagradable y el sabor dulce, un poco ácido.

Después de diez días la superficie del medio está toda cubierta por un espeso velo de color amarillento y en el cual hay una gran cantidad de burbujas de diferentes dimensiones. Con el tiempo se va haciendo más espeso dicho velo y el sabor se vuelve francamente ácido.

Observando el contenido de las manchas al microscopio se nota una gran cantidad de levaduras; no hay bacterias, esporos, micelios u otros microorganismos; el cultivo es puro. Las células tienen una forma muy semejante entre sí, adoptando la mayoría la ovoide (tipo *cerevisiae*), existiendo además la elíptica y la esférica. Dimensiones en la totalidad de las celdillas: 4 a 8 micras de longitud, por 3 a 5 micras de anchura. Protoplasma oscuro, denso, con granulaciones muy pequeñas y refringentes. En algunas células observamos vacuolas que contienen granulaciones animadas de movimiento browniano, y en otras uno o varios glóbulos de grasa de pequeñas dimensiones.

Se notan con claridad células que emiten pequeños brotes y otras con los mismos ya desarrollados y que con facilidad se desprenden de la célula madre al menor movimiento del medio. A los diez días se observan levaduras de forma alargada (8 micras de longitud por 2 a 3 de anchura), con protoplasma muy granuloso y unidas en pequeñas cadenas desde 3 a 6 células. Las de tipo

cerevisiae alcanzan dimensiones de 8 por 4 micras y con brotes laterales y vacuolas. Conforme se va haciendo viejo el cultivo van cambiando las células, y al cabo de tres meses encontramos en ellas las formas más variadas: ovoides, esféricas, elípticas, alargadas, en forma de huevo, etc., predominando siempre el tipo *cerevisiae*. Las dimensiones aumentan muy poco, y en cuanto al protoplasma, contiene gran cantidad de granulaciones metacromáticas, uno o varios glóbulos de grasa y la mayor parte, una vacuola de grandes dimensiones que ocupa casi toda la célula, dejando únicamente una delgada faja de protoplasma en la que hay gran cantidad de granulaciones animadas de movimiento browniano. Se notan algunos casos de conjugación heterogámica y ascas con dos ascosporas.

Siguiendo con exactitud los métodos que recomienda Guilliermond, hicimos el aislamiento y el estudio de estas levaduras obteniendo los datos que se mencionan a continuación:

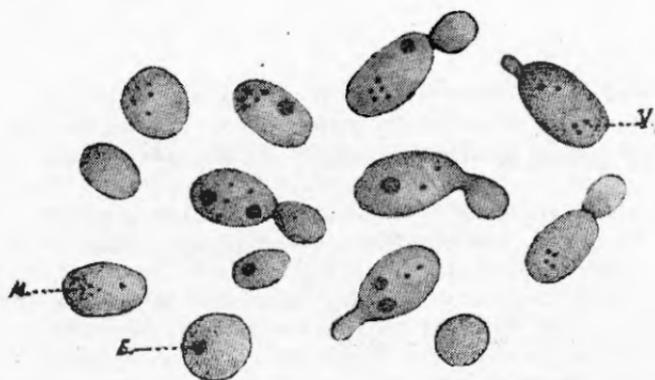


Fig. 1.—Levaduras de la melaza del coco tomadas del medio original. G., glóbulos de grasa. V., vacuolas. M., gránulos metacromáticos. (Preparación y dibujo de M. Ruiz O.).

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION EN MEDIOS LIQUIDOS

Para este objeto, empleamos varios medios, siendo el más apropiado y recomendado el mosto de cerveza, que ha sido el que preferentemente usamos en nuestros estudios micológicos.

Mosto de cerveza.—Sobre este medio y a 15°-20°, se desarrolla la levadura abundantemente bajo la forma de un depósito blanco amarillento, muy grueso, en el fondo del tubo, comenzando a producir a las 12 horas una activa fermentación y enturbamiento del líquido.

Un gran número de burbujas de anhídrido carbónico se desprenden constantemente del fondo y remontan a la superficie en donde se acumulan en gran cantidad. No se forma velo, ni anillo. El tubo desprende un olor aromático agradable. A los diez días, el depósito ha aumentado y la fermentación continúa acumulando burbujas en la superficie. Al cabo de veinticinco días

se esboza la formación de un anillo en las paredes del tubo sin llegar a integrarse, pues pronto desaparece; el medio se hace más turbio y la fermentación disminuye de intensidad. Al mes cinco días, la fermentación cesa y el líquido se clarifica. Las burbujas de la superficie desaparecen; el anillo y velo no llegan a formarse y en cuanto al depósito, es considerable. A 25°-30° todos estos fenómenos se producen con más rapidez, disminuyen a 35°-38°, y cesan a 39°-40°.

Caldo de carne.—Desarrollo muy escaso en forma de depósito constituido por laminitas superpuestas muy transparentes, delgadas y de color blanco grisáceo; no hay fermentación. Al mes se comienza a formar un anillo imperfecto que desaparece a los pocos días. El depósito aumenta muy poco y el líquido no se enturbia. El desarrollo aumenta sensiblemente a 25°-30°, cesando a los 39°-40°.

Caldo de levadura con glucosa.—Se forma depósito de color blanco amarillento, mayor que el obtenido en el medio anterior, pero menor que en mosto. Fermentación escasa; no se enturbia el líquido ni hay formación de velo o anillo. Después de un mes y medio el depósito aumenta muy poco.

Caldo de levadura simple.—Hay un desarrollo escasísimo que apenas si se logra notar en forma de depósito.

CARACTERES MACROSCOPICOS DE LA VEGETACION EN MEDIOS SOLIDOS

Las características de los cultivos en medios sólidos se tomaron después de 30 a 45 días, para estimarlos con mayor precisión.

Mosto gelosado.—Cultivos muy bien desarrollados, de forma ovoide y bordes ligeramente ondulados. El centro un poco elevado y de color café amarillento muy tenue, la periferia de color blanco lechoso. Aspecto húmedo y brillante.

Mosto gelatinizado.—Desarrollo menor que en mosto gelosado. Cultivo de forma circular con bordes enteros, de color blanco amarillento, el centro levantado, de aspecto húmedo y brillante. Se esbozan fisuras radiales de la periferia al centro.

Gorodkowa.—Colonias de forma irregular: circular, alargada, ovoide, etc. y bordes ondulados. Color blanco lechoso, aspecto húmedo y brillante de mayor intensidad que en los demás cultivos.

Sabouraud.—Cultivos muy bien desarrollados, de forma ovoide o circular, bordes ondulados, centro levantado, de color blanco con un matiz ligeramente café, de aspecto húmedo y brillante. Hay fisuras muy finas en la periferia. En los cultivos de tres meses hay muchas fisuras radiadas y el color café es más acentuado.

Papa.—Cultivos poco desarrollados y de forma variable: circular, ovoide, alargada, etc.; de bordes ondulados o recortados, aspecto húmedo y brillante, centro levantado.

Zanahoria.—Desarrollo aún más escaso que en el medio anterior, cultivo en forma circular, bordes recortados, color blanco lechoso, aspecto húmedo y brillante. Centro un poco levantado.

Papa gelosa.—Mayor desarrollo que en los dos últimos medios; cultivos de forma circular, centro levantado, bordes enteros, color blanco lechoso con fisuras muy finas de la periferia al centro.

Caldo de levadura gelosado.—Poco desarrollo, forma ovoide, bordes ondulados, aspecto húmedo y brillante. Color: en el centro café muy tenue, en la periferia blanco lechoso.

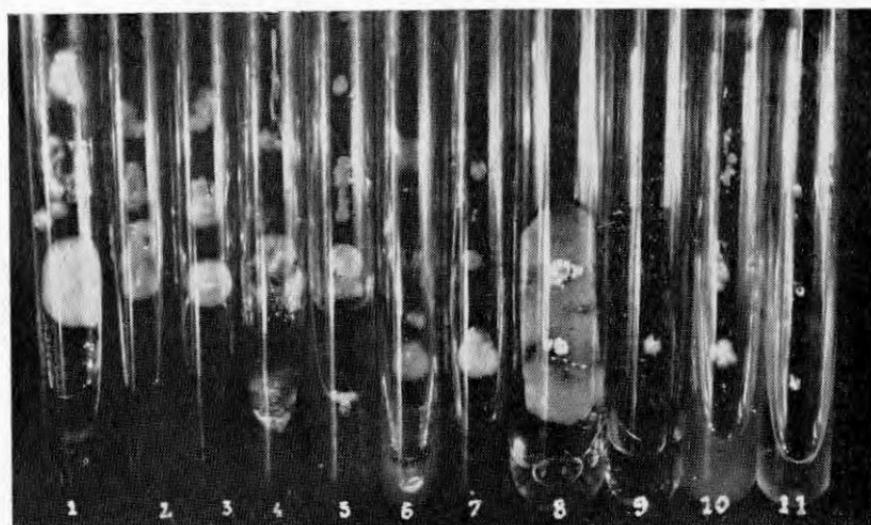


Fig. 2.—Cultivos de las levaduras en diferentes medios sólidos: 1, mosto gelosado; 2, mosto gelosado a 27°-29° (4 días); 3, mosto gelatinizado; 4, Sabouraud; 5, Gorodkova; 6, papa gelosa; 7, caldo de levadura gelosado; 8, papa; 9, zanahoria; 10, gelosa; 11, gelatina. (Preparación de Manuel Ruiz O. Fot. Ignacio Larios).

Gelosa.—Desarrollo muy escaso, forma ovoide, circular o alargada; bordes ondulados o recortados, aspecto húmedo y brillante, pero de menor intensidad que en los demás cultivos; color blanco lechoso.

Gelatina.—Es el medio que proporciona el desarrollo más escaso; el aspecto, color y forma de los cultivos semejantes a los obtenidos en gelosa.

Raulin gelatina.—Cultivos muy semejantes a los del mosto gelatinizado, siendo el desarrollo menor.

Podemos asentar que los medios en que mejor se desarrolla esta levadura son mosto gelosado y Sabouraud y en orden decreciente en mosto gelatinizado,

Gorodkowa, Raulin gelatina, caldo de levadura gelosado, papa, gelosa, zanahoria y gelatina.

Estos cultivos se desarrollaron a la temperatura del laboratorio, o sea entre 15° - 20° , pero si se ponen a 25° - 30° el crecimiento es más intenso y rápido, disminuyendo después de los 30° y cesando a los 39° - 40° .

COLONIAS GIGANTES

Empleamos varios medios en cajas de Petri y de Petroff a la temperatura del laboratorio. Anotamos los caracteres después de un mes a un mes y medio. En mosto gelosado y en Sabouraud es donde obtuvimos colonias de mayores dimensiones, ya que después de mes y medio de cultivo alcanzan 30 a 35 mm. de diámetro. Tienen forma circular, bordes ondulados, centro levantado, color ligeramente café en el centro (más acentuado en mosto gelosado) y en la periferia blanco lechoso, aspecto húmedo y brillante. Se forman, con el tiempo, fisuras que se dirigen de la periferia al centro, en el cual también se forman, pero más finas. Asimismo se llega a observar la formación de círculos concéntricos de crecimiento que limitan dos o tres zonas, las cuales tienen color café más acentuado conforme están más cerca del centro.

En mosto gelatinizado las colonias son de forma ovoide o circular, de bordes ondulados, color el mismo que en los medios anteriores, centro levantado, aspecto ligeramente húmedo y brillante, volviéndose seco y opaco después de dos meses y medio. Se forman fisuras aún más profundas que en mosto gelosado y que en Sabouraud. En los demás medios de cultivo se obtienen colonias de dimensiones mucho menores que en los cultivos anteriormente citados, con características muy semejantes, aunque difieren en ciertos detalles que a continuación enumeramos. En zanahoria, además del aspecto húmedo y brillante lo tienen granuloso; en papa el aspecto es granuloso, seco y opaco; en caldo de levadura gelosado, las colonias, aunque mucho más pequeñas, son semejantes a las que se obtienen en medio de Sabouraud; en gelatina simple, donde se desarrollan las colonias más pequeñas, el color es blanco lechoso en todo el cultivo, la forma irregular, los bordes recortados, y el aspecto seco y opaco; en gelosa simple las colonias únicamente difieren de las de gelatina en que son húmedas y brillantes.

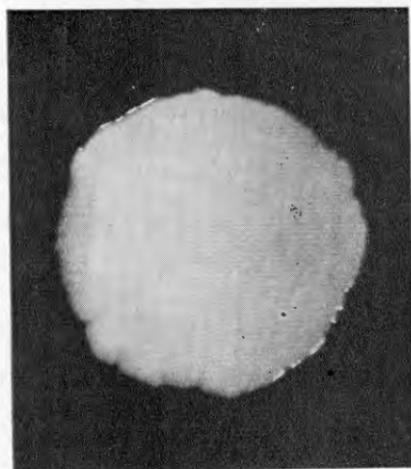
Cuando las colonias gigantes llegan a tener mucho tiempo, las fisuras se les hacen más profundas y la coloración café se acentúa, sobre todo en la parte central.

CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS EN LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

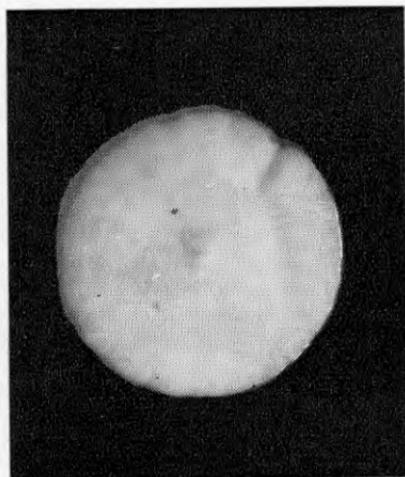
Examinadas las celdillas obtenidas en el depósito de mosto simple después de 48 horas, se notan de forma ovoide y elipsoide (tipos cerevisiae y elipsoideus), habiendo también alargadas y ovoides. Por su forma se parecen a las del *Saccharomyces cerevisiae* y *Sacch. elipsoideus*. Su protoplasma es homogéneo, claro y transparente, con excepción de algunas que poseen pequeños glóbulos de grasa. Las formas alargadas se unen formando cadenas de cuatro o más

células. Dimensiones: las ovoides tienen desde 5 a 8 micras de longitud por 4 a 6 micras de anchura; las elipsoides de 9 a 10 micras de longitud por 4 a 5 de anchura; las alargadas, 12 a 15 micras por 4 a 6 micras. La mayoría, que está constituida por las de tipo *cerevisiae* tienen 6 por 4 micras. La reproducción se efectúa por brote, como lo anotamos al examinar las células obtenidas en el medio original. Sin embargo, hicimos cultivos en cámara húmeda y observamos la formación de los brotes hasta su separación de la célula madre. En las formas alargadas se notan brotes laterales.

Al cabo de 10 ó 15 días las células ofrecen aspecto semejante, pero abundan un poco más las formas alargadas, así como los glóbulos de grasa y las granulaciones metacromáticas en el protoplasma. Después de un mes, aunque hay formas variadas, el tipo *cerevisiae* se conserva y predomina. La mayoría de las células conservan su protoplasma con dos o tres glóbulos de grasa pequeños, muy refringentes y poco gránulos metacromáticos; pero hay algunas, sobre todo entre las elípticas y alargadas cuyo protoplasma está lleno de una gran



A



B

Fig 3.—Colonias gigantes de las levaduras del coco (un mes y medio de cultivo).
A, mosto gelosado; B, Sabouraud. (Preparación de Manuel Ruiz O.
Fot. Ignacio Larios).

cantidad de granulaciones de color oscuro que se establecen en una zona interna y dejan en la periferia una delgada faja de protoplasma homogéneo, transparente y sin granulaciones. En 15 ó 20 días más, no hay células unidas en cadenas, las dimensiones de las celdillas aumentan sensiblemente, el protoplasma se torna granuloso y los glóbulos de grasa adquieren un tamaño mayor. No observamos conjugaciones ni formación de esporas.

Advertimos que las células que vegetan en el anillo que se empezó a formar y que pronto desapareció, tienen características semejantes a las del depósito, siendo sus formas aún más variadas, pero predominando siempre las de tipo ovoide. Las dimensiones también son semejantes con excepción de algunas formas alargadas que alcanzan hasta 30 y 35 micras de longitud y con protoplasma muy granuloso que deja en la periferia una faja delgada sin granula-

ciones. En contado número de células notamos la emisión de prolongaciones protoplásmicas semejantes a las que lanzan cuando van a formar un brote imperfecto que se transforma en microgameto, pero sin llegar a observar la conjugación.

En caldo de levadura con glucosa la forma es menos variable, pues aunque en los primeros días de cultivo encontramos varias formas, con el tiempo sólo hay ovoides y esféricas, que también tienen grasa, granulaciones metacromáticas y vacuolas en cuyo interior se notan gránulos con movimiento browniano. No se llegan a formar cadenas de células, y las dimensiones que en los primeros días son un poco menores que las obtenidas en mosto simple, después de dos meses, son mayores.

En caldo simple, en los primeros días la mayoría de las células son ovoides y esféricas, con protoplasma oscuro, poco transparente y con un gran glóbulo de grasa, que en algunas ocupa casi todo el protoplasma; las formas alargadas son raras, con granulaciones metacromáticas y sin grasa. En cultivos viejos la forma se conserva haciéndose menos variable, ya que desaparecen las alargadas. Las dimensiones de los glóbulos de grasa aumentan hasta llegar a tener entre 2 y 6 micras de diámetro y cesa la emisión de brotes; no hay formación de esporas. Del anillo muy escaso que se formó en este medio, se obtuvieron celdillas de forma esférica principalmente y también ovoides, cuyas dimensiones superan a las obtenidas en otros cultivos; su protoplasma contiene grasa y es oscuro y denso.

Puestos estos medios líquidos a temperatura de 25°-30°, las células aumentan sensiblemente de tamaño, sus brotes son más numerosos y se agrupan formando pequeños racimos y cadenitas, pero solamente después de mucho tiempo.

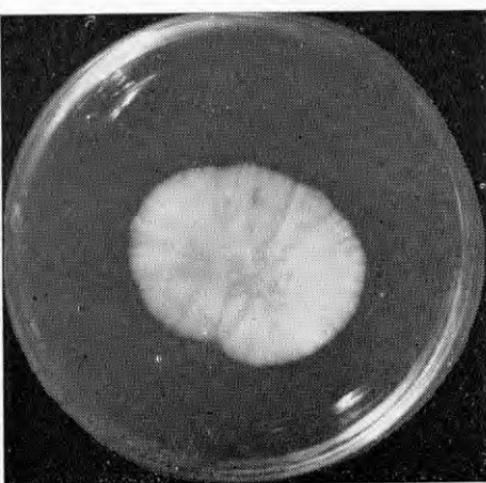
En los medios sólidos se obtienen células de forma y dimensiones semejantes a las de los medios líquidos, pero en algunos de ellos hay ciertas características que ameritan citarse.

En los primeros días de cultivo en mosto gelosado tienen la misma forma y dimensiones que en mosto simple; el protoplasma tiene una o dos granulaciones de grasa y además se nota como formado por círculos concéntricos claros y oscuros. En cultivos de 20-25 días las formas elípticas y alargadas se encuentran en menor número, constituyendo pequeñas cadenitas; en cambio las esféricas son más abundantes y en el protoplasma no se notan los círculos concéntricos como en los primeros días. Al cabo de un mes y medio, desaparecen completamente las formas alargadas y elípticas. Las células se presentan aisladas. En mosto gelatinizado se observan las mismas características anteriores, exceptuando las siguientes: el protoplasma no llega a formar círculos claros y oscuros, glóbulos de grasa más pequeños, no hay gránulos metacromáticos ni vacuolas. Algunas células, al cabo de un mes, comienzan a emitir prolongaciones protoplásmicas, con las que van a formar el microgameto y a los dos meses comienzan a conjugarse y después a transformarse en ascas.

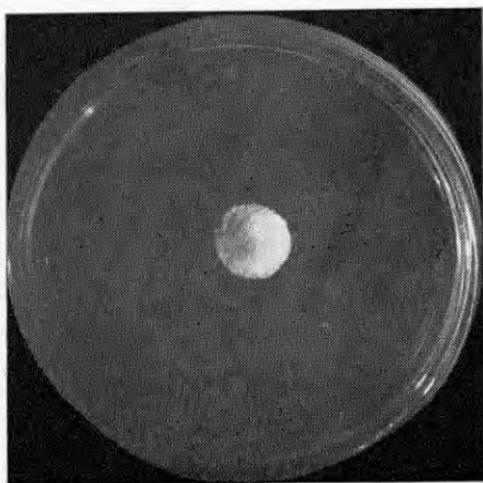
En medio de Sabouraud las células son ovoides, habiendo pocas elípticas con unos cuantos gránulos metacromáticos en su protoplasma. A los 12-15 días se notan brotes laterales y se forman cadenitas de varias celdillas. Después de 35 días a muy pocas les quedan brotes, aparecen formas esféricas de grandes dimensiones, granuladas y con una vacuola. A las de tipo ovoide se les nota un gran glóbulo de grasa. A los dos meses y medio, aún conservan como forma

esencial la ovoide, pero hay otra gran variedad de ellas: esférica (tipo tórula), elíptica (tipo elipsoideus), alargada (tipos *pastorianus* y *mycoderma*), en forma de huevo, y otras más de formas irregulares y extravagantes. Las dimensiones son asimismo muy variadas, llegando a alcanzar algunas formas alargadas hasta 25-30 micras y se constituyen grandes cadenas o falsos micelios. Un gran número de células están en conjugación heterogámica y otras ya transformadas en ascas con una o dos ascosporas.

En los cultivos en papa, en los primeros días, las células tienen las mismas características que en los anteriores; pronto se proveen de grasa y gránulos metacromáticos y a los 12-15 días comienzan a emitir brotes imperfectos que forman después el microgameto, el cual termina por conjugarse con la célula madre. A los 30-40 días hay una gran cantidad de ascas con dos esporas. Exactamente lo mismo observamos en zanahoria, con las únicas diferencias de



A



B

Fig. 4.—Aspecto de las colonias gigantes de las levaduras de la melaza del coco (un mes y medio de cultivo). A, mosto gelatinizado. B, papa. (Preparación de Manuel Ruiz O. Fot. Ignacio Larios).

que la conjugación se efectúa en menos tiempo y de que hay casos de isogamia y otros de transición entre ésta y la heterogamia. En gelosa y gelatina simples las células se comienzan a conjugar desde los 20 días, formándose en gelatina mayor número de ascas. Se notan casos de isogamia y de ascas con tres ascosporas. Las levaduras constituyen especies de racimos que constan de 10 a 40 células.

En caldo de levadura gelosado conservan las formas ovoide y esférica desde los primeros días hasta los cultivos viejos; no llegan a formarse cadenas ni racimos. A los 20 días se notan glóbulos de grasa que lentamente van aumentando de dimensiones hasta ocupar casi toda la célula y muy pocos gránulos metacromáticos. Hasta los tres meses de cultivo comienzan a conjugarse. En Raulin gelatina los caracteres de las células son semejantes a las del cultivo de gelatina,

pero se efectúan pocas conjugaciones y, por lo mismo, se constituyen muy pocas ascas. En papa gelosada hoy formas elípticas y después de mes y medio aún hay algunas alargadas, unidas en cadenitas, con protoplasma granuloso y glóbulos de grasa, pero hay poquísimos casos de conjugación y de esporulación. En medio de Gorodkova observamos las mismas características que en Sabouraud, pero sólo en los primeros días, ya que pronto dejan de dar brotes y se llenan de grasa y gránulos metacromáticos. Hasta los 25-30 días comienzan algunas a conjugarse y a esporular, llegando a ser el número de ellas muy corto. En cultivos viejos hay varias formas celulares con vacuolas.

Por lo dicho anteriormente, podemos notar que, en todos los medios, las células de la levadura conservan características semejantes, sobre todo en la forma y dimensiones; que pronto adquieren glóbulos de grasa y gránulos metacromáticos, cuyo número y dimensiones van aumentando con la edad del cultivo y que en la mayoría de esos medios de cultivo llegan a esporular.

TEMPERATURAS LIMITES Y OPTIMAS PARA EL BROTE Y LA FORMACION DE VELOS

Procedimos a determinar la temperatura máxima del brote que resultó ser de 37°-38°. Se hicieron pruebas a 39°-40°, pero no se obtuvo ningún desarrollo de la levadura. A la temperatura máxima, y a los siete días, en mosto gelosado y Sabouraud se obtuvieron colonias de color blanco grisáceo, de forma alargada, muy pequeñas, de bordes ondulados y recortados, de aspecto húmedo y brillante. El aspecto microscópico de las celdillas difiere poco de las obtenidas a la temperatura del laboratorio: forma y dimensiones semejantes, en el protoplasma de algunas de ellas se notan círculos concéntricos que forman zonas claras y oscuras como las de los cultivos en mosto gelosado, pero la mayoría de ellas son muy granulosas, limitándose con perfección una zona interna muy amplia y que contiene las granulaciones y una faja de protoplasma muy delgada en la periferia, homogénea y sin granulaciones.

Para determinar la temperatura óptima se hicieron siembras en tubos de mosto gelosado a 23°, 25°, 27°, 28°, 30° y 33°; al cabo de cuatro días comparando las diferentes colonias llegamos a la conclusión de que el punto óptimo de crecimiento está entre 25° y 28°, ya que a estas temperaturas se obtienen mayores desarrollos. A temperatura óptima, las colonias tienen caracteres macroscópicos semejantes a los obtenidos a la temperatura del laboratorio, y los caracteres microscópicos de las células solamente difieren en que toman una forma ovoide y esférica aún más regular y constante; en cuanto al protoplasma se le notan varios glóbulos pequeños de grasa, generalmente de 5 a 8, pero en algunas células hasta 20 y 25 y escasos gránulos metacromáticos.

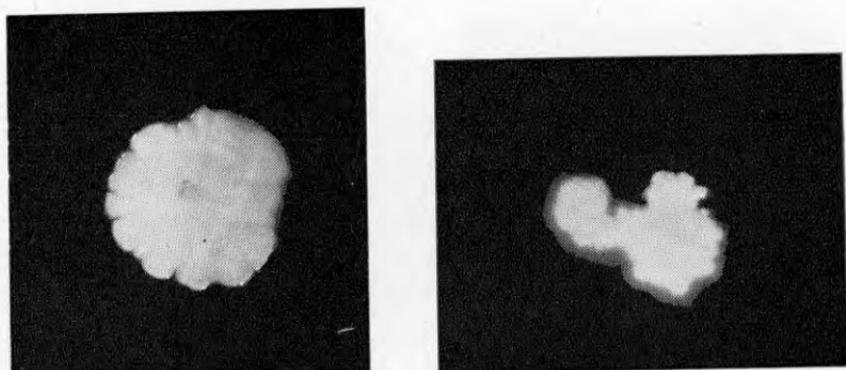
Para la temperatura mínima, se hicieron pruebas con mosto gelosado a 0°, 1°, 2°, y no se obtuvo ningún desarrollo, pero a 3°-4°, y después de 10 días, se desarrollaron colonias macroscópicas circulares, de aspecto húmedo y brillante con 1 a 2 mm. de diámetro. Por lo tanto, la temperatura mínima del brote está situada entre 3°-4°. Los caracteres microscópicos de las levaduras a esta temperatura son muy semejantes a los obtenidos en cultivos a temperatura del laboratorio y que ya citamos.

ESPORULACION

Para hacer esporular una levadura hay ciertos medios especiales como el Gorodkowa, zanahoria, papa y en discos de Petri y de yeso; pero en casi todos los medios de cultivo, cuando han envejecido, se forman ascas.

En donde mejor y más rápidamente observamos la esporulación fué en cultivos de cámara húmeda, zanahoria, papa y gelatina. Comenzamos por hacer varias siembras sucesivas en tubos de mosto a fin de que la levadura se provea de bastantes materiales nutritivos para poder formar las esporas.

A continuación hicimos los cultivos en cámara húmeda en donde se observa la sucesión de los fenómenos que en seguida exponemos: a las 48 horas, las células dejan de dar brotes y aparecen en su protoplasma pequeños glóbulos de grasa, gránulos metacromáticos y glucógeno; a los cuatro días en ninguna célula se notan nuevos brotes, los glóbulos de grasa se unen y forman uno solo de grandes dimensiones, los gránulos metacromáticos son más numero-



A

B

Fig. 5.—Colonias gigantes de las levaduras del coco (un mes y medio de cultivo).
•A, caldo de levadura gelosado; B, gelosa. (Preparación de Manuel Ruiz O. Fot. Ignacio Larios).

sos, aumentando asimismo la cantidad de glucógeno. Después de 5-6 días las células comienzan a emitir, generalmente por una de sus extremidades, una pequeña prolongación protoplásmica, aunque también lo pueden hacer lateralmente. Esta pequeña prolongación se ensancha en su extremidad, tomando la forma ovoide o esférica, se inclina hacia la célula madre quedando unida a ella por un canalito muy delgado; al mismo tiempo se notan brotes alrededor de la célula madre. En 2-3 días más, el protoplasma de la célula pequeña comienza a ser absorbido a través del canalito por la célula de mayores dimensiones, de modo que se efectúa una conjugación heterogámica entre la célula madre (macrogameto) y la célula hija (microgameto). Queda vacío el microgameto y en el macrogameto se comienzan a formar sucesivamente dos esporas que adoptan forma ovoide generalmente, aunque algunas son esféricas; tienen 4 micras de longitud por 3 micras de anchura y con membrana muy clara que separa perfectamente su contenido, del protoplasma del asca, que es más refringente y con pequeñas granulaciones de grasa, animadas de movimiento

browniano. El microgameto puede quedar unido al macrogameto por unos días; después se desprende y se disuelve en el medio. En ocasiones las ascas tienen 1 ó 3 ascosporas. Cuando comienzan a formarse las esporas se inicia la desaparición de los glóbulos de grasa, de los gránulos metacromáticos y del glucógeno; ya formadas, siguen alimentándose a expensas de dichas substancias de reserva, y aumentan lentamente de dimensiones hasta llenar completamente el asca tendiendo a tomar la forma esférica. La forma y dimensiones del asca son las mismas que tenía la célula antes de emitir el microgameto; en cuanto a este último, toma forma ovoide, esférica y en pocas ocasiones elíptica, alcanzando 3 a 4 micras de longitud, por 2.5 a 3 micras de anchura.

La conjugación se hace en la mayoría de las células por uno de los extremos del macrogameto, pero se notan también casos en que se hace lateralmente. Hasta donde nos fué posible observar la evolución de los cultivos, notamos que una gran parte de las células no se transforman en ascas, por lo mismo es muy probable que en esta levadura, como cita Guilliermond, refiriéndose a varias especies de *Zygosaccharomyces*, se encuentre además de la raza que forma esporas, otra asporógena.

Lo mismo que en *Zygosaccharomyces nadsonii* descrita por Guilliermond, se observan frecuentemente en esta levadura series de transición entre la isogamia y la heterogamia. En todos los cultivos se notan, aunque en corto número, células en conjugación con las mismas dimensiones y, en ambas, formación de esporas. En otros casos las células en conjugación tienen iguales dimensiones, pero sólo una se transforma en asca, y por último, conjugaciones en las que el macrogameto es un poco más grande que el microgameto.

La conjugación y la formación del asca y de las ascosporas, presentan las mismas características en todos los medios, notándose con mayor claridad, rapidez y abundancia en los cultivos de zanahoria, gelatina y papa. Hicimos la prueba de la esporulación en discos de Petri estériles y húmedos, pero fué muy lenta y solamente se efectuó en corto número de células; en cambio, en otras levaduras, como la *Pichia radaisii* esporula a las 24 horas, en caja de Petri.

Temperaturas límites y óptima para la esporulación.—A 32°, 34° y 36°, no hay formación de esporas, aun después de un mes de cultivo. A 28° y 30°, se forman las ascas muy lentamente al cabo de 10 a 12 días, por lo mismo ésta es la temperatura máxima para la formación de esporas. La óptima está situada entre 22°-25°, y la mínima, de 6° a 9°. Las características de la conjugación, formación de ascas y ascosporas, son las mismas a estas temperaturas que a la del laboratorio.

CARACTERES BIOQUÍMICOS

Fermentación.—Para este dato de suma importancia usamos el método de las pequeñas fermentaciones de Lindner, con porta-objetos excavados que tienen una cámara de fermentación de 15 mm. de diámetro por 1 mm. de espesor. Empleamos varios azúcares, haciendo dos pruebas de cada uno, para así descartar errores posibles y a temperatura de 25°. Los resultados obtenidos a las 24 horas fueron las siguientes:

Sacarosa.—En una de las pruebas se obtuvo una burbuja de anhídrido carbónico que llenó completamente la cámara de fermentación, y hasta algunas pequeñas burbujas se escaparon de la misma, extendiéndose entre el porta y el cubre-objeto. La otra dió una de una burbuja de 12 mm. de diámetro.

Lactosa.—En las dos pruebas se obtuvieron burbujas de 10 y 12 mm. de diámetro, respectivamente.

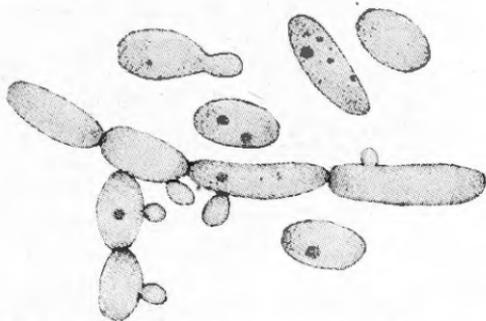


Fig. 6.—Levaduras de la melaza del coco en mosto simple, a las 48 horas de cultivo. (Preparación y dibujo de M. Ruiz O.).



Fig. 7.—Aspecto de las levaduras de la melaza del coco en mosto simple, después de un mes de cultivo. (Preparación y dibujo de Manuel Ruiz O.).

Maltosa.—Las dos pruebas fermentaron, dando burbujas de 11 mm. y 13 mm. de diámetro.

Manosa.—Las burbujas obtenidas alcanzaron 6 y 10 mm. de diámetro.

Levulosa.—En una de las pruebas una burbuja de 10 mm. de diámetro, y en la otra varias burbujas pequeñas.

Glucosa.—No hubo fermentación a las 24 horas, pero a las 48 horas se obtuvo una burbuja de 8 mm. de diámetro en ambas pruebas.

Galactosa.—Hasta las 48 horas fermentó, formándose burbujas de 5 mm. de diámetro.

Dextrina.—Las dos pruebas fermentaron con burbujas de 6 mm. de diámetro.

Por los resultados anteriores se puede notar que esta levadura tiene un gran poder fermentativo sobre todos los azúcares, siendo más fuerte en los disacáridos que en los monosacáridos.

Inversión de la sacarosa.—Tomamos levaduras cultivadas en mosto simple y gelosado y las colocamos en tubos que contenían una solución de 5% de sacarosa en agua destilada estéril. Colocamos 3 tubos a 25° y otros tres a la temperatura del laboratorio (15°-20°). A las 48 horas se filtró el líquido y se

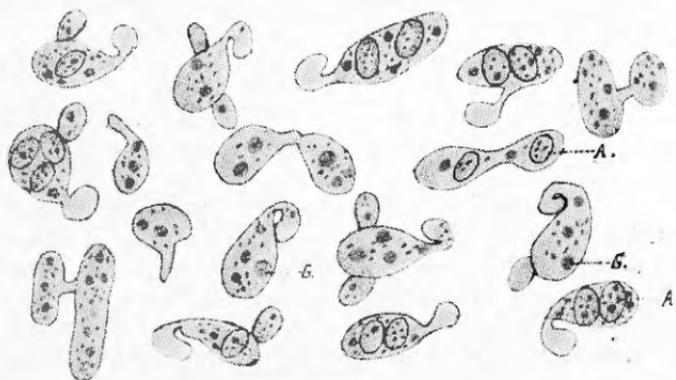


Fig. 8.—Levaduras de la melaza del coco en conjugación y esporulación, tomadas de un cultivo de zanahoria de 15 días. A, Ascosporas; G, glóbulos de grasa. (Preparación y dibujo de Manuel Ruiz O.).

efectuó la prueba con licor de Feheling y en caliente. El resultado fué positivo para los tubos mantenidos a 25°, y negativo para los que se dejaron a la temperatura del laboratorio. La inversión es muy débil si la levadura se ha cultivado previamente en Gorodkova, gelatina o Raulin gelatina.

AFINIDADES

Por la forma de sus células y por la manera de dar sus brotes, esta levadura es semejante al *Saccharomyces cerevisiae*; pero presenta caracteres muy especiales que la separan de un gran número de especies descritas. Desde luego, fermenta todos los azúcares que ya citamos anteriormente, y además sus células cambian poco de forma en los diferentes cultivos, conservando el tipo *cerevisiae* que es la forma esencial.

Por su manera de esporular, o sea previa conjugación heterogámica, por las series de transición que se observan entre la iso y la heterogamia, por el número de esporas que dan las ascas, y por otras características de suma importancia, indudablemente que con la especie que más afinidades tiene es con *Zygosaccharomyces nadsonii*, descrita por Guilliermond en 1918.

Para clasificar estas levaduras, insertamos a continuación un cuadro de las características esenciales que presentan el *Zygosaccharomyces nadsonii* y las levaduras de la melaza del coco.

Zygosaccharomyces nadsonii.
Guilliermond

Levaduras de la melaza del coco

- | | |
|---|--|
| 1. Aisladas de una botella de jarabe de naranja. | 1. Aisladas de la melaza obtenida con la pulpa del coco común y azúcar. |
| 2. A las 12 horas, en tubo de mosto simple y a 25°-30° forma depósito blanco. | 2. A las 24 horas, en tubo de mosto simple y a 25°-30° forma depósito blanco amarillento. |
| 3. En pocos días se produce sobre la superficie del líquido un velo muy delicado. | 3. No se produce velo en ningún medio ni a diferentes temperaturas. |
| 4. Se desarrolla un anillo que cae pronto al fondo del tubo. | 4. A los 25 días se esboza un anillo que no llega a formarse. |
| 5. En mosto se obtienen células ovales o redondas a las 12 horas, y generalmente unidas en pequeños grupos. | 5. En mosto se obtienen células ovales, muy pocas redondas a las 24 horas, y no se unen en grupos. |
| 6. Células con brotes por toda la periferia, semejándose a las <i>Tó-rulas</i> , aun en cultivos jóvenes. | 6. Células con brotes por toda la periferia, únicamente en ciertos cultivos viejos. |
| 7. Temperatura máxima del brote 41°-42°, óptima cerca de 30°, y mínima entre 3° y 5°. | 7. Temperatura máxima del brote, 37°-38°, óptima 25°-28°, y mínima 3°-4°. |
| 8. A temperaturas límites las células tienden a hacerse alargadas como en el tipo <i>pastorianus</i> . | 8. A temperaturas límites conservan la misma forma. |
| 9. Se forman ascosporas abundante y rápidamente en <i>Gorodkowa</i> y más lentamente en zanahoria. | 9. En <i>Gorodkowa</i> se forman pocas ascosporas con mucha lentitud, y rápidamente y en gran número en zanahoria. |

- | | |
|---|--|
| 10. El asca resulta generalmente de una conjugación heterogámica, habiendo series de transición entre la iso y la heterogamia. | 10. El asca se forma de la misma manera, encontrando también las series de transición ya citadas. |
| 11. Generalmente se forman 1 a 2 ascosporas, excepcionalmente 3 ó 4. | 11. Generalmente 2 ascosporas, excepcionalmente 1 ó 3. |
| 12. Temperatura máxima de esporulación 30°-32°, óptima entre 23° y 30°, mínima alrededor de 5°. | 12. Temperatura máxima de esporulación 28°-30°, óptima 22°-25°, mínima entre 6° y 9°. |
| 13. Invierte la sacarosa cuando se cultiva en mosto. | 13. Invierte la sacarosa cultivada en cualquier medio. |
| 14. No fermenta el mosto. | 14. Fermenta el mosto activamente. |
| 15. Fermenta dextrosa y levulosa únicamente. | 15. Fermenta activamente sacarosa, maltosa, lactosa, manosa, dextrina, dextrosa, levulosa y galactosa. |
| 16. Colonias gigantes en mosto gelatinizado con apariencia seca, color blanco amarillento, centro ligeramente levantado y pocos milímetros de diámetro. | 16. Colonias gigantes en mosto gelatinizado con apariencia húmeda, color blanco café en el centro y blanco lechoso en la periferia; fisuras muy delicadas de la periferia al centro, el cual está un poco levantado y alcanza varios milímetros de diámetro. |

Por los datos expuestos, esta levadura pertenece al género *Zygosaccharomyces*, y consideramos que es una especie nueva, para la cual proponemos el nombre de *ochoterenai*, que con todo respeto nos permitimos dedicar a nuestro ilustre maestro, Profesor Ochoterena, que siempre se ha interesado por los estudios micológicos, y bajo cuya dirección nos fué posible elaborar el presente trabajo.

SUMMARY

This studies the description of a new species of yeast obtained from the melasses of the common coconut, which comes from the state of Yucatan.

Owing to its way of reproducing, that is by budding, to the ascus resulting from a heterogamic conjugation and to the formation of one or three ascospores with a thin membrane, they are placed in the genus *Zygosaccharomyces*; but at the same time it is considered necessary to create a new species,

which we have named *ochoterenai*, dedicated to our Professor, Isaac Ochoterena, Director of the Institute of Biology. This new species is created on account of the following characteristics that distinguish it from the other species so far described:

- 1° It forms a deposit and never a veil.
- 2° The maximum temperature of budding is 37°-38° C.; optimum 25°-28° C.; minimum 3°-4° C.
- 3° Two ascospores are formed; exceptionally one or three.
- 4° The maximum temperature for sporulation is 28°-30° C.; optimum 22°-25° C.; minimum 6°-9° C.
- 5° It inverts saccharose cultivated in any medium.
- 6° It ferments saccharose, maltose, lactose, manose, dextrine, dextrose, levulose and gelactose.

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.

HENRICI, A. T.—Molds, yeasts, and actinomycetes. 1930.

LEVY, L.—Microbes et distillerie. 1900.

ROUSSY.—Ferments et fermentations. 1901.

VUILLEMIN, P.—Les champignons. 1912.