

ESTUDIO DE *CANDIDA KRUSEI* (A. CAST.) BERKHOUT,
AISLADA DE LA EPIDERMIS DEL BULBO
DE AJO (*ALLIUM SATIVUM*)

Por MANUEL RUIZ ORONoz y
TEÓFILO HERRERA SUÁREZ,
del Instituto de Biología.

El aislamiento de esta levadura se hizo de una infusión de la epidermis del bulbo del ajo (*Allium sativum*) elaborada en la siguiente forma: 200 c. c. de agua de la llave, con 2% de glucosa, se hirvieron durante 20 minutos en un matraz; una vez que el líquido se enfrió, se agregaron varios fragmentos sin lavar de la epidermis del bulbo de ajo, cerrándose el matraz perfectamente con algodón y dejándolo a la temperatura del laboratorio. A las 48 horas se observó en el matraz una fermentación muy clara del líquido, y en la superficie del mismo una membrana blanquecina sin brillo y rugosa.

Observando un fragmento de la película con el microscópio, se encontró gran cantidad de levaduras, que se cultivaron primeramente en varias cajas de Petri con objeto de observar la diferenciación de las colonias, las cuales, al desarrollarse, mostraron a simple vista un aspecto completamente semejante. A continuación, y partiendo de una colonia, se hizo el aislamiento de la cepa pura por el método de "pequeñas gotitas" de Lindner en mosto de cerveza líquido.

CARACTERES MACROSCOPICOS DEL CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO

Mosto de cerveza

Temperatura: 18° - 20° C.

Anillo: A las 24 horas comienza a formarse un anillo, el cual a las 48 horas está completamente formado, siendo un poco opaco, de

color blanco grisáceo, y se eleva sobre el medio como un centímetro. Con el tiempo se torna opaco, bastante denso, y lentamente va desapareciendo.

Velo: A las 24 horas se observa la aparición de una película muy delgada y blanquizca en la superficie del medio. A las 48 horas se forma un velo completo, membranoso, rugoso, opaco, sin brillo y de color blanco grisáceo. A los pocos días se encuentra muy plegado, numerosos fragmentos del mismo caen al fondo del tubo, y termina por desaparecer.

Fermentación: A las 48 horas se observa una fermentación intensa que continúa durante un día y se suspende.

Turbidez: Es muy aparente a las 48 horas y continúa durante varios días.

CARACTERES MACROSCOPICOS DEL CULTIVO EN MEDIOS SOLIDOS

CULTIVOS EN PLACA

Mosto de cerveza gelosado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 10 días.

Forma: circular y en algunos casos rizada.

Color: blanco grisáceo.

Superficie: rugosa y concéntricamente anillada.

Elevación: en algunas colonias es aplanada, y en otras es un poco convexa y umbonada.

Borde: en los primeros días es ondulado y después se torna ciliado.

Caracteres ópticos: opaco en el centro, opalino en la periferia.

Estructura interna: granular fina en el centro, filamentosa en la parte periférica.

Consistencia: butirosa.

Brillo: ligero o nulo.

Acción sobre el medio: ninguna.

Mosto de cerveza gelatinado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 10 días.

Forma: circular.

Color: blanco grisáceo.

Superficie: rugosa.

Elevación: levantada.

Borde: ciliado; los cilios son más largos y ramificados que en mosto gelosado.

Caracteres ópticos: opaco.

Estructura interna: filamentosa.

Consistencia: butirosa.

Brillo: ligero o nulo.

Acción sobre el medio: licuefacción muy lenta que se hace muy clara a los 40 días.

Sabouraud

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 10 días.

Forma: circular o rizada.

Color: blanco cremoso; ligeramente amarillento en el centro.

Superficie: lisa.

Elevación: elevada en el centro; aplanada en la periferia.

Borde: ciliado y con filamentos ramificados.

Caracteres ópticos: opaco.

Estructura interna: granular fina.

Consistencia: butirosa.

Brillo: ligero; más marcado en el centro.

Acción sobre el medio: ninguna.

CULTIVOS EN ESTRIA

Mosto de cerveza gelosado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 10 días.

Forma: equinulada.

Superficie: rugosa.

Elevación: aplanada.

Borde: ciliado y con filamentos ramificados.

Color: blanco grisáceo.

Caracteres ópticos: en el centro opaco y en la periferia opalino.

Estructura interna: granular fina en el centro y un poco filamentososa en la periferia.

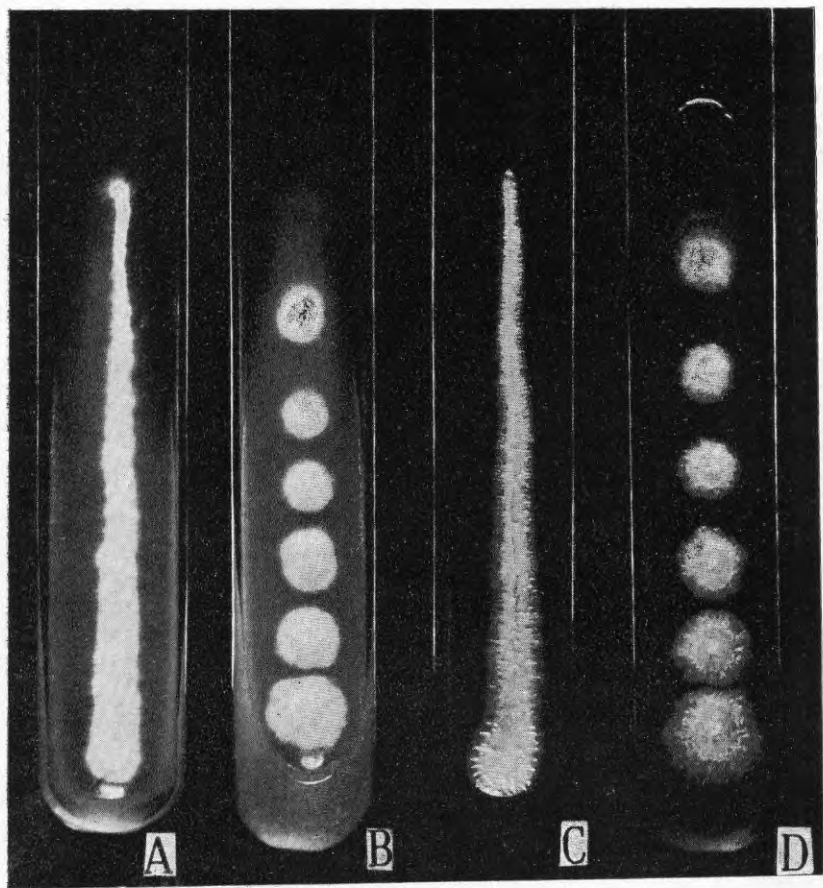


Fig. 1. Cultivos en estria y en placa de *Candida Krusei* (10 días). A y B, Sabouraud; C y D, mosto de cerveza gelosado

Consistencia: butirosa.

Brillo: muy poco o nulo.

Acción sobre el medio: ninguna.

Mosto de cerveza gelatinado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 10 días.

Forma: filiforme.

Superficie: rugosa.

Elevación: levantada.

Borde: ciliado; cilios más largos y ramificados que en mosto gelosado.

Color: blanco grisáceo.

Caracteres ópticos: opaco.

Estructura interna: filamentosa.

Consistencia: cremosa muy suave.

Brillo: muy poco o nulo.

Acción sobre el medio: licuefacción muy lenta que se hace muy típica a los 40 días.

Sabouraud

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 10 días.

Forma: equinulada.

Superficie: lisa; con el tiempo se torna levemente rugosa.

Elevación: aplanada en la periferia y elevada en la región central.

Borde: ciliado y con filamentos.

Color: blanco cremoso y ligeramente amarillento en la región central.

Caracteres ópticos: opaco.

Estructura interna: granular fina.

Consistencia: butirosa.

Brillo: muy ligero; un poco más acentuado en el centro.

Acción sobre el medio: ninguna.

CULTIVOS EN PICADURA

En mosto de cerveza gelosado y a 18° - 20° C., el crecimiento en la superficie es rápido y pronto cubre casi todo el medio. A lo largo del piquete el desarrollo es intenso, con aspecto velloso-equinulado, opaco,

de color blanco grisáceo y con bordes ciliados. Se observa claramente una fermentación del medio de cultivo, formándose burbujas de gas que rompen el mismo.

En mosto de cerveza gelatinado y a la misma temperatura citada anteriormente, el cultivo se desarrolla en la superficie con menos intensidad que en mosto gelosado. A lo largo del piquete el crecimiento es escaso, con aspecto vellosos-equinulado, ligeramente transparente, de color blanco grisáceo y con bordes ciliados. En el medio se observa una lenta licuefacción y numerosas burbujas de gas por efecto de la fermentación del mismo.

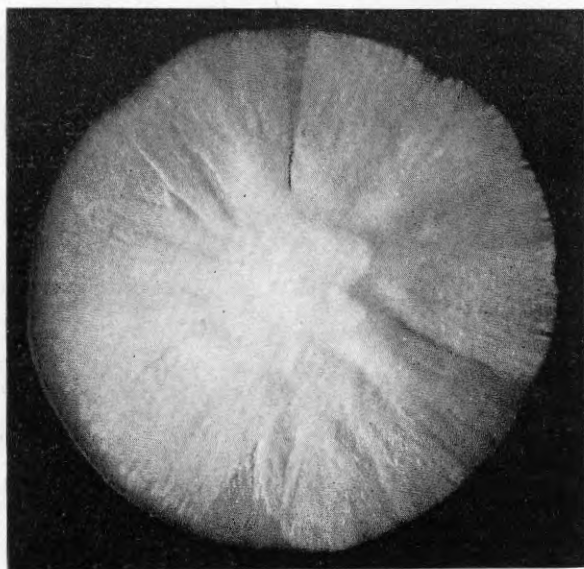
En Sabouraud los cultivos muestran caracteres semejantes a los descritos en mosto gelosado.

CARACTERES DE LAS COLONIAS GIGANTES

Mosto de cerveza gelosado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 30 días.



de cerveza gelosado (30 días)

Fig. 2. Colonia gigante de *Candida Krusei* en mosto

Forma: circular.

Superficie: rugosa en el centro y lisa en la periferia; se forman algunas estrías radiales muy poco marcadas.

Elevación: plana y un poco levantada en el centro.

Bordes: ciliados y con filamentos ramificados.

Color: blanco grisáceo.

Caracteres ópticos: opaco en el centro y translúcido en la periferia.

Consistencia: butirosa y ligeramente viscosa.

Brillo: escaso o nulo.

Estructura interna: en la periferia filamentosa y en el centro granular fina.

Dimensiones: 6 cms. de diámetro.

Mosto de cerveza gelatinado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 30 días.

Forma: circular.

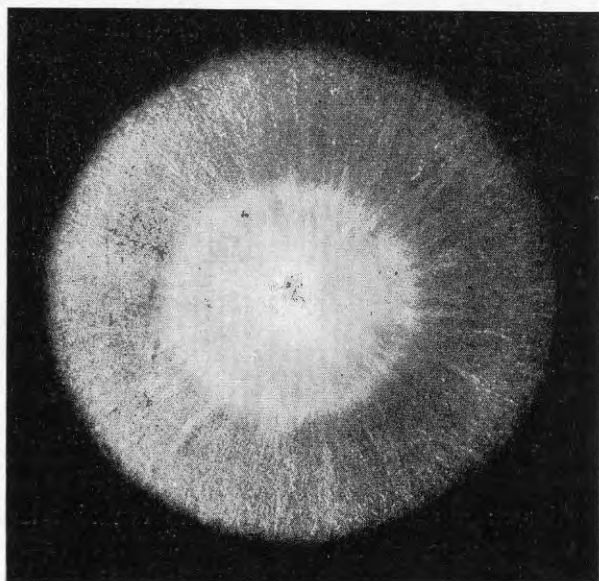


Fig. 3. Colonia gigante de *Candida Krusei* en mosto de cerveza gelatinado (30 días)

Superficie: en la región central lisa y en el resto de la colonia muestra un aspecto ligeramente veloso y pulverulento. Se notan, además, unas líneas muy finas que en forma radial se extienden del centro a la periferia.

Elevación: plana y un poco elevada en el centro.

Borde: finamente ciliado y con filamentos ramificados.

Color: blanco grisáceo.

Caracteres ópticos: opaco en el centro y translúcido en la periferia.

Consistencia: butirosa y ligeramente viscosa.

Brillo: escaso o nulo.

Estructura interna: granular fina.

Dimensiones: 7 cms. de diámetro.

CARACTERES MICROSCOPICOS DE LAS CELULAS

Mosto de cerveza líquido

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 48 horas.

Forma: células cilíndricas y largo-ovales principalmente, pero las hay también elípticas, ovoides, esféricas y algunas piriformes.

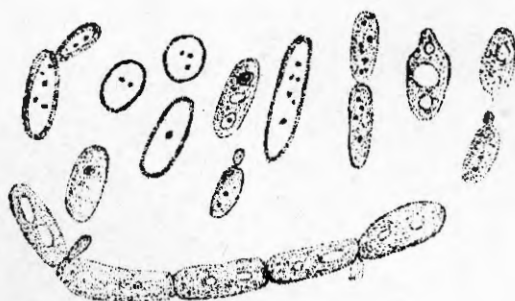


Fig. 4. *Candida Krusei* en mosto de cerveza líquido (48 horas)

Agrupamiento: muchas células se encuentran aisladas, pero otras se unen formando pseudomicelios.

Citoplasma: transparente, hialino y sin granulaciones.

Vacuolas: algunas células sin vacuolas, otras con una o dos pequeñas, y las hay con una gran vacuola que ocupa casi todo el elemen-

to celular. Dentro de las vacuolas se notan granos de volutina muy pequeños.

Grasa: en pocas células se notan uno o dos glóbulos de grasa pequeños y muy refringentes.

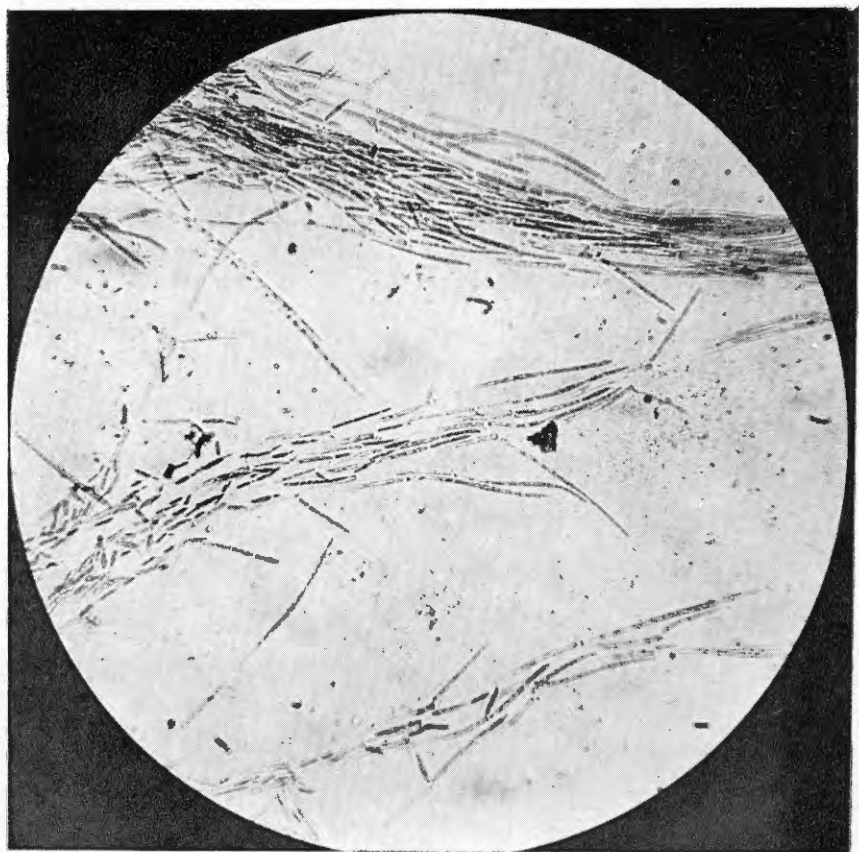


Fig. 5. Micrografía del pseudomicelio de *Candida Krusei* en mosto de cerveza gelosado (48 horas)

Reproducción: en muchas células que se encuentran aisladas se notan brotes unipolares, y en los pseudomicelios se observan blastosporas en los puntos de unión de las células.

Ascas y ascosporas: no se forman.

Dimensiones: sumamente variadas, desde 2.5 a 5 micras de ancho, por 4 a 9 micras de longitud. Las que forman pseudomicelios son más grandes y alcanzan desde 10 a 15 micras de longitud y aun más.

Mosto de cerveza gelosado

Temperatura: 18° - 20° C.

Edad del cultivo: 48 horas.

Forma: células cilíndricas y largo-ovales y algunas muy alargadas; las hay también elípticas, esféricas y ovoides.



Fig. 6. Células de *Candida Krusei* aisladas y formando pseudomicelio con blastosporas, en mosto de cerveza gelosado (48 horas)

Agrupamiento: aisladas y formando largos pseudomicelios más desarrollados que en el medio anterior.

Citoplasma: transparente y hialino.

Vacuolas: no se observan.

Grasa: en pocas células existen uno, dos o varios glóbulos pequeños.

Reproducción: en las células que están aisladas se notan brotes unipolares, y en las que forman pseudomicelios se encuentran blastosporas.

Ascas y ascosporas: no se forman.

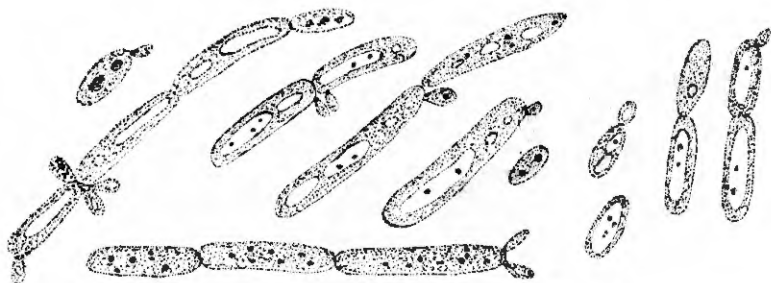


Fig. 7. Células de *Candida Krusei* en mosto de cerveza gelatinado (48 horas). Algunas muestran blastosporas

Dimensiones: de 2.5 a 5.5 micras de ancho por 5 a 9 micras de longitud. Hay muchas bastante grandes de 15-20 y 25 micras de largo, especialmente las que forman los pseudomicelios.

En mosto de cerveza gelatinado y en Sabouraud las células muestran caracteres muy semejantes a los descritos anteriormente, con diferencias muy ligeras. En mosto gelatinado se obtiene un pseudomicelio mejor desarrollado y las células de formas alargadas y delgadas son más abundantes.

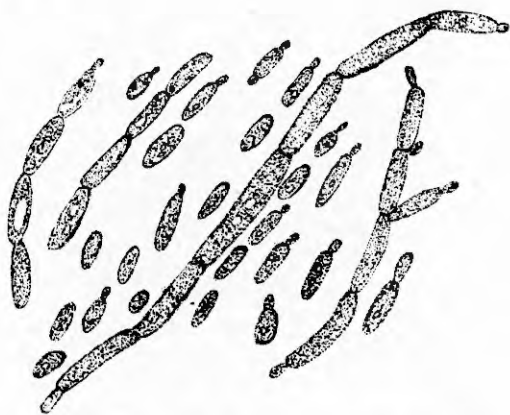


Fig. 8. *Candida Krusei* en medio de Sabouraud (48 horas)

ESPORULACION

Para la obtención de ascas y ascosporas se recurrió a los diversos métodos y medios de cultivo recomendados al respecto, especialmente a las siembras en discos de yeso, siendo en todos los casos los resultados completamente negativos.

CARACTERES BIOQUIMICOS

Licuefacción de la gelatina: muy lenta; a los 40 días se hace bastante clara.

Fermentación de los azúcares:

Dextrosa	⊕	Sacarosa	—
Levulosa	⊕	Maltosa	—
Manosa	⊕	Lacrosa	—
Galactosa	—		

Asimilación de los azúcares (según el método auxanográfico de Beijerinck):

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

Asimilación del nitrógeno (según el método auxanográfico de Beijerinck):

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

Alcohol etílico como sustrato de crecimiento: Se logró un crecimiento regular, pues a los ocho días se forma en la superficie del medio un velo delgado, plegado y opaco; asimismo se genera un anillo en las paredes del tubo.

Cultivo en leche: El medio no se altera; crecimiento con formación de sedimento.

Cultivo en leche litmus: No hay producción de ácido ni de álcali; tampoco se efectúa coagulación, ni peptonización, ni reducción del colorante. No hay fermentación.

Cultivo en leche con bromocresol púrpura: Reducción del colorante a los 12 días.

CLASIFICACION

La levadura que se estudia en este trabajo, pertenece a las levaduras anascosporógenas, ya que no forma esporas. De acuerdo con la clasificación de Lodder, la colocamos dentro de la familia *Torulopsidaceae* y subfamilia *Mycotoruloideae*, pues forma pseudomicelio y blastosporas. Tomando en cuenta la clave de los géneros de la subfamilia *Mycotoruloideae*, según Diddens y Lodder, queda colocada en el género *Candida* porque forma blastosporas y no artrosporas, y también porque no se forman células ojivales y en condiciones aerobias no hay formación intensa de ácido. Asimismo, y conforme a las claves de las especies de los citados autores, corresponde a la especie *Candida Krusei* (A. Cast.) Berkhout por los siguientes caracteres: fermenta dextrosa (L., M.), asimila dextrosa (L., M.), formación de un velo mate en mosto y cultivo en estría en mosto agar también mate.

RESUMEN

En el presente trabajo se hace un estudio de *Candida Krusei* (A. Cast.) Berkhout, levadura aislada de la epidermis del bulbo del ajo (*Allium sativum*). Sus caracteres principales son: en mosto de cerveza líquido produce un velo mate desde el principio, anillo y sedimento; en mosto de cerveza gelosado el cultivo en placa es circular, de superficie rugosa, elevación aplanada o un poco convexa, bordes ciliados, opaco, butiroso, blanco grisáceo y sin brillo o con brillo muy ligero; el cultivo en estría en el mismo medio es equinulado, rugoso, aplanado, de bordes ciliados, blanco grisáceo, mate, butiroso y opaco. En mosto se forman células cilíndricas, largo-ovales, alargadas, ovoides, esféricas, piriformes, aisladas o formando pseudomicelio con blastosporas, y con dimensiones de 2.5 a 5 micras de ancho por 4 a 9 micras de longitud; las que forman el pseudomicelio son bastante grandes y llegan a alcanzar algunas de 15 a 25 micras de longitud. Existe una licuefacción muy lenta de la gelatina que es bastante típica a los 40 días. Fermenta y asi-

mila dextrosa (L., M.); como fuente de nitrógeno aprovecha sulfato de amonio, peptona, asparagina y urea. El cultivo en leche no altera el medio, en leche litmus no hay producción de ácido ni de álcali; tampoco se efectúa coagulación, ni peptonización, ni reducción del colorante; no hay fermentación. El cultivo en leche con bromocresol púrpura reduce el colorante a los 12 días.

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

- CIFERRI, R. and REDAELLI, P., 1929.—Studies on the Torulopsidaceae. *Annals Mycologici*, vol XXVII, pp. 243-295.
- , 1935.—Contribuzioni alla sistematica della Torulopsidaceae. *Archiv. Mikrobiol.*, vol. 6, pp. 9-72.
- DIDDENS, H. A., und LODDER, J., 1942.—Die Anaskosporogenen Hefen. Zweite Hälfte. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp. 1-511.
- GUILLIERMOND, A., 1920.—The Yeasts. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 1-424.
- , 1928.—Clef dichotomique pour la détermination des levures. Librairie Le François, Paris, pp. 1-124.
- , 1937.—La Sexualité, Le Cycle de Développement, la Phylogénie et la Classification des Levures. Masson et Cie. Editeurs, Paris, pp. 1-72.
- HENRICI, A. T., 1941.—The Yeasts: Genetics, Cytology, Variation, Classification and Identification. *Bacteriological Reviews*, vol. 5, pp. 97-179.
- KAYSER, E., 1905.—Les Levures. Masson et Cie. Editeurs, Paris, pp. 1-212.
- LODDER, J., 1934.—Die Anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte. N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij, Amsterdam, pp. 1-256.
- SKINNER, C. E., 1947.—The Yeast-like fungi: *Candida* and *Brettanomyces*. *Bacteriological Reviews*, vol. 11, pp. 227-274.
- SKINNER, C. E., EMMONS, CH. W. and TSUCHIYA, H. M., 1947.—Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp. 1-409.
- STANTIAL, H., 1935.—The sporulation of Yeasts. *Trans. Roy. Soc. Canada*, 29, Sect. III, pp. 175-188.
- STELLING-DEKKER, N. M., 1931.—Beitrage zu einer monographie der Hefearten. I. Teil. Die Sporogenen Hefen. Amsterdam, pp. 1-547.