



Clave dicotómica para la determinación de géneros de levaduras

POR

PEDRO HERNANSAEZ MEORO

Profesor adjunto

de la Facultad de Ciencias

A MANERA DE PROLOGO

Cada día se divulga más el estudio de los microorganismos relacionados con los frutos y los productos hortícolas en general, que directa o indirectamente pueden afectar al buen aspecto y a la buena conservación ya sea como productos refrigerados o como productos envasados. La conservación provisional o definitiva de productos en salmuera, como aceitunas, pepinillos, etc., depende de la calidad de la flora microbiana que se desarrolle en dichos caldos, flora que muchas veces conduce a averiar los productos, más bien que a favorecer su conservación.

Se necesita, de una manera inminente, conocer cuáles son las especies microbianas que conviene estimular en su desarrollo y qué otras es conveniente combatir.

Las levaduras son microorganismos que se desarrollan bien a la temperatura ambiente, sobre todo en las épocas de primavera y verano, que es cuando se efectúa la recogida de los frutos y por lo tanto están profusamente repartidas. Como se comprende hay necesidad de clasificarlas para poderlas distinguir. Las clasificaciones existentes son demasiado especializadas y resultan engorrosas, de manejo difícil para los alumnos profanos en estas materias y que no tienen una preparación previa, teniendo que acudir al mismo tiempo a otras disciplinas académicas.

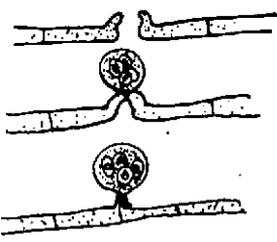
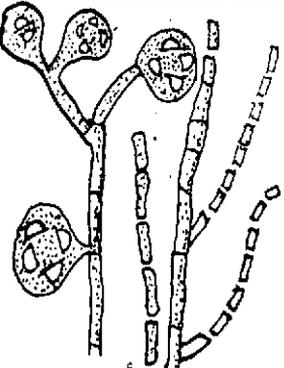
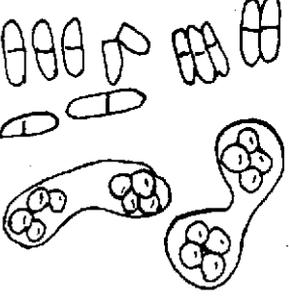
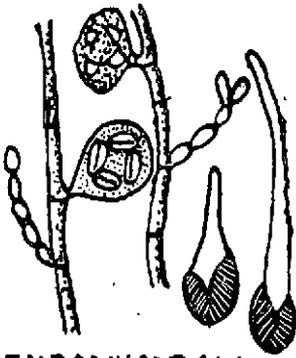
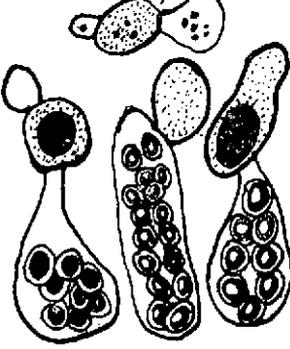
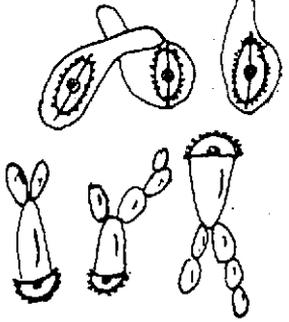
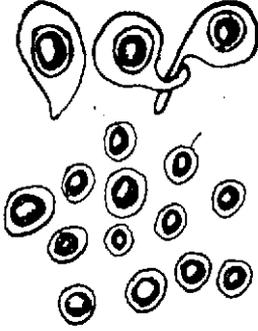
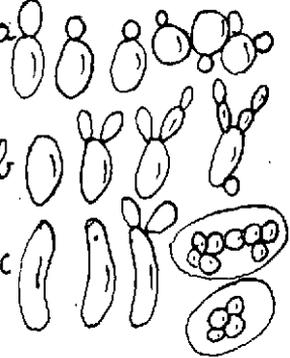
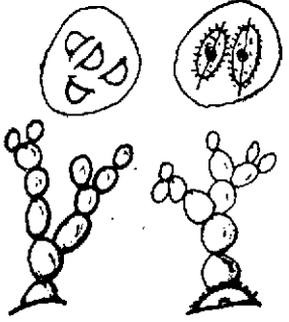


Nuestra finalidad al recopilar las notas para este trabajo ha sido hacer una Clave Dicotómica de Levaduras en la que queden simplificados al máximo los caracteres diferenciales de los géneros y especies, previo el estudio de las clasificaciones de los especialistas holandeses, ingleses y americanos con las modificaciones que hasta el día se han ido sucediendo. Hemos tratado de suprimir todo lo que pudiera llevar a un confusio- nismo y lo que pudiera determinar indecisiones en la marcha de una clasificación. Por otra parte tratamos de favorecer a todos aquellos que no manejan bien los idiomas extranjeros. Nos damos por satisfechos si hemos conseguido facilitar la labor de los estudiosos.

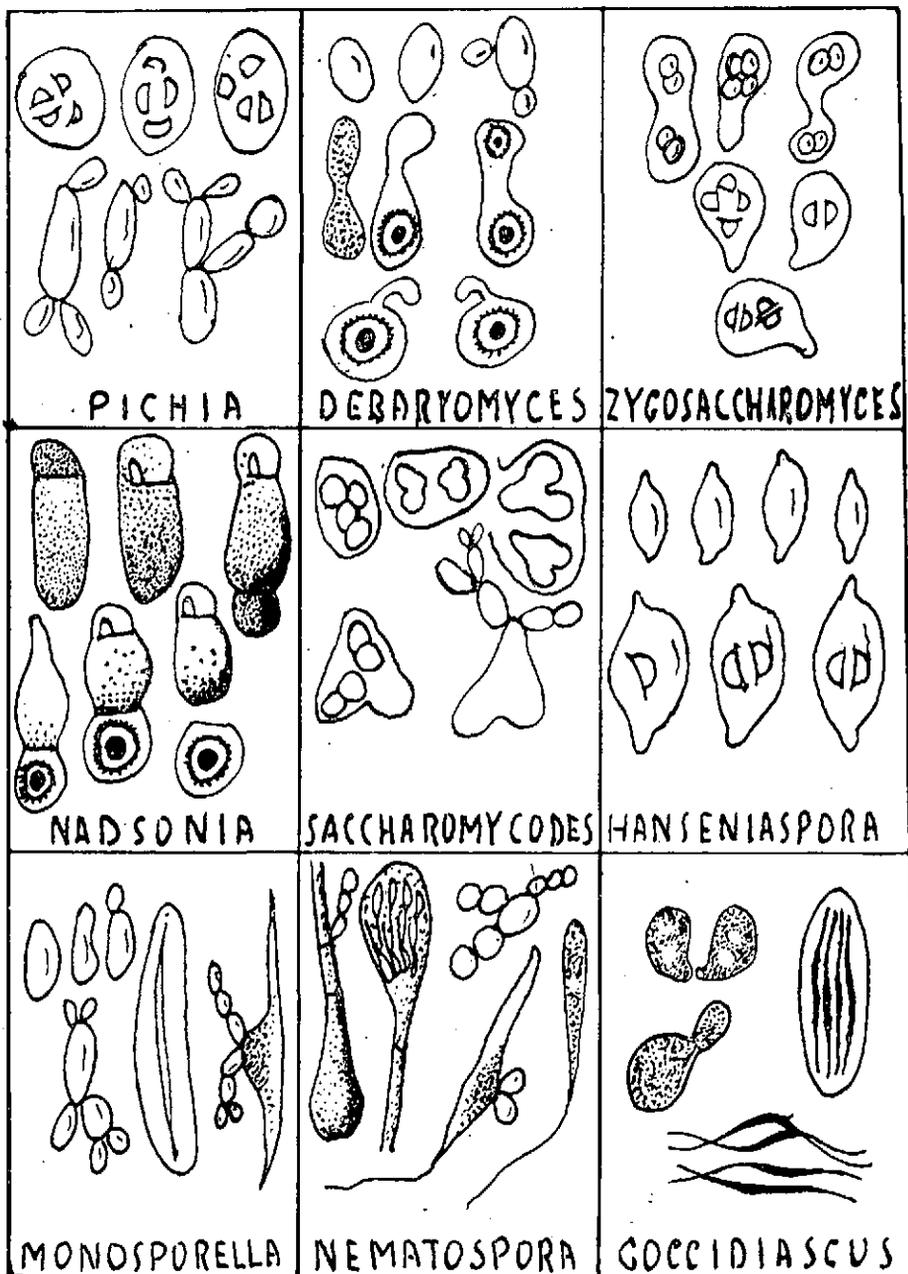
LEVADURAS



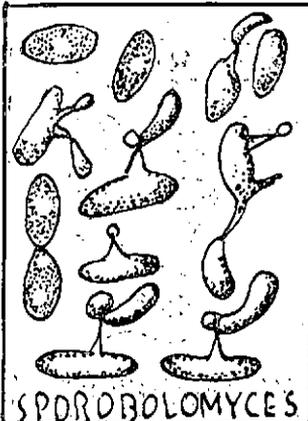
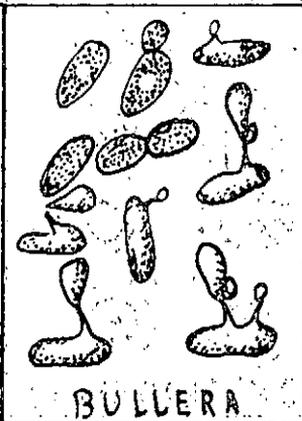
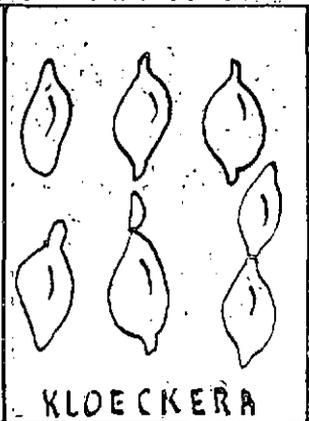
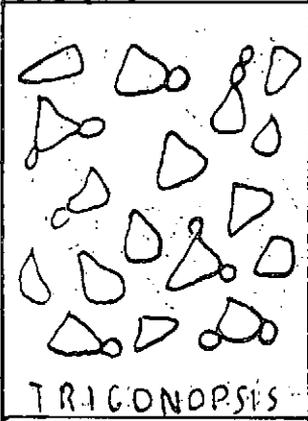
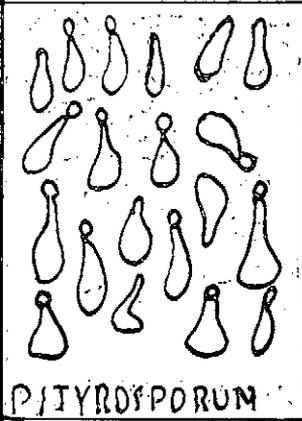
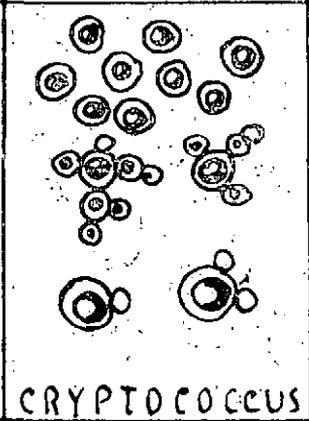
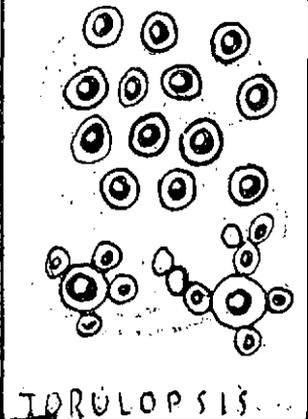
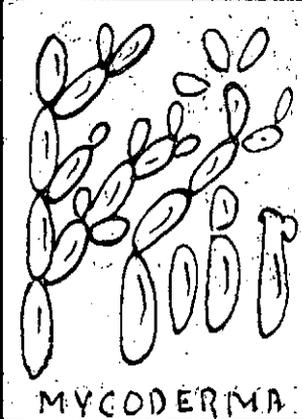
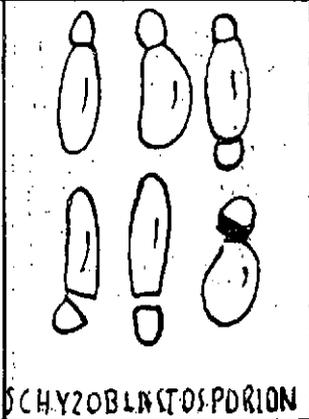
I LEVADURAS ESPOROGENAS

 <p>EREMASCUS</p>	 <p>ENDOMYCES</p>	 <p>SCHIZOSACCHAROMYCES</p>
 <p>ENDOMYCOPSIS</p>	 <p>LIPOMYCES</p>	 <p>SCHWANNIOMYCES</p>
 <p>TORULASPORA</p>	 <p>SACCHAROMYCES</p>	 <p>HANSENULA</p>

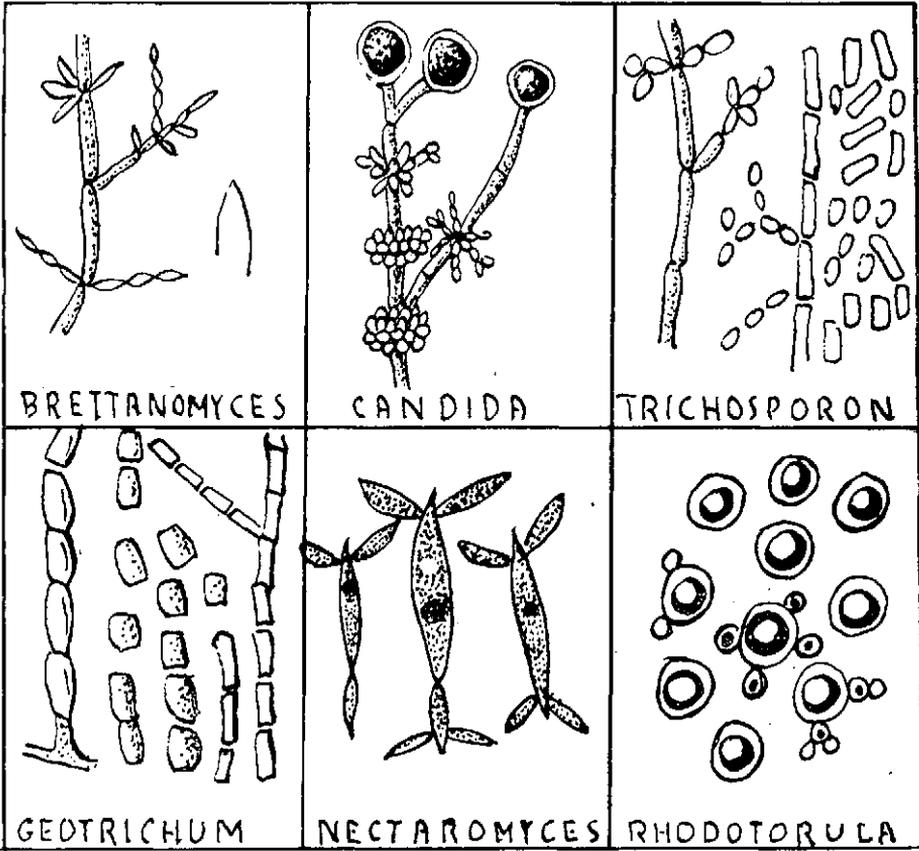
II LEVADURAS ESPOROGENAS



III LEVADURAS NO ESPOROGENAS

 <p>SPOROBOLOMYCES</p>	 <p>BULLERA</p>	 <p>KLOECKERA</p>
 <p>TRIGONOPSIS</p>	 <p>PITYROSPORUM</p>	 <p>CRYPTOCOCCUS</p>
 <p>TORULOPSIS</p>	 <p>MYCODERMA</p>	 <p>SCHYZOBLASTOSPORION</p>

IV LEVADURAS NO ESPOROGENAS



Levaduras

Claves Dicotómicas

LEVADURAS

Clave para la determinación de géneros

- I. Especies ascógenas *E*
- II. Especies no ascógenas *N*

— E —

1

- a. Micelio solo, o micelio y artrosporas (oidios) **2**
- b. Micelio y blastosporas (yemas) o sólo blastosporas Ascosporas isogámicas, heterogámicas o partenogenéticas. **4**

2

- a. Micelio solo, sin artrosporas **Eremascus**
- b. Micelio con artrosporas o sólo artrosporas **3**

3

- a. Micelio con artrosporas. 4 ascosporas redondas o en forma de sombrero. Oxidativas o fermentativas **Endomyces**
- b. Sin micelio. Sólo células sueltas que se dividen por tabicación transversal. Ascosporas de 4-8 por asca. Fermentativas **Schizosaccharomyces**

4

- a. Esporas redondeadas **5**
- b. Esporas fusiformes. **16**

5

- a. Micelio y blastosporas; sin artrosporas. Ascosporas isogamas o partenogenéticas de 1-4 **Endomycopsis**
- b. Sin micelio normalmente. Multiplicación siempre por yemas **6**



6

- a. Yemas producidas por estrangulación total **7**
 b. Multiplicación por yemas de base ancha **14**

7

- a. Ascas en forma de sacos laterales. Hasta 16 ascosporas **Lipomyces**
 b. Ascósporas internas en la célula madre **8**

8

- a. Ascas partenogénicas **9**
 b. Ascas formadas por previa fecundación **13**

9

- a. Ascas formadas por células con largos tubos copuladores (que no llegan a copularse) **10**
 b. Células sin tubos **11**

10

- a. Ascosporas verrugosas con anillo saliente, 1-2 por asca
 Especies fermentativas **Schwanniomyces**
 b. Ascósporas lisas, con una gota de aceite en el centro, de
 1-3 por asca Fermentativas **Torulaspóra**

11

- a. Vegetan en mosto de cerveza produciendo sedimento; algunos cultivos viejos producen velo. Especies fuertemente fermentativas **Saccharomyces**
 b. Forman velo en mosto. Ordinariamente no fermentan **12**

12

- a. Células ovales o alargadas, no esféricas. Ascosporas en forma de sombrero o de Saturno; de 2-4 por asca. Reducen a los nitratos **Hansenula**
 b. Células no esféricas, Ascosporas producidas en n.º de 1-4 por asca; poliédricas o en sombrero. No reducen a los nitratos **Pichia**

13

- a. Una ascospora verrugosa **Debaryomyces**
 b. Ascosporas lisas, más de una **Zygosaccharomyces**

14

- a. Ascosporas heterogamas. Una ascóspora verrugosa. Oxidativas y fermentativas. **Nadsonia**
- b. Ascosporas partenogenéticas **15**

15

- a. Células en limón o salchicha. 4 ascosporas que se conjugan antes de germinar **Saccharomycodes**
- b. Ascosporas partenogenéticas, esféricas o en sombrero de 2-4 **Hanseniaspora**

16

- a. Ascosporas aciculares, una por asca. Yemas. Sin micelio. **Monosporella**
- b. Con 4-8 ascosporas. **17**

17

- a. Ascósporas fusiformes con un pseudoflagelo. Micelio y células vegetativas ovales alargadas. Ascas partenogenéticas **Nematospora**
- b. Ascosporas fusiformes sin flagelo. Ascas formadas previa copulación isogama. Células vegetativas ovales o esféricas; sin micelio **Coccidiascus**

18

Adición

Parásitas del estómago de conejos, pájaros y otros animales. Esporas ovales alargadas de 1-4 por asca con doble pared. **Saccharomycopsis**



— N —

**Levaduras que no forman ascosporas y hongos
levaduriformes**

1

- a. Levaduras que se multiplican por gemación. Producen balistósporas en el extremo de basidios **2**
 b. Sin balistósporas **3**

2

- a. Con pseudomicelio. Células vegetativas con pigmento rojo, rosa o salmón. Balistósporas asimétricas, falciformes. **Sporobolomyces**
 b. Sin micelio ni pseudomicelio; células vegetativas blancas, crema o amarillas, pero no rojas. Balistósporas ovoideas **Bullera**

3

- a. Sin pigmentos carotenoides. **4**
 b. Con pigmentos o con formación de conidios en las partes aéreas de las colonias **14**

4

- a. Sin pseudomicelio o con sólo trazas. Sin artrosporas **5**
 b. Formas levaduras con pseudomicelio o micelio verdadero. Con blastósporas, artrosporas o ambas **11**

5

- a. Células apiculadas. Gemación bipolar **Kloeckera**
 b. Células irregulares o redondas **6**

6

- a. Células triangulares **Trigonopsis**
 b. Células redondeadas **7**

7

- a. Células en forma de botella. Una sola yema de base ancha **Pityrosporum**
 b. Células ovales o cilíndricas **8**

8

- a. No forman velo en medio líquido 9
- b. Con velo seco y plegado. 10

9

- a. Gemación multilateral. Células con cápsulas. Formación de compuestos amiláceos. No fermentativos **Cryptococcus**
- b. Gemación multilateral. No forman compuestos amiláceos. Fermentativos **Torulopsis**

10

- a. Células cilíndricas. Células que no se separan por escisión **Mycoderma**
- b. Células polimorfas. Yemas que se separan por escisión del tabique **Schizoblastosporion**

11

- a. Ordinariamente blastosporas. Sin artrosporas. Seudomicelio **12**
- b. Con artrosporas **13**

12

- a. Seudomicelio rudimentario. Células ovales o en *ojiva*. Producen mucho ácido. Fermentativas **Brettanomyces**
- b. Seudomicelio bien desarrollado. A veces con micelio. Fermentativas o no **Candida**

13

- a. Con blastosporas y artrosporas. Micelio yseudomicelio. Fermentativas **Trichosporon**
- b. Siempre artrosporas. Raramente blastosporas **Geotrichum**

14

- a. Sin pigmentos. Células en forma de aeroplano. Conidios en la parte aérea de las colonias **Nectaromyces**
- b. Con pigmentos. Sin conidios. No fermentativas **Rhodotorula**



A

ESPECIES ASCOGENAS

LEVADURAS VERDADERAS

Gen. **SCHIZOSACCHAROMYCES** Lindner

Células ovoideas o más frecuentemene cilíndricas con los extremos redondeados. La reproducción vegetativa se hace por tabicación transversal. Las ascas se originan previa fusión de dos células vegetativas haploides que dan un cigoto, el cual origina directamente el asca, ésta forma en su interior, con reducción cromática cuatro u ocho esporas nuevamente haploides que se desarrollan y siguen dividiéndose por esquizogamia. La copulación es siempre isógama. Después de la formación del tabique

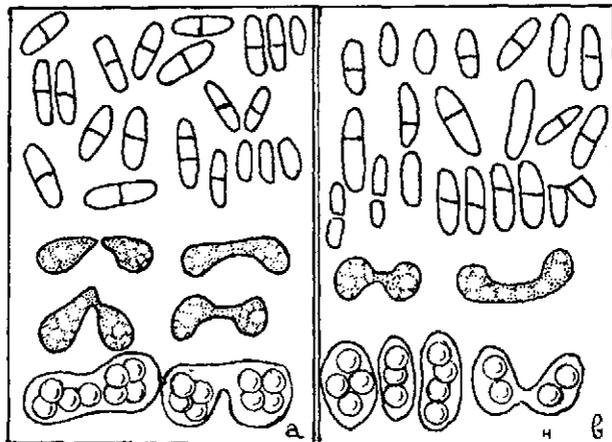


Fig. 1. Células vegetativas y ascas de *Schizosaccharomyces*, a—*Sch. octosporus*; b—*Sch. mulleri*.

las células hijas permanecen durante algún tiempo unidas; más tarde el tabique se hincha y se escinde por la mitad quedando soldado solamente por uno de sus extremos por cuyo punto giran ambas células hasta co-

locarse paralelas. En ocasiones este fenómeno es tan rápido que se ven varias células paralelas como si fueran en empalizada; en determinadas condiciones se forma más de un tabique transversal. Cuando las células son redondeadas pueden formarse tabiques en dos direcciones tomando las células aspecto de sarcinas.

Gen. **SCHIZOSACCHAROMYCES** Lidner

Clave de especies

1

- a. Hasta 8 ascosporas por asca que no se tiñen con Lugol. Forma micelio en patata-agar. Células ovales o cilíndricas a veces filiformes. **S. versatilis**
- b. Ascosporas que se colorean en azul con Lugol **2**

2

- a. Con 8 ascosporas de 3-3,5 mic. Células vegetativas de 5-11 x 4-9 mic. **S. octosporus**
- b. Con cuatro esporas por asca **3**

3

- a. Células cilíndricas de 7-12 x 3-4 mic. Tabique generalmente situado más cerca de uno de los extremos. No fermenta la D-manosa **S. pombe**
- b. Células más grandes (tamaño medio 9,5 x 5,2 mic). Fermentación aromática **S. mellacei**

SCHIZOSACCHAROMYCES VERSATILIS. *Wicherham y Duprat.*

Esta especie fue descrita por sus autores en 1945. Se aisló de vinos portugueses y de jugos de frutas en fermentación. Su característica diferencial es la formación de filamentos micelianos cuando se cultiva en agar-patata, los cuales se desintegran en segmentos u oidios. Las ascas tienen ocho ascosporas, pero éstas no se tiñen con el Lugol. Cuando el cultivo se hace en medios líquidos las células son de formas diferentes, a lo que alude el nombre de *versatilis*. Unas veces son ovales, otras cilíndricas con los extremos redondeados y otras se alargan mucho tomando el aspecto de bacillos muy largos.



Probablemente esta especie no es más que forma de adaptación del *S. pombe*.

El *Sch. versatilis* ha sido también aislado del koji creciendo conjuntamente con el *Sch. japonicus* descrito recientemente por YUKAWA y MAKI.

SCHIZOSACCHAROMYCES OCTOSPORUS. *Beijerinck*

Especie muy repartida por todos los países de clima templado o cálido. Se encuentra ordinariamente sobre flores y frutos. Nosotros la hemos encontrado con frecuencia produciendo el bombeo de las conservas de albaricoque y melocotón.

Se presenta en forma de células grandes, de formas variables, por lo general de paredes paralelas con los extremos redondeados, de aspecto de grandes bacilos midiendo de $4-10 \times 5-7$ mic. La multiplicación se verifica por la formación de un tabique transversal en la parte media que posteriormente se escinde para dejar a las dos células en libertad. La esporulación tiene lugar mediante una conjugación previa, isogámica; las dos células se fusionan mezclando su contenido y dando lugar a un asca de forma más o menos ovalada pero más ordinariamente en forma de «aguaderas», de $15-20 \times 10$ mic. Las células después de la copulación pueden quedar reunidas en cuyo caso sólo tienen 4 ascosporas, o permanecer reunidas mediante un puente estrecho, teniendo entonces 8 esporas de forma elipsoidea y de tamaño aproximado de 3-5 mic. La esporulación se verifica con facilidad a la temperatura de 25° , apareciendo ya a las 7-10 horas, según SEITER, cuando se cultivan a dicha temperatura sobre agar-mosto de cerveza o en rodajas de zanahoria. Nosotros hemos obtenido buenos resultados cultivando en medio de Gorodkowa a 28° . Las colonias producidas en los medios sólidos están hundidas en su parte central. En los medios líquidos no produce velo sino tan sólo un anillo.

Se diferencia de las otras especies por las pruebas bioquímicas de fermentación:

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	-
Maltosa	+
Lactosa	+
Manita	+
Rafinosa	+
Dextrina	+
Inulina	-

SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. *Lindner*

Fue descubierta en la cerveza de Africa por SAARE. LINDNER hizo su descripción en 1893. Las células de esta levadura son más pequeñas que la del *Sch. octosporus*, 7-15 × 3-4 mic. de forma cilíndrica y con los extremos redondeados, presentando una manifiesta semejanza con los oidios del gén. *Oospora*. En los cultivos líquidos no forma velo y sólo después de mucho tiempo forma a veces un anillo. Las células se multiplican por tabicación transversal, con la particularidad de que el tabique muchas veces no está en el centro y por tanto las dos células hijas son de diferente longitud. Cuando los cultivos están en atmósfera confinada se suelen producir varios tabiques paralelos, transversales, pero entonces los artejos no se separan. Más raramente se forman filamentos ramificados. La esporulación se produce bien a los 15°; sólo se forman 4 ascosporas que tienen 7 × 4 mic. rodeadas de una membrana rica en amiloide por lo que se colorea bien con el Lugol.

Las ascas se reabsorben cuando las ascosporas están maduras y éstas, por tanto, quedan en libertad para proceder a su germinación. Las ascosporas se hinchan, después se alargan y empiezan a dividirse por tabicación transversal.

Los cultivos sobre mosto-gelatina forman en la superficie una lámina compacta con finas estrías en la superficie estando la colonia un poco más hundida en la parte central por licuación de la gelatina del sustrato, aunque menos que con el *Sch. octosporus*.

Posee un fuerte poder fermentativo, dando lugar a la formación de gran cantidad de productos ácidos durante el proceso de fermentación.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	+
Lactosa	-
Manita	+
Rafinosa	1/3 (1)
Dextrina	+
Inulina	+

NOTA: Al decir que la rafinosa queda fermentada en 1/3 se sobreentiende que siendo este cuerpo un trisacárido, ciertos fermentos los desdoblan en una molécula de fructosa (1/3 del total) y un disacárido (2/3 melibiosa). Cuando ésta también es fermentada se acostumbra a reseñarlo de diferentes maneras: Fermenta 3/3 de rafinosa; fermenta totalmente la rafinosa o fermenta la melibiosa.

Esta especie es muy común; muchas de sus cepas fueron aisladas de melazas y vino de palma. LEUPOLD hizo un detenido estudio filogenético de esta especie en 1950 (2).

SCHIZOSACCHAROMYCES MELLACEI. *Jørgensen*.

Esta especie fue descubierta por GREG, que la aisló de las melazas de caña de azúcar empleadas en Jamaica para la obtención del Ron. Esta especie es muy parecida al *Sch. pombe* de la cual no puede distinguirse por su morfología. Tienen la misma forma aunque las células del *Sch. mellacei* son un poco más grandes siendo las dimensiones modales 9×5 mic. La esporulación se verifica al cabo de algunos días, cultivando en mosto de cerveza o en rodajas de zanahoria. Las ascas son de la misma forma que en el *Sch. pombe* y el número de ascosporas es siempre de 4 por asca, habiendo una pareja en cada cavidad del asca; frecuentemente las ascas se forman partenogenéticamente. Las ascosporas se tiñen de azul con el Lugol. La temperatura normal de fermentación es de 25° desprendiéndose en el proceso compuestos aromáticos etéreos agradables. Se diferencia del *Sch. pombe* por que el *Sch. mellacei* fermenta la manita.

Gen. **ENDOMYCOPSIS** Dekker

Las especies agrupadas en este género fueron primeramente incluídas en el género *Endomyces* cuyos caracteres son muy semejantes. Algunas ya se han catalogado en otros géneros y parece que la tendencia de los especialistas es el hacerlo desaparecer por su dudosa caracterización y colocación taxonómica.

Se caracteriza el género por la presencia de células levaduriformes procedentes de la gemación de los filamentos de un pseudomicelio o micelio verdadero y por poseer ascas conteniendo 4 ascosporas, las cuales pueden ser en forma de sombrero o presentar dos membranas, de las que la exterior o exosporium es muy gruesa y se abre en el momento de la germinación como las valvas de una almeja; a veces las ascosporas son ásperas y tienen en su línea ecuatorial un reborde o anillo que les da el aspecto de Saturno. Las ascas se originan en los artejos del micelio, bien en los terminales, bien en los intermedios. Se discute si la formación de las ascas va precedida de una verdadera conjugación o si esta conjugación, una vez iniciada, no llega a efectuarse en cuyo caso las ascas se originarían partenogenéticamente.

(2) LEUPOLD, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Ser. physiol.*, 24-381 (1950).

Parece ser que la única característica diferencial que existe con las especies del género *Endomyces* es la presencia constante en él de oidios o artrosporas formadas por la fragmentación de los artejos de los filamentos del micelio, mientras que en el género *Endomycopsis* las artrosporas no aparecen más que rara vez en las colonias de cultivos viejos.

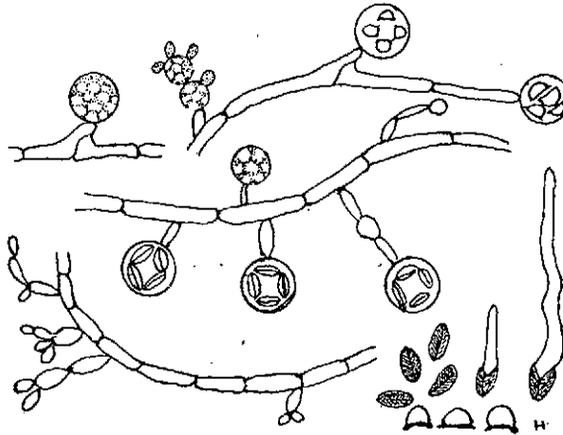


Fig. 2.—*Endomycopsis*. Micelio, ascosporas y blastosporas (Según Guilliermond)

Algunas especies tienen la propiedad de fermentar los azúcares, aunque lo hacen con poca intensidad y la mayoría no fermentan la maltosa por lo cual se les ha empleado para obtener cervezas de pocos grados, adicionando al mosto la cantidad precisa de sacarosa. Los cultivos de estas especies en medios líquidos producen velo abundante y espeso; algunas sólo dan anillo.

Gen. **TORULASPORA** Lindner

Levaduras pequeñas, esféricas, conteniendo en su interior una gotita refringente de aceite. Las ascas presentan una prominencia o espolón que se supone es resto de una degenerada función copuladora ya que no se

ha podido comprobar la existencia de esta conjugación. Las esporas son lisas y en número de 1-3 por asca. Las ascas se forman partenogenéticamente por no llegar a verdadera copulación las prolongaciones que la inician. La especie tipo es la

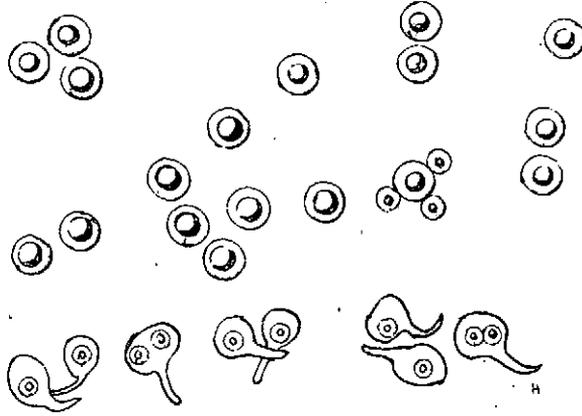


Fig. 3.—*Torulaspora*, células vegetativas y ascas.

TORULASPORA DELBRÜCKI *Lindner...*

Aislada por su autor a partir de una cerveza inglesa. Presenta los caracteres del género.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa.	+
Sacarosa	-
Maltosa	-
Lactosa	-

El tamaño de las células es de 4-5 mic. Las esporas se forman bien en medio de Gorodkova a las 48 h a temperatura de 28°.

Gen. **SACCHAROMYCES.** Meyen

Células vegetativas de forma muy variable que se puede referir a tres tipos:

Tipo *S. cerevisiae*, con las células redondas u ovoideas; tipo *S. ellipsoideus* con las células elípticas y tipo *S. pastorianus* con las células cilíndricas alargadas. Las ascas, se forman partenogenéticamente y el número de ascósporas contenidas en las ascas es muy variable de unas especies a otras. La rotura del asca sólo se efectúa en el momento de la germinación de las ascosporas. Los cultivos en medios líquidos crecen formando depósitos en el fondo del tubo sin producir velo mucoso o anillo más que en cultivos viejos de muchos meses. En los medios sólidos las colonias son blancas, brillantes y húmedas. Poseen un poder fermentativo muy intenso.

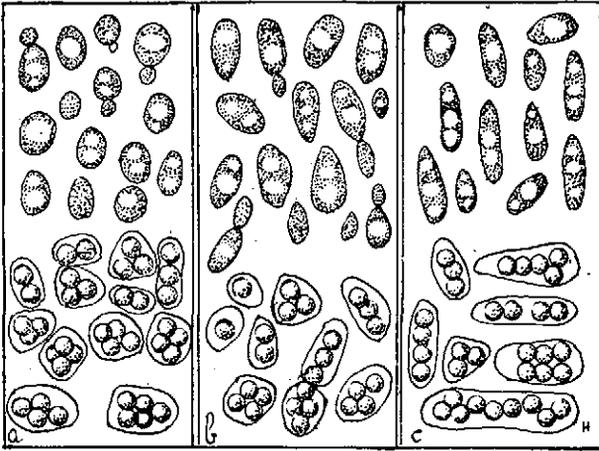


Fig. 4.—*Saccharomyces*. a.—tipo *Sac. cerevisiae*; b.—tipo *Sac. ellipsoideus*; c.—tipo *Sac. pastorianus*.

La variabilidad de esta especie es tan grande, no sólo en cuanto a su morfología sino también en las manifestaciones bioquímicas de sus procesos fermentativos, que para evitar confusión en la ordenación taxonómica, las empresas industriales han aceptado la fijación de tipos de referencia, a los cuales se ajusta una determinada levadura; así por ejemplo, en las levaduras empleadas para la fermentación de la cerveza se establecen dos tipos principales: tipo SAAZ que es la que produce fer-

mentaciones bajas y el tipo FROHBERG que provoca fermentaciones altas. En las levaduras del vino también se establecen tipos: tipo Burdeos, tipo Jerez, tipo Rioja, tipo Madeira, etc.

Gen. SACCHAROMYCES

Clave de especies según Stelling-Dekker

1. Fermentan glucosa y galactosa:
 - a. Cultivos jóvenes en mosto, con pseudomicelio **S. dairenensis (1)**
 - b. En mosto, las células jóvenes están aisladas o en parejas:
 - I. Con una espora por asca **S. unisporus (2)**
 - II. Con varias esporas por asca. **S. globosus (3)**
2. Fermentan glucosa, sacarosa y 1/3 de rafinosa:
 - a. Células alargadas **S. muciparis (4)**
 - b. Células redondas u ovals **S. chevalieri (5)**
3. Fermentan glucosa, sacarosa, rafinosa y melibiosa **S. microellipsoides (6)**
4. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa y 1/3 de rafinosa:
 - a. Células redondas o ligeramente ovaladas, pequeñas **S. exiguus (7)**
 - b. Células ovals grandes **S. mangini (8)**
5. Fermentan glucosa, sacarosa y maltosa **S. heterogenicus (9)**
6. Fermentan glucosa, sacarosa, maltosa y 1/3 de rafinosa:
 - a. Células ovoideas **S. oviformis (10)**
 - b. Células alargadas **S. hayanus (11)**
7. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa (débilmente) y maltosa, **S. chodatti (12)**
8. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa y 1/3 de rafinosa:
 - a. En mosto, las células jóvenes son redondas, oviformes o piriformes **S. cerevisiae (13)**
con las variedades: *S. ellipsoideus*, *marchalianus*, *turdans*, *pulmonalis* y *festinans*
 - b. Células jóvenes ovals o en forma de salchicha **S. intermedius (14)**
 - c. Células largas y ovals grandes **S. villianus (15)**
 - d. Células en mosto, ovals alargadas; en agar las células jóvenes tienen forma alantoidea o de salchicha. **S. odessa (16)**
 - e. Células jóvenes muy largas, en agar a veces pasan de 30 mic. **S. tubiformis (17)**
 - f. En mosto las células jóvenes son redondas u ovals; en agar son irregulares, complejas **S. paradoxus (18)**

9. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa y melibiosa:
- a. Células jóvenes en salchicha; cultivo con largas hebras de pseudomicelio. **S. pastorianus (19)**
 - b. Células jóvenes de cultivos en mosto, aisladas, en parejas o en triadas:
 - I. Células ovoides **S. carlsbergensis (20)**
con las var. *monacensis*, *valdensis*, *mandshuricus* y *polymorphus*.
 - II. Células más alargadas **S. validus (21)**
 - III. Células ovoides largas **S. longos (22)**
 - IV. Células ovoides en mosto; en agar produce filamentos. **S. uvarum (23)**
10. Fermentan glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa y 1/3 de rafinosa (*) **S. fragilis (24)**

(*) PRAFF y LUR en 1951 demuestran que el *S. fragilis* ataca a la pectina y a la inulina.

(3) LUR y PRAFF [1951], *Arch. Biochem. and. Biophys.*, 33-312.

SACCHAROMYCES

Azúcares que son capaces de descomponer

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+			+			+	+	+	+
Sacarosa		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa					+	+	+	+	+	
Lactosa										+
Rafinosa		+	+	+		+		+	+	+
Melibiososa			+						+	
Inulina										+

Los grupos y especies que siguen corresponden a la clave de especies de Stelling-Dekker.

Grupo	Fermentan	Especies
1	2 azúcares.	1-2-3
2	3 (no maltosa)	4-5
3	3 más 1 (rafinosa, melibiososa)	6
4	4 (no maltosa)	7-8
5	3 (maltosa).	9
6	4 (no galactosa)	10-11
7	4 (no rafinosa)	12
8	5 (no latosa, rafinosa 1/3)	13-14-15 16-17-18
9	5 más 1 (rafinosa melibiososa)	19-20-21 22-23
10	6 (latosa e inulina)	24



Gen. **SACCHAROMYCES.** Reess

Clave de especies adoptada

- 1
- a. Fermentan dos azúcares: Glucosa y galactosa **2**
- b. Fermentan más de 2 azúcares **4**

- 2
- a. Cultivos jóvenes en mosto con filamentos de pseudomicelio **S. datrensis**
- b. Células aisladas o en parejas **3**

- 3
- a. Ascas con una espora **S. unisporus**
- b. Varias esporas por asca **S. globosus**

- 4
- a. Fermentan dos azúcares y 1/3 de rafinosa **5**
- b. Fermentan 3 ó más azúcares **6**

- 5
- a. Células largas **S. muciparis**
- b. Células redondas, **S. chevalieri**

- 6
- a. Fermentan tres azúcares **S. heterogenicus**
- b. Fermentan más de 3 **7**

- 7
- a. Fermentan 3 y 1/3 de rafinosa **8**
- b. Fermentan 4 ó más azúcares **11**

- 8
- a. No fermentan la maltosa **9**
- b. Fermentan la maltosa. **10**



9

- a. Células pequeñas redondas o ligeramente ovales. §. *exiguus*
 b. Células grandes, ovales §. *magini*

10

- a. Células ovales §. *oviformis*
 b. Células alantoideas, de forma de salchicha §. *bayanus*

11

- a. Fermentan cuatro azúcares 12
 b. Fermentan más de 4 13

12

- a. No fermentan la maltosa. §. *microellipsoidens*
 b. Fermentan la maltosa. §. *chofati*

13

- a. Fermentan 5 azúcares (no lactosa ni melibiosa) 14
 b. Fermentan 6 azúcares. 15

14

- a. En mosto, células jóvenes redondas, oviformes o piri-
 formes §. *cerevisiae*
 b. Células elípticas o en salchicha §. *intermedius*
 c. Células largas muy grandes §. *villianus*
 d. Células en mosto elípticas alargadas; en agar tienen
 forma de salchicha §. *odesa*
 e. Células en agar hasta de 30 micras §. *tubiformis*
 f. En mosto, redondas u ovales; en agar muy irregulares. §. *paradoxus*

15

- a. Fermenta maltosa y melibiosa. 16
 b. Fermenta lactosa e inulina §. *fragilis*

16

- a. Cultivos jóvenes con células en forma de salchicha; se
 forman largas hebras de pseudomicelio §. *pastorianus*
 b. Células aisladas, en parejas o en triadas 17

- a. Células elípticas *S. carlsbergensis*
- b. Células elípticas largas *S. longos*
- c. Células muy largas *S. validus*
- d. Células ovales en mosto; filamentosas en agar *S. uvarum*



Gen. **PETASOSPORA.** Boidin y Abadie, 1954

Hablamos aquí de este género más bien como curiosidad científica para orientarnos en el estado de cosas en que todavía nos encontramos frente a las dudas de tipo taxonómico, dada la gran variabilidad de las Levaduras, no ya en su morfología sino también en lo que afecta a sus propiedades bioquímicas. Ello origina no sólo indecisiones por parte de los más rígidos sino campo abierto para la institución de nuevas especies y aun géneros.

Copiamos de LODDER, SLOOFF y KREGER-VAN RIJ: «Algunas otras especies descritas provisionalmente como *Saccharomyces* se sacan de este género». Por ejemplo, RAMÍREZ y BOIDIN (1953) aislaron de líquidos tánicos tres especies con los nombres de *Saccharomyces rhodanensis*, *S. chambardi* y *S. strasburgensis*. Recientemente sin embargo, BOIDIN y ABADIE en 1954 incluyen estas especies en el nuevo género PETASOSPORA, el cual dejan definido de la siguiente manera:

«Células redondas ovales o alargadas; gemación multipolar; pseudomicelio presente o ausente; esporas en forma de sombrero o en forma de Saturno que salen fácilmente de las ascas; conjugación antes de la formación de las ascas. En medios líquidos produce sedimento y anillo y después de mucho tiempo originan velo mucoso. La fermentación es variable o no existe. No asimilan los nitratos. Difieren de los *Saccharomyces* por las esporas en forma de sombrero y por el reducido poder fermentativo. Los autores también incluyen en este mismo género al *Saccharomyces pastori* y al *S. pini*. Señalan la diferencia entre su género y el gén. *Pichia*, principalmente en la manera de formar el velo».

Como se ve, este género tiene muchos puntos de contacto con el género *Zygosaccharomyces*, del que podía considerársele como un apéndice.

Gen. **ZYGOSACCHAROMYCES.** Barker

Células vegetativas de forma variable. Formación de las ascas precedidas de una copulación iso o heterogámica; a veces con rudimentos de sexualidad en la fase inicial. Ascósporas lisas, de 1-4 por asca; generalmente redondas, otras veces hemisféricas en forma de sombrero o sin reborde saliente en la cara plana. Las células vegetativas son haploides y el asca, transformada en cigoto resulta diploide. El núcleo del asca sufre una reducción cromática para formar las ascósporas que también son haploides; éstas germinan y originan nuevamente yemas ordinarias ve-

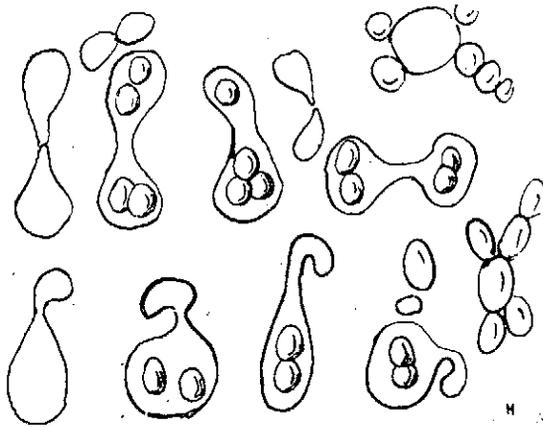


Fig. 5. *Zygosaccharomyces*. Formación de las ascas y ascósporas.

getativas. Las especies de este género tienen más o menos marcado el poder fermentativo, pero ninguna de ellas provoca la fermentación total de la rafinosa. Las elevadas concentraciones de sacarosa no dificultan su desarrollo.

Gen. **ZIGOSACCHAROMYCES**

Fermentación de azúcares

	1	2	3	4	5	6	7	8
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Levulosa		+	+	+	+	+		+
Galactosa					+	+	+	+
Sacarosa			+		+		+	+
Maltosa				+		+		
Lactosa					+			
Rafinosa								1/3
Inulina								+

- Fermenta un azúcar , , , *Z. mellis*
- » 2 » , *Z. baillii*
- » 3 » (sacarosa) *Z. Barkeri*
- » 3 » (maltosa) *Z. japonicus*
- » 4 » (sacarosa). *Z. javanicus*
- » 4 » (maltosa) *Z. soya*
- » 4 » (lactosa) *Z. lactis*
- » 6 » (rafinosa) *Z. marzianus*



Gen. **PICHIA**. Hansen

Células ovales o cilíndricas de aspecto de Mycoderma, a veces reunidas en cortas cadenas. Ascosporas reniformes, hemisféricas, angulosas o redondas, conteniendo cada asca de 1-4. En los medios líquidos se forma en la superficie un velo a las 24 horas, seco, mate y lleno de burbujas de aire. En 1956, como consecuencia de los estudios realizados por PHAFF y SHIFRINE, por PHAFF y KNAPP y por PHAFF y otros colaboradores, que aislaron especies nuevas, con caracteres muy semejantes a las incluidas en el gén. *Pichia* con anterioridad, *pero sin aptitud para forma velo, pseudomicelio o ambos*, PHAFF por lo tanto reajustó el género *aceptando en él especies que no forman velo o pseudomicelio o que éste es muy rudimentario*, Esta corrección aumenta la dificultad para distinguirlo del gén. *Debariomyces*, diferenciándose ahora sólo por el número y forma de las esporas.

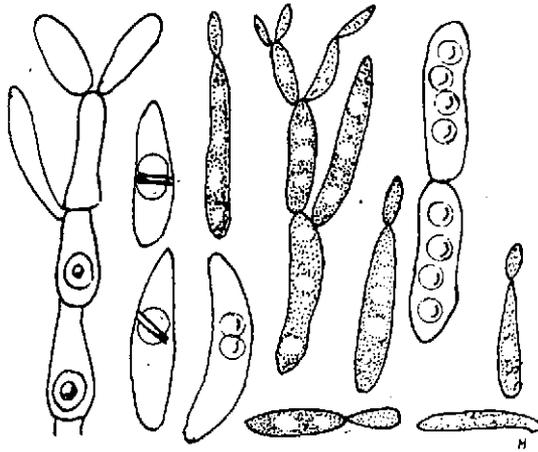


Fig. 6.—*Pichia*. Células vegetativas y ascosporas.

PICHIA MEMBRANAEFACIENS Hansen

Aislada por vez primera del exudado gomoso de las raíces de los árboles. Posteriormente JÖRGENSEN la encontró en un vino blanco. Es una especie universalmente extendida. Se caracteriza por formar rápidamente, cuando se cultiva en mosto de cerveza, un espeso velo, plegado a lo largo, de color blanco sucio y conteniendo gran cantidad de burbujas. Las células son de tipo Mycoderma y muy vacuolizadas. La temperatura má-

xima de crecimiento está alreedor de 35°, no formándose entonces velo, únicamente depósito de fondo. Las ascas están provistas de dos ascosporas, esféricas, alargadas o hemisféricas, de 4-5 mic. Según HANSEN ni invade la sacarosa ni fermenta ningún azúcar.

PICHIA HYALOSPORA Lindner.

Forma sobre mosto un delicado velo casi transparente. Las ascosporas son redondeadas, con una gota de grasa en el centro. Tampoco produce fermentaciones. Encontrada en vinos y cervezas. Como especies o cepas del mismo género se han estudiado la *P. tamarindorum*, *P. californica*, *P. orientalia*, *P. farinosa*, *P. polymorpha* y *P. vini*; las tres últimas tienen las esporas redondas; la *P. farinosa* contiene cuatro por asca.

Gen. **HANSENULA**. Sydow

Sin. **Willia**. Hansen

Este género agrupa a todas aquellas levaduras que son capaces de *asimilar nitratos*. Ascosporas hemisféricas en forma de sombrero con reborde saliente o en forma de Saturno. El reborde del sombrero y la banda de Saturno desaparecen durante el proceso de la germinación de las esporas. En algunas especies las ascosporas se conjugan antes de la germinación. Como producto de su metabolismo, la mayoría de las especies de este género producen éteres de frutas.

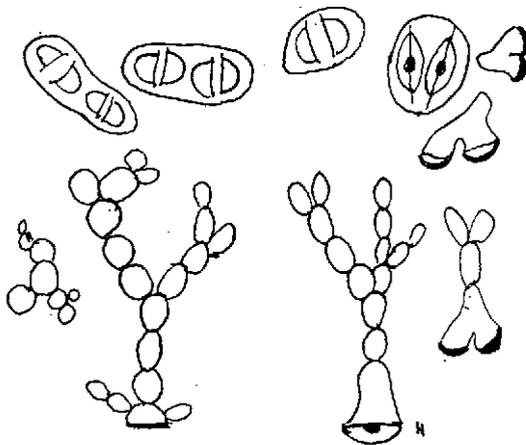


Fig. 7. *Hansenula* Ascas y germinación de las ascosporas.

WICKERHAM en 1951 hace una revisión del género después de efectuado un amplio estudio del mismo, incluyendo varias especies nuevas y pasando aquí el *Endomycopsis bispora*, única especie capaz de asimilar los nitratos, con el nombre de *Hansenula beckii*. La nueva definición del género dado por WICKERHAM es como sigue:

«Levaduras con reproducción asexual por yemas o por yemas acompañadas de la formación de pseudohifas o de hifas verdaderas; conteniendo de 1-4 ascosporas por asca, y asimilando los nitratos. Las esporas son en forma de sombrero o en forma de Saturno. Las ascas de ordinario se rompen en la madurez dejando las ascosporas en libertad».

Gen. **SCHWANNIOMYCES**. Klöcker

Ascas derivadas de células con prominencias o cuernos que recuerdan restos de tubos copuladores de una ancestral sexualidad. Ascóspora provista de una membrana con la superficie cubierta de verrugas y rodeada de un anillo saliente ecuatorial; en el centro de la espora se encuentra ordinariamente una gota de aceite.

Contiene hasta ahora este género una sola especie aislada del suelo de las Antillas y de África del Sur.

SCHWANNIOMYCES OCCIDENTALIS Klöcker

Células elipsoidales o esféricas de 5-10 mic. Colonias gigantes de un color blanco grisáceo, de aspecto céreo y superficie brillante; borde denticulado. Esporula con facilidad en bloques de yeso y en medio de Gorodkova entre 34-36° como máximo y 10-13 mínima. Las células que van a originar las ascas se hinchan y emiten una o dos prolongaciones a manera de tubos de germinación; en el interior se forman una o dos esporas partenogénicamente. Cuando las esporas están maduras una de las dos mitades de la espora pierde las verrugas de su superficie, su membrana se pone tensa y da comienzo una gemación ordinaria; posteriormente la otra mitad de la ascóspora pierde sus asperezas convirtiéndose todo en células vegetativas.

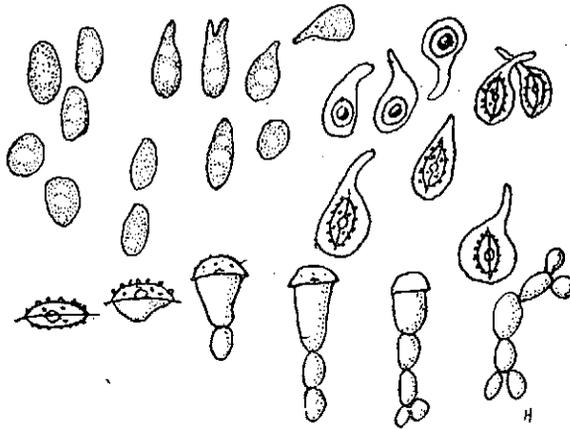


Fig. 8. *Schwanniomyces*. Células vegetativas y ascopos germinando.

Los cultivos viejos forman en mosto de cerveza un velo mucoso y algunas veces también se forma un espeso anillo.

FERMENTAN

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	-
Lactosa	-
Rafinosa	+



Gen. **DEBARYOMYCES.** Klöker

El género se caracteriza por tener ascas formadas previa conjugación conteniendo una o excepcionalmente dos ascosporas con una sola membrana provista de finas verrugas.

Células redondas o más raramente ovals cortas, conteniendo una gota refringente de aceite en la parte central que le da un aspecto semejante a las células del gén. *Torula*. En la formación de las ascas intervienen dos células que bien pueden ser iguales e independientes o bien unidas, siendo una de ellas grande y la otra una pequeña yema producida por aquella y que, antes de desprenderse, se fusiona con la madre para originar el cigoto; el contenido de esta célula se organiza hasta convertirse en una ascospora. Como el carácter de *episporio verrugoso* muchas veces no era mencionado por los autores en sus descripciones, al hacer LODDER y KREGER VAN RIJ una revisión y estudio detenido de este género encontraron que las especies en él catalogadas eran muy heterogéneas y entonces (1952) proponen reformar la definición, dejándola ajustada de la siguiente manera:

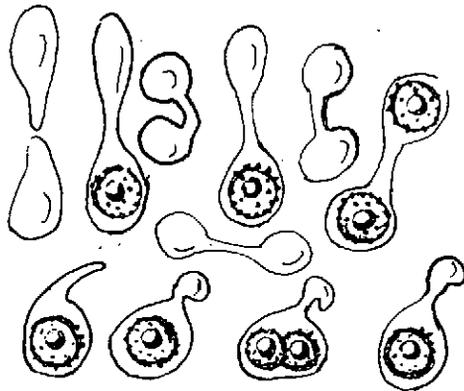


Fig. 9. Fecundación y formación de las ascosporas en *Debaryomyces*.

«Células redondas u ovals cortas, haploides y con gemación multilateral; sandomicelio escaso o nulo; pueden formar velo en medio líquido, no fermentan o poseen fermentación muy débil. Las ascosporas se forman generalmente entre el contenido de la célula madre y

el de una yema; paredes verrugosas; ascas con sólo una espóra, raramente dos; las especies se diferencian por la formación de velo y por la asimilación de los hidratos de carbono».

Las especies fermentativas son ahora incluidas en el género *Saccharomyces*. Por esta razón el *Debaryomyces globosus* que sirvió a KLOCKER para establecer el género y que fermenta la glucosa y la sacarosa ha de pasar al gén. *Saccharomyces*. A pesar de ello y más bien por razones didácticas e históricas lo seguiremos describiendo en este lugar.

Especies representantes de este género están universalmente repartidas, siendo algunas parásitas del hombre.

Gen. **SACCHAROMYCOPSIS.** (Schönning)

Multiplicación por gemación. Ascósporas provistas de dos membranas. Una sola especie:

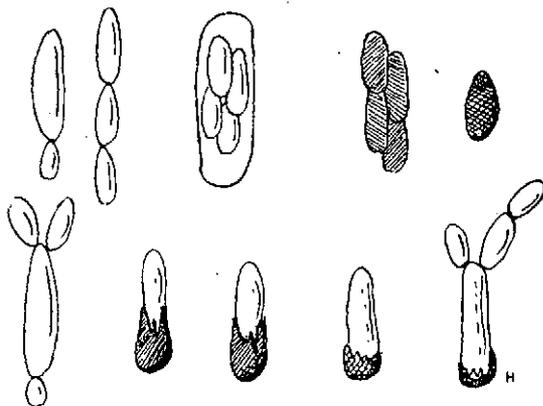
SACCHAROMYCOPSIS GUTTULATUS (Robin) Schönning

Aislada por ROBIN y estudiada más tarde por BUSCALIONI (1896). Se encuentra parásita en el intestino de pájaros y algunos mamíferos; vive ordinariamente en el intestino del conejo y del cobaya, encontrándose en las heces de estos animales.

Sus células miden de $6-16 \times 2-4$ mic. de forma oval o algo cilíndrica, reunidas en cadenas cortas de dos o tres células; la gemación es bipolar y la temperatura óptima de gemación es de $35-40^{\circ}$. No forma velo en los medios líquidos. La esporulación se observa bien en los excrementos de los conejos, formándose en cada asca de 1-4 ascósporas alargadas y recubiertas por dos membranas, la exterior o exosporium es más resistente y se rasga en el momento de la germinación y la ascóspora comienza a producir yemas. Cuando la ascóspora ha germinado el exosporium se encoge y se va reabsorbiendo lentamente.

Crece bien en agar-glucosa con glicerina y ácido tartárico y también en caldo de peptona con glucosa y vitaminas a pH 1-5 (Kreger van Rij).

Fermenta la dextrosa e invierte la sacarosa. CASAGRANDE ha podido comprobar el poder patógeno para el conejo.

Fig. 10. *Saccharomyopsis*.Gen. **SACCHAROMYCODES.** Hansen

Células vegetativas diploides, que se multiplican por un proceso intermedio entre la escisión y la estrangulación, esto es, por formación de yemas de base ancha. De ordinario se forman rudimentos micelianos con tabiques bien definidos. Las ascas se originan sin previa conjugación y contienen comúnmente 4 esporas lisas de forma esférica. La fase diploide comienza dentro del asca al fusionarse dos a dos las ascosporas momentos antes de germinar; una vez iniciada la germinación la pared del asca se rompe y el cigoto va produciendo yemas que se van desprendiendo.

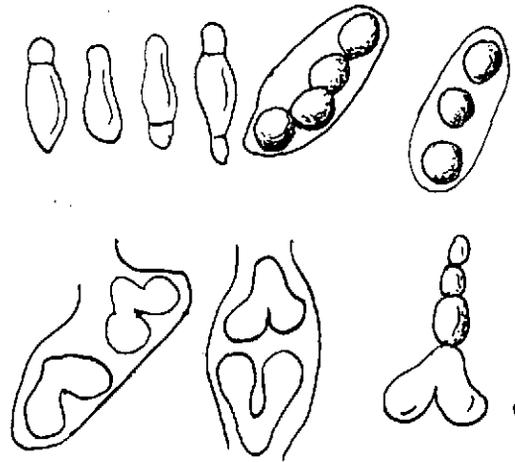


Fig. 11 *Saccharomycodes*. Conjugación de las ascosporas dentro del asca.

Gen. **SACCHAROMYCODES** Hansen

Clave de especies

1

- a. Fementan la maltosa y no las sacarosa y galactosa. Optimo de esporulación 18-20° De 2-3 ascosporas per asca **S. behrensiannus**
- b. No fermentan la maltosa pero sí las sacarosa y galactosa. Optimo de esporulación de 25-30° **2**

2

- a. Casi siempre 4 ascosporas **S. ludwigii**
- b. Casi siempre 2 ascosporas **S. ludwigii var hisporus**



SACCHAROMYCODES BEHRENSIANUS. *Klöker*

Especie descubierta por BEHRENS en lúpulo, constituida por células grandes, redondas u ovals que se multiplican formando yemas de base ancha. Cuando los cultivos se colocan a 20° la esporulación dá comienzo a las 24 horas. Las ascas contienen 3-4 ascosporas de forma esférica y con un diámetro de 4-5 mic.

Los cultivos en medio líquido no producen velo. Sobre mosto gelatina forma colonias constituidas por círculos concéntricos con un cráter central. El color de las colonias es amarillento y el margen blanco.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	-
Maltosa	+
Lactosa	-
Levulosa	+

SACCHAROMYCODES LUDWIGII *Hansen*

Descubierta por LUDWIG en 1886 en las secreciones mucosas del roble y estudiada por HANSEN en 1889. LUDWIG la consideró al principio como una forma de desarrollo del *Endomyces magnusii* y posteriormente HANSEN la aisló como especie independiente.

En los cultivos, las células son de diverso aspecto, ya tienen forma de salchicha, ya se parecen a un limón o también presentan el aspecto de botella. Se multiplican por un procedimiento intermedio entre la gemación y la tabicación; las yemas no llegan a la estrangulación completa. son *yemas de base ancha*. La temperatura máxima de gemación es de 38° C. Las colonias viejas en gelatina se hunden debido a la licuación del medio. La esporulación se verifica bien a 25° sobre rodajas de zanahoria. Las esporas son redondas y se fusionan antes de la germinación. apareándose dentro del asca originando un cigoto diploide que por tabicación dá células vegetativas, también diploides. Una vez verificada la fusión de las dos esporas, el canal de copulación dá origen a un tubo germinativo que se hincha, toma la forma de una célula vegetativa y se separa por un tabique transversal. Estas células se van separando del cigoto que continúa dando nuevas células. Algunas veces las ascosporas no

se fusionan, sino que dan directamente un tubo que se tabica, se estrangula ligeramente y se separa de la ascospora. Sobre mosto-gelatina las colonias son de color gris claro o amarillo pálido.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	+
Maltosa	-
Lactosa	-

Por la propiedad de invertir la sacarosa, se utiliza esta levadura en cervecería para corregir mostos a los que se añade sacarosa y se obtiene una riqueza alcohólica deseada.

Gen. **H A N S E N I A** (Lindner)

Sin. **Hanseniaspora** (Zikes)

Pseudosaccharomyces Kloker

Células vegetativas limoniformes con mamelones en uno o en los dos extremos. Ascosporas generalmente una, en algunas especies se encuentran dos; tienen forma redondeada o presentan el aspecto de sombrero con un reborde saliente. La formación de yemas tanto se verifica en un extremo como en los dos.



Fig. 12. *Hanseniaspora*. Células vegetativas y ascas



HANSENIASPORA APICULATA Lidner

Células apiculadas en forma de limón las cuales por gemación dan también células limoniformes aunque pueden dar yemas elipsoidales no apiculadas que originan otras también ovales hasta que pasan unas cuantas generaciones y producen nuevamente otras apiculadas. Las células apiculadas abundan más en los primeros estados de desarrollo de los cultivos. Las ascosporas contienen en su interior una sola espora redondeada. LINDER observó por primera vez la forma de ascosporas en la *H. apiculata* aislada de las flores de Robinia pseudoacacia pero no pudo conseguir estudiar su germinación; parece ser que la formación y germinación de las ascas requiere determinadas condiciones.

Después de los estudios de HANSEN, ZIKES, KLOKER y la rusa BATSCHINSKAJA no se ha hecho mucha luz sobre la esporulación de esta especie y por eso unos autores la incluyen en el gen. *Hanseniaspora* y otros continúan considerándola dentro del *Saccharomyces apiculata*, o la consideran como una variedad no esporogena de la *Hanseniaspora*.

Se encuentra muy abundante en los frutos maduros, en los nectarios de las flores, en las secreciones gomosas de los árboles y en el mosto de uva.

Gen. NADSONIA Sydow

Multiplicación por yemas de ancha base como en *Saccharomyces*. Ascas que se forman por heterogamia entre una célula hija y la célula madre. Cuando se va a formar el asca la célula retiene una de las células producidas por gemación en uno de los extremos, quedando el contenido protoplásmico de las dos células en comunicación; posteriormente se forma en el otro extremo de la célula madre otra yema cuyo contenido también queda en comunicación con el de la madre. El producto de la anfimixia de las dos primeras pasa íntegro a la tercera originándose una o más raramente dos esporas de color pardo, de superficie verrugosa y con una gotita brillante de aceite en el centro. Las dos primeras células que han quedado vacías se separan del asca y ésta queda independiente hasta la nueva germinación. Solamente se consignan dos especies, aisladas ambas del exudado mucilaginoso segregado por las cortezas de los árboles.

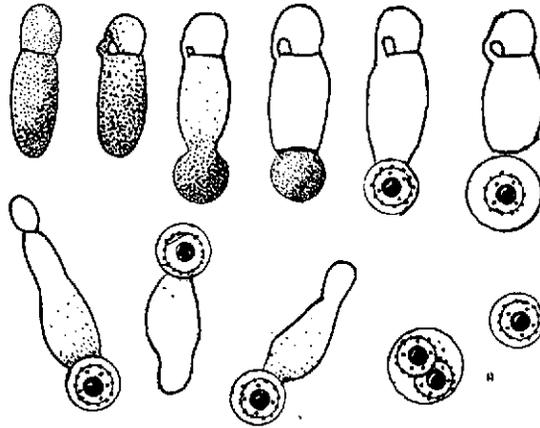


Fig. 13. *Nadsonia*. Proceso de formación de las ascosporas según Guilliermond

NADSONIA FULVESCENS. *Nadson* y *Konokotina*

Células ovals alargadas con los extremos algo limoniformes de 8-9 × 4-6 mic. No forma micelio en los medios líquidos, produciéndose excepcionalmente cuando el medio tiene alcohol etílico. La esporulación se hace bien en Gorodkova a 21-25°. La espora mide de 4-6 mic.

FERMENTACIÓN

Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	-
Maltosa	+
Lactosa	-

NADSONIA ELONGATA *Konokotina*

Células largas de 7-20 × 3-8 mic. en medios líquidos y en medios sólidos. Se diferencia de la anterior por formar abundante micelio en los medios líquidos a los 12-14 días.

Sólo fermenta la glucosa.



Gen. **MONOSPORELLA** Keilin (1920)

Sin. **Monospora** Metchnikoff (1884)

Levaduras que no forman micelio. Células que se multiplican por gemación ordinaria. Una sola ascospora por asca en forma de aguja, sin flagelo); germinación lateral, de modo a emitir una prolongación en cuyo extremo se van formando por gemación las células vegetativas; las cuales se desprenden sucesivamente a medida que se forman.

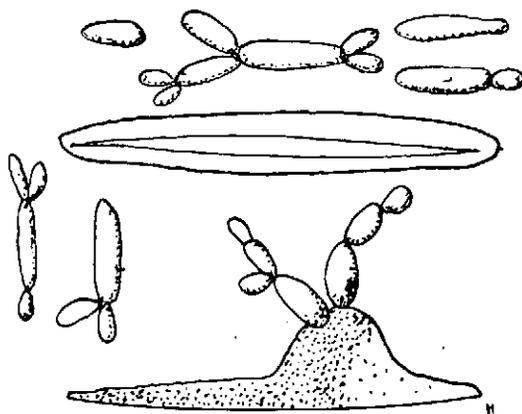


Fig. 14. *Monospora*. Células vegetativas y ascosporas germinando

MONOSPORELLA BICUSPIDATA Keilin

Esta especie fue encontrada y estudiada por METCHNIKOFF en la cavidad general de los crustáceos de agua dulce del gén. *Daphnia*. Está formada por células ovales que se multiplican por yemas de la forma ordinaria. De tiempo en tiempo una célula crece más y se alarga para dar lugar a un asca, la cual forma en su interior una sola ascospora, que tiene la forma de aguja. Cuando la espora ha adquirido el grado de madurez suficiente, concentra su protoplasma en la parte media, dando lugar a un mamelón lateral que crece y produce en su extremo yemas, las cuales se van desprendiendo a medida que se forman, originando así abundantes células ovales vegetativas que permanecen en la cavidad general del artrópodo hasta que producen su muerte.

MONOSPORELLA UNICUSPIDATA Keilin

Esta especie establecida por KEILIN como consecuencia de los estudios efectuados en larvas de un Díptero, el *Dasyhelea obscura*, atacadas de una levadura que según él difería en algunos caracteres de la estudiada por METCHNIKOFF y a la cual adjudicó el nombre de *unicuspidata*.

Gen.. **NEMATOSPORA** Peglion

Hongos parásitos de vegetales presentando bien desarrollado el micelio; algunas veces las células levaduriformes casi no existen. Presencia de ascas de gran tamaño conteniendo en su interior 8-16 esporas fusiformes, finas y provistas en un extremo de un largo flagelo, el cual se percibe bien cuando el asca se rompe y la espora queda en libertad. La germi-

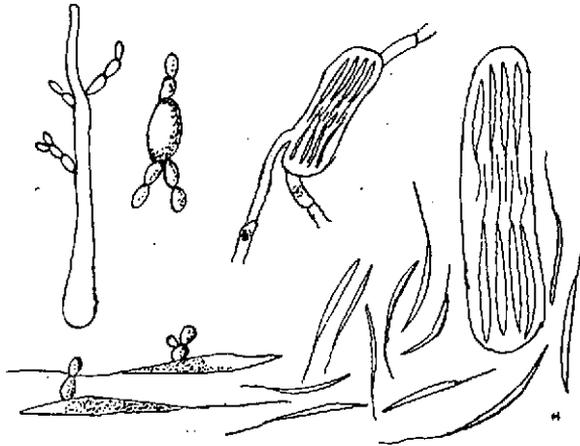


Fig. 13. *Nematospora*. Ascosporas flagelulatas

nación es lateral produciéndose yemas o filamentos micelianos. Se desarrolla bien en todos los medios artificiales; en los medios líquidos producen primero un depósito de células levaduriformes y después forman en la superficie copos o islotes de filamentos micelianos. El género contiene una sola especie reconocida por LODDER y KRECGER van RIJ (1952):

NEMATOSPORA CORYLI *Peglion*

Se ajusta a los caracteres dados para la descripción del género. Las otras especies descritas por diversos autores:

NEMATOSPORA LYCOPERSICI *Schneider*

NEMATOSPORA PHASEOLI *Wingard*

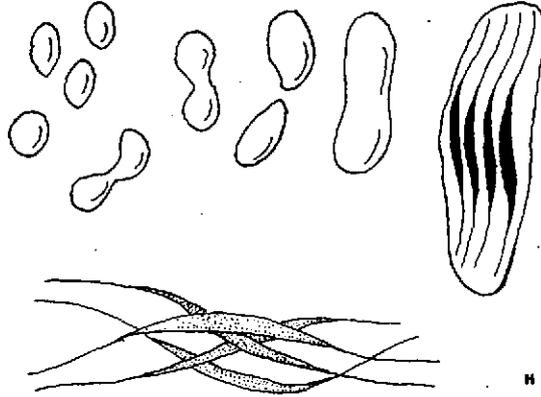
NEMATOSPORA NACPURI

son consideradas como sinónimas de la *N. coryli* o como formas biológicas que atacan a diversas plantas. Son la causa de varias enfermedades por atacar a los frutos y semillas de infinidad de plantas: algodónero, tomate, cafetero, limonero, granado, avellano, teniendo este parásito una distribución universal. FAWCETT, en 1929, hizo una detenida descripción de la enfermedad sobre Citrus.

Especies de este género han sido objeto de modernas investigaciones sobre la transmisión hereditaria de genes que intervienen en la síntesis de enzimas elaboradoras de los distintos aminoácidos, que integran las proteínas.

Gen. **COCCIDIASCUS**

Este género es muy parecido al *Monosporella* del cual se diferencia por que las esporas de *Coccidiascus* son fusiformes en vez de aciculares y porque las ascas de éste tienen hasta cuatro ascosporas mientras que el *Monosporella* sólo tiene una. Las ascosporas fusiformes no tienen flagelo como las del *Nematospora*. No se ha conseguido obtener cultivos en el laboratorio. Se encuentra parasitando la *Drosophila funebris*. No presenta nunca micelio. Las ascosporas se forman por isogamia. Las células vegetativas son de forma oval o elípticas un poco alargadas o simplemente esféricas.

Fig. 16. *Coccidiascus***COCCIDIASCUS LEGERI** Chatton (1913)

Se encuentran parásitas en las células de la pared intestinal de *Drosophila funebris* (4).

Gen. **LIPOMYCES**. Lodder y Kreger van Rij (1952)

Único género de la subfamilia *Lipomycetoideas*; tiene como carácter primordial la manera característica de formarse las ascas y ascosporas. Esta peculiaridad fue primeramente observada por STARKEY en 1946, pero en 1952, el género fue estudiado y descrito por LODDER y KREGER VAN RIJ.

El proceso de formación de las ascas se efectúa de la siguiente forma: En uno o más costados de la célula madre se forman unas protuberancias a manera de sacos. El contenido de estos sacos, que al principio es granular, se va organizando y origina las ascosporas, que pueden ser de 4 hasta 16, y a veces más. Las ascas permanecen unidas a los costados de la célula madre. Las esporas son de paredes lisas y de color ambarino, su forma es oval.

Las esporas se tiñen bien con verde malaquita. Un medio pobre en nitrógeno y que tenga como única fuente de carbono, etanol, glicerina o lactosa favorece la esporulación.

(4) CHATTON, E. (1913), *Compt. rend. soc. biol.*, 65-117.

El género *Lipomyces* es además caracterizado por sus células redondas ovoides capsuladas, por contener una gran gota de aceite en las células de los cultivos viejos y por la ausencia de poder fermentativo. Los autores admiten dos especies: *L. lipofer* y *L. starkey*, las cuales sólo difieren en la asimilación de etanol y de la lactosa y también en el tamaño de las células.

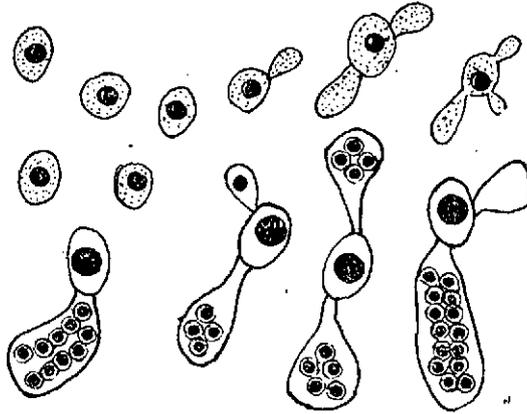


Fig. 17. *Lipomyces*. Ascas externas cargadas de esporas conteniendo grasa

CONNELL y col. creen que las dos especies se pueden reducir a una sola ya que ambas, en determinadas condiciones, asimilaban lactosa y también el etanol. Este mismo autor y también WICKERHAM demuestran que *Lipomyces* es capaz de formar compuestos amiláceos cuando se cultiva en determinadas condiciones; este carácter no fue observado por los autores y WICKERHAM supone que el hecho estriba en que mientras él hace los estudios en medios líquidos, LODDER y KREGER VAN RIJ realizaron los cultivos en placas.

Se han encontrado cepas de esta especie en el suelo de varios países y en la piel del hombre.

N
 LEVADURAS NO ASCOGENAS
 U
 HONGOS LEVADURIFORMES

Gen. **SPOROBOLOMYCES** Kluver y V. Niel

Levaduras que producen pigmentos carotenoides. Se desarrollan bien sobre mosto de cerveza produciendo un velo micodérmico. Se multiplican por gemación ordinaria en los primeros momentos del cultivo, pero después se originan lateralmente unos esterigmas o basidios sobre los que nacen unas esporas aplastadas, reniformes llamadas balistosporas por la propiedad que tienen de ser proyectadas a distancia. También se forman células alargadas de aspecto miceliano originando un pseudomicelio en algunas especies. Son estrictamente oxidativas.

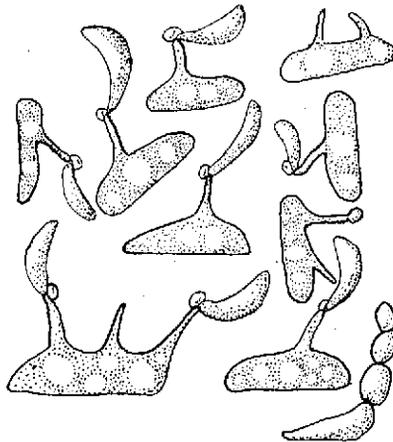


Fig. 18. *Sporobolomyces*.

- | | |
|---|------------------------------|
| <p>a. Produce pseudomicelio. Con carotinoide de color salmón
 Vive en las plantas y en el aire. Aismila los nitratos.</p> | <p>§ salmonicolor</p> |
| <p>b. No forma pseudomicelio. No asimila los nitratos. Color rojo</p> | <p>§ roseus</p> |

Gen. **BULLERA**

Las especies de este género se caracterizan por tener las balistosporas simétricas, ovales o giobosas. Sus células no forman nunca carotenoides. Las colonias tienen un color amarillo pálido o crema. Nunca forman micelio ni pseudomicelio. No poseen facultad fermentativa. Las especies de este género están muy abundantemente repartidas en la Naturaleza, en el aire y sobre las hojas de las plantas, sobre todo de aquellas que son vistosas. Como en el género anterior, las balistosporas, que llevan una gotita

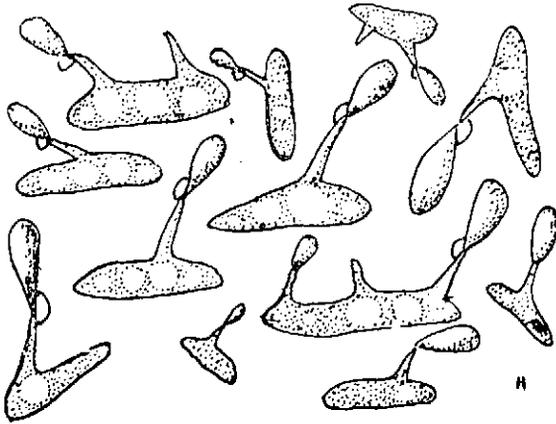


Fig 19. *Bullera*. Células vegetativas balistosporas

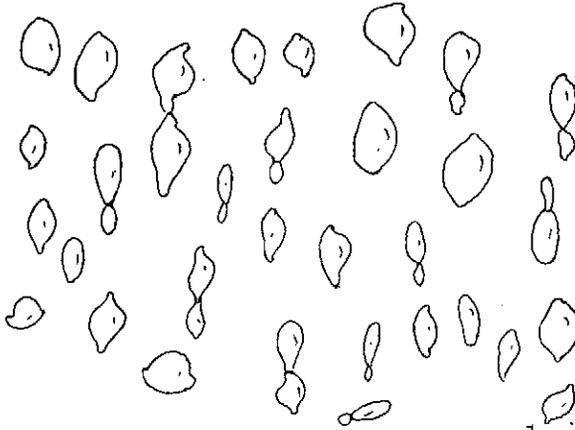
en la base, son proyectadas a la tapadera de las cajas de Petri formando el «espejo». BULLER, que estudia detenidamente estos hongos, describe que cada célula levaduriforme puede producir dos o más esterigmas, cada uno de los cuales puede formar tres, cuatro o más balistosporas.

BULLERA ALBA

Formada por células redondeadas con una cápsula en la cual se forma amiloide.

Gen. **K L O E C K E R A**

Levaduras sin pseudomicelio ni micelio verdadero; sus células tienen forma de limón, por lo cual antiguamente se estudiaba como *Saccharomyces apiculata*. Presenta muchos puntos de contacto con el gén. *Hanseniaspora*, pero estas células no forman ascosporas, multiplicándose únicamente por gemación bipolar.

Fig. 20. *Kloeckera*

Cuando se cultivan en medios que contienen glucosa producen una franca fermentación con producción de ácido. Algunas cepas determinan una fermentación muy débil de la sacarosa, otras solamente producen en este azúcar una inversión. El resto de los azúcares tampoco son fermentados. No asimilan el nitrato potásico.

Se encuentran muy repartidas en la Naturaleza, sobre todo en el mosto de uvas y en el néctar de flores.

KLOECKERA APICULATA

Según JANKE (1923) esta levadura corresponde a un grupo de especies muy difícil de distinguir por su morfología. En cultivos recientes las células son apiculadas y ovales-alargadas, siendo más abundantes las pri-

meras. Cuando el cultivo es viejo predominan las células alargadas en forma de salchicha. Para HANSEN, la célula forma dos clases de células hijas, unas apiculadas y otras alargadas, predominando unas u otras, según el estado de la colonia. Según HENRICI se le puede considerar como la forma no esporogena de *Hanseniaspora*.

Fermenta la glucosa, manosa y fructosa; algunas cepas también fermentan la sacarosa. Estas fermentaciones se detienen cuando la riqueza alcohólica es del 2-3 %, dejando paso entonces a otras levaduras normales de fermentación. En la cerveza no perjudica, pero en los vinos puede producir mal sabor porque ataca a los ácidos cítrico y tartárico.

Gen. **TRIGONOPSIS**

Esta levadura está constituida por células sueltas que en los cultivos jóvenes tienen forma de huevo o de elipse, pero a medida que van madurando se van haciendo de aspecto claramente triangular. La reproducción se hace por yemas que nacen justamente en los vértices de los triángulos de las células madres.

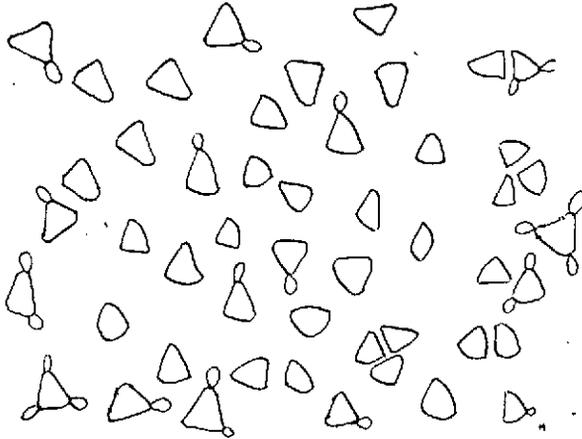


Fig. 21. *Trigonopsis*

T. VARIABILIS

Hasta el momento actual este género está representado sólo por dos cepas de esta especie, aisladas ambas de la cerveza.

Gen. **PITYROSPORUM**

Esta levadura es muy pequeña, de $2-3 \times 1-1,5$ mic. Sus células tienen un extremo ensanchado por lo que antiguamente se le dio el nombre de «bacilo botella». La gemación se produce formándose una yema en la parte opuesta a la base de la botella, la estrangulación no es muy intensa sino que se forman yemas de base ancha, las cuales se desprenden por escisión del tabique.

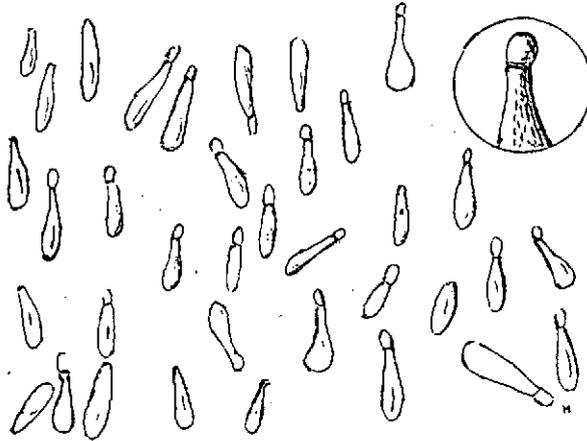


Fig. 22. *Pityrosporum*

Crece mal en los medios ordinarios de cultivo, en los que no se desarrolla la mayoría de las veces, pero sí se desarrolla bien cuando se adicionan sustancias grasas como lanolina, ácido oleico, o manteca o secreciones de caspa seborreica con la que casi siempre se encuentra relacionado.

GORDON en el año 1957 propone ampliar la descripción del género para que quepan en él todas aquellas levaduras no esporógenas que sean claramente lipofílicas, aunque no tengan forma de botella.

Se han estudiado varias especies que bien pudieran considerarse como cepas de una misma.

PITYROSPORUM OVALE

Se puede cultivar de una forma regular usando como inóculo las escamas de la caspa de la cabeza humana, en medio de Sabouraud adicionado de un 40 % de glicerina que inhibe el desarrollo de otros hongos y el de bacterias pero no el de *Pityrosporum*.

P. ORBICULARE

Fue aislado y cultivado por GORDON, 1951, a partir de escamas de *Tinea versicolor* y empleando medios adicionados de extracto etéreo de lanolina.

P. CANIS

Fue aislado en 1955 en Suecia a partir de escamas de ootitis media de perro.

Gen. **CRYPTOCOCCUS**

Está formado por células exclusivamente libres, no forman nunca pseudomicelio ni micelio. Las células son redondas u ovals, con gemación mutilateral y rodeadas de una cápsula mucilaginosa. Producen un compuesto amiláceo cuando se cultivan en medio ácido y también se caracterizan por no poseer facultad fermentativa por lo que se ha destacado del gén. *Torulopsis*.

CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Es la especie mejor estudiada del grupo, debida a ser la causa de la enfermedad Criptococosis que origina una meningitis sin fiebre y una cefálea muy manifiesta. Se localiza en el sistema nervioso central.

No todas las cepas de esta levadura son patógenas. Solamente 8 de cuarenta estudiadas en este sentido acusaron propiedades patógenas.

Muchos investigadores la han aislado de frutas, de cuerpos de insectos, y de hierbas.

No fermentan los azúcares pero pueden asimilarlos con formación de grandes cantidades de ácido; tal ocurre con la manosa, glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa y lactosa. También utiliza como fuentes nitrogenadas la asparragina, peptona y urea, pero en cambio no descompone el nitrato potásico.

C. ALBIDUS

Especie muy difundida en la Naturaleza; se caracteriza principalmente por la facultad que presenta de descomponer la pectina como lo demostró WIERINGA en cepas aisladas de líquidos del enriado del lino; es una especie productora de *pectinasa*.

Otras especies como *C. laurentii*, *C. difluens* y *C. terreus* tienen menos interés.

Gen. TORULOPSIS Berlese

Células redondas o a veces ovales que se reproducen por gemación multilateral, quedando las células hijas adheridas a la madre durante algún tiempo. Cuando las células hijas forman cadenas estando aun en conexión con la célula materna, las células van siendo cada vez de menor diámetro a medida que se separan de la célula central. No se encuentra en ella la formación de micelio y en cuanto a pseudomicelio rara vez se forma. Por regla general todas tienen la facultad fermentativa bien manifiesta. La mayoría de las especies no fermentan la maltosa o si lo hacen es con muy poca intensidad. Muchas especies contienen lipasa y por ello pueden digerir las grasas. Resisten bien el calor y se adaptan a medios osmofílicos por lo que no es raro encontrarlas en líquidos de alta concentración de sal o de azúcar, pudiendo originar el bombeo en las latas de leche condensada, azucarada. No se considera a estas levaduras como perjudiciales en las fábricas de cerveza.

Algunas especies se han empleado en la preparación de forrajes dejándolas crecer en substratos que tengan algo de azúcar y sustancias minerales originando así alimentos baratos ricos en proteínas.

TORULOPSIS SPHAERICA *Lodder*

Formada por células redondeadas de 6-7 mic. globosas, aisladas o en grupos de dos. Cuando se cultiva en mosto, a los 6 días puede formar un velo fino, mucoso y sedimento abundante.

El único azúcar que *no fermenta es la maltosa*.

Se encuentra en muchos productos lácteos.

T. UTILIS *Lodder*

Células redondas en condiciones normales, que crecen bien a la temperatura ambiente. Pueden estar aisladas o en parejas. Su tamaño oscila de 3-9 × 3-6 mic.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	-
Lactosa	-
Rafinosa	1/3

Puede asimilar nitrato potásico y otros compuestos nitrogenados (sulfato amónico, peptona, etc.). Crece bien en medio con alcohol etílico como única fuente de carbono.

Se emplea para preparar levaduras para pienso, dejándola crecer sobre melazas, suero de leche de las queserías, lejías sulfúricas, y otros materiales de poco coste o productos de desecho de otras industrias.

Se utiliza mucho no sólo como pienso de los animales sino como alimento suplementario del hombre ya que tiene un gran contenido del complejo vitamínico B y sales minerales con algunas proteínas, aunque éstas en cantidad escasa, por lo que no se puede considerar como alimento básico sino sólo suplementario.

T. GLOBOSA. *Holsen y Hammer*

Células redondas u ovals de 4-6 × 5-8 mic. Se desarrolla muy bien sobre sustancias ricas en sacarosa, por eso suele encontrársela produciendo bombeo en los botes de leche condensada azucarada. *No fermenta ni la galactosa ni la lactosa*.

T. CAROLINIANA

Aislada de líquidos de alta presión osmótica como son las salmueras de concentraciones en cloruro sódico superiores a 20% utilizadas para elaborar pepinillos encurtidos.

T. MAGNOLIAE

VAN DER WALT aisló esta especie de un zumo de naranja concentrado, en Africa del Sur. Se encuentra en flores e insectos y se desarrolla con mucha facilidad en el néctar. Esta especie, como la anterior, asimila los nitratos.

T. HOLMII *Lodder*

Células ovales pequeñas 3-5 mic. Las colonias son de superficie lisa y mucosa. Es perjudicial para la industria cervecera por producir enturbiamiento en las cervezas de pocos grados.

No fermenta la lactosa ni la maltosa.

T. STELLATA y T. BACILLARIS

Están relacionadas con mostos concentrados en donde hay mucha cantidad de azúcar. También han sido encontradas en melazas de alfalfa con concentraciones de 55 % de azúcares.

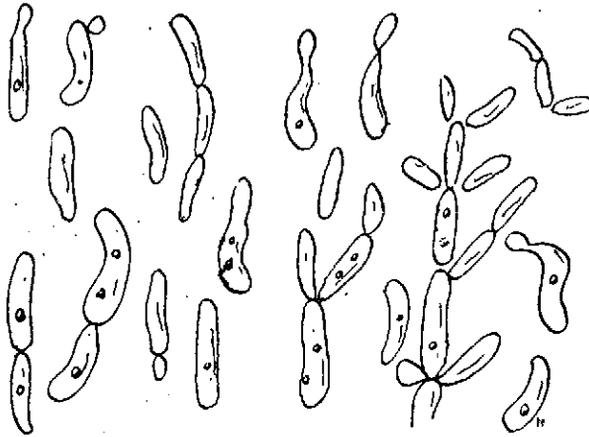
Gen. **MYCODERMA** Person

Levaduras caracterizadas por formar en medio líquido, un velo seco, mate, lleno de aire y en algunas especies un pseudomicelio muy rudimentario. Las células son ovales-alargadas o cilíndricas. En el interior de las células y flotando en el protoplasma se ven una o más gotitas brillantes de aceite.

No fermentan los azúcares y sólo asimilan glucosa, manita y fructosa. Asimilan el etanol transformándolo en anhídrido carbónico y agua o en ácido acético. Estas levaduras producen las más de las veces alteración en el sabor de los alimentos atacados.

MYCODERMA CEREVISIAE *Desmazières*

Cultivando en mosto produce células ovales alargadas o cilíndricas sueltas, unidas dos a dos o en cortas cadenas. A los dos días forman un delgado velo de superficie lisa y seca; a los diez días se hace grueso, se arruga y se llena de aire. A veces se forma un pseudomicelio rudimentario pero sin blastosporas. A los 45 días la colonia gigante es de color gris, de superficie seca y mate y algo hundida en el centro.

Fig. 23. *Mycoderma*

Se encuentra con frecuencia en las bodegas de fermentación de las que pasa después a las bodegas de almacenamiento. Aunque destruye el alcohol no se la considera levadura perjudicial. De todas formas, no deja de ser una infección que debe corregirse.

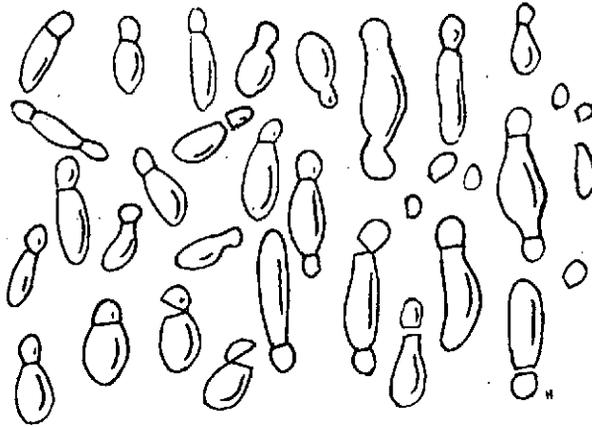
M. VINI *Desm.*

Morfológicamente es en un todo análoga a la anterior, sin embargo difiere en algo en sus propiedades biológicas. Sobre los ácidos actúa de forma diferente, así al ácido láctico, succínico y cítrico los ataca con intensidad manifiesta, al tartárico lo hace con menos intensidad y al acético y málico unas cepas los descomponen y otras no.

Atacan a los vinos estropeando su color y su aroma.

Gen. **CHIZOBLASTOSPORION** Star. y Henr.

Este género fue aislado por primera vez por STARKEY y HENRICI a partir de muestras de suelos. Posteriormente en 1930 fue hecho el estudio y la descripción por CIFERRI, el cual consideró como carácter esencial la formación de esporas o yemas de base ancha las cuales se desprenden de la célula madre por escisión del tabique. Este carácter parece ser que

Fig. 24. *Schizoblastosporion*

desaparece cuando se repiten los cultivos. En 1954, LUND aísla a partir de muestras de suelos de Suecia una levadura con las mismas características que el *Sch. Starkeyhenrici*.

Se diferencia del *Pityrosporon* en que puede cultivarse en medios ordinarios sin necesidad de adicionar sustancias grasas ni de hacerlo a una temperatura determinada.

Se encuentra con relativa abundancia en ciertos frutos como uva manzanas y también en los «agrios».

Gen. **BRETTANOMYCES** Kuff y Laer

Este género agrupa un conjunto de especies análogas por su morfología y propiedades bioquímicas a las del gén. *Cándida* del cual fueron segregadas. Caracteriza a las células de este gén. el que aparte de células ovales más o menos alargadas hay otras típicamente terminadas en punta de arco ojival. Cuando se cultivan en substratos sólidos, la mayoría forman pseudomicelio y sus segmentos se desarticulan con facilidad. El

micelio verdadero no se desarrolla nunca. Los cultivos en mosto producen sedimento y algunas veces un fino velo superficial. Una característica de las especies de este género es que forman grandes cantidades de ácido que dificultan el desarrollo de las colonias dando lugar al envejecimiento y la muerte prematura de las mismas, proporcionando al mismo tiempo al medio un típico olor a repuntado.

J. CUSTERS en 1940 hace un detenido estudio de un gran número de cepas pertenecientes a este género. Todas ellas las reduce a cuatro especies.

En un principio la fuente de donde se tomaron las muestras para el estudio de estas levaduras fueron las cervezas Lambic belgas y las cervezas inglesas. Posteriormente se aislaron de vinos franceses repuntados y también de líquidos de encurtidos mal conservados.

BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS

Fué detenidamente estudiada por KUFFERATH en 1920 a partir de cervezas Lambic belgas, cultivadas en agar-malta. El tamaño de las células es de 3.9×2.4 mic., aisladas o en cortas cadenas de tres o cuatro elementos. Los cultivos en mosto dan, a los 14-15 días un velo muy fino liso y seco. A las cervezas les da un característico olor aromático.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	+
Lactosa	-

La asimilación de nitratos es positiva.

B. ANÓMALA

Estudiada por CUSTERS a partir del sedimento de cerveza Lambic, le dio este nombre porque realmente es una anomalía el que una levadura de cerveza *no fermenta la maltosa*, pero en cambio sí produce fermentación de la lactosa.

B. CLAUSSENI de Custers

Es una levadura cuyas células son de mayor tamaño que las anteriores (12 mic.). Tiene como característica el que su poder fermentativo se

extiende a los seis azúcares empleados ordinariamente en las pruebas de fermentación.

Cuando usó cepas pertenecientes a KUFFERATH la producción de pseudomicelio fue muy escasa. Por el contrario, cepas recibidas de ANDERSEN, aisladas de cervezas jóvenes de Dinamarca produjeron en los cultivos de CUSTERS abundante pseudomicelio de Brettanomyces.

B. VINI. Reynaud y Domerck (1956).

Hacen un estudio comparativo del *B. bruxellensis var. vini* descrito el año anterior por BARRET y consideran que tiene características suficientes para elevarlo a la categoría de especie independiente.

Gen. C Á N D I D A

En el Congreso de 1937 se aceptó cambiar el nombre de *Monilia* por el de *Cándida* para agrupar unos hongos levaduriformes que se desarrollan bien en todos los medios a la temperatura del laboratorio, originando en los medios sólidos una colonia blanca cremosa, húmeda, bombeada que emite filamentos hacia la periferia y hacia el interior de substrato. En los medios líquidos forma primero un velo constituido por filamentos de un pseudomicelio o de un micelio verdadero con blastosporas bien patentes; éstas van cayendo al fondo del tubo a medida que se van formando originando un sedimento más o menos abundante mientras que el velo crece en espesor y en superficie, se pliega y se arruga al mismo tiempo que deja incluidas una serie de burbujas de aire.

Unas especies de estos hongos levaduriformes pueden originar fermentaciones, otras son parásitas del hombre ocasionando las «Moniliasis».

CÁNDIDA ALBICANAS

Es una de las especies mejor estudiadas por ser parásita de la piel y de las mucosas del hombre originando las enfermedades conocidas con el nombre de «Moniliasis» y que se dan con mucha frecuencia en los países tropicales. El carácter distintivo de las especies de este grupo es la formación de clamidosporas o esporas de conservación que mantienen a la especie en estado de vida latente durante mucho tiempo hasta que las condiciones de desarrollo vuelven a ser favorables. Estas clamidosporas son unos ensanchamientos que casi siempre se forman en el extremo de los filamentos micelianos y cuyo tamaño es de 8-10 micras. Poseen dos membranas y el protoplasma está muy condensado. Según los trabajos

de KLIGMAN en 1950, hace falta la reunión de varias condiciones para provocar el desarrollo de las clamidosporas:

- a) Un medio de cultivo pobre en alimentos.
- b) Una baja tensión de oxígeno.
- c) Una temperatura baja (la temp. de 37° inhibe el desarrollo de clamidosporas).

Cuando se hacen cultivos repetidos las colonias van tomando aspectos diferentes y así, por analogía con lo que ocurre con las bacterias, se forma la fase «S» o fase cremosa y la fase «R» o fase membranosa. Según los

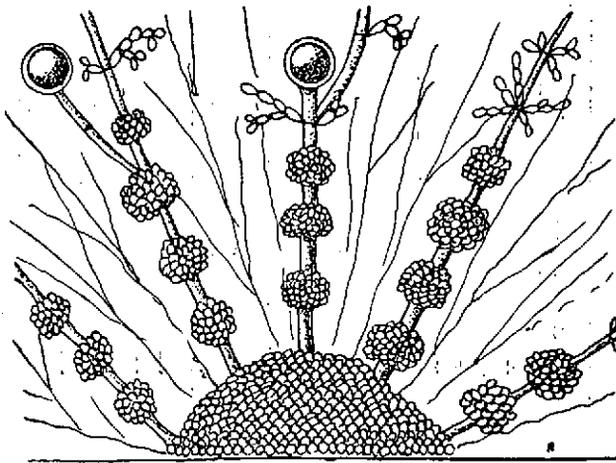


Fig. 25. *Candida albicans* con clamidosporas

trabajos de TEISSIER se llega a la conclusión de que las dos fases se distinguen de la manera siguiente:

a) Mientras que la fase «S» se caracteriza por el predominio de células de levadura sueltas formando colonias cremosas, en la fase «R» hay predominio de pseudomicelio.

b) En medio líquido la fase «R» forma siempre velo, mientras que la «S» sólo forma anillo o un velo sutil.

c) El paso de la fase «S» a la «R» disminuye poderosamente el poder patógeno o lo anula completamente.

A continuación damos tres cuadros tomados de LANGERON en donde se condensan las principales características biológicas frente a los azúcares y a los compuestos nitrogenados.

La tendencia actual de los especialistas en Monilias médicas es considerar los grupos como especies y las especies como variedades.

FERMENTACION DE AZUCARES

Según Langeron y Guerra

Especies	Grupos	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Levulosa
<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	+	—	+	—	—	+
	<i>triadis</i>	++	—	—	++	—	—	+
	<i>stellatoidea</i>	+	+	—	+	—	—	+
	<i>truncata</i>	+	+	—	+	—	—	+
<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	++	+	+	+	—	—	+
	<i>intermedia</i>	+	+	+	+	—	—	+
	<i>pelliculosa</i>	++	++	++	++	—	—	+
<i>pseudotropicalis</i>	<i>pseudotropicalis</i>	+	—	+	—	+	+	+
<i>guilliermondi</i>	<i>guilliermondi</i>	+	+	+	—	—	+	+
	<i>chalmersi</i>	+++	+	+	—	—	—	+
<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	+	—	—	—	—	—	+
	<i>parakrusei</i>	+	—	—	—	—	—	+
	<i>aldoi</i>	+	—	—	—	—	—	+
<i>brumpti</i>	<i>brumpti</i>	+	—	—	—	—	—	+
	<i>flareri</i>	—	—	—	—	—	—	+
<i>azimática</i>	<i>zeilanoides</i>							
	<i>deformans</i>							
	<i>suaveolens</i>							



ASIMILACION DE AZUCARES

Según Langeron y Guerra

Grupos	Especies	Glucosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa
<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	—	+	—	+
	<i>triadis</i>	+	+	+	—	—
	<i>stellatoidea</i>	+	+	+	—	—
	<i>truncata</i>	+	+	—	—	—
<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	+	+	+	—	—
	<i>intermedia</i>	+	+	+	+	—
	<i>pelliculosa</i>	+	+	+	—	—
<i>pseudotropicalis</i>	<i>pseudotropicalis</i>	+	+	—	+	+
<i>guilliermondi</i>	<i>guilliermondi</i>	+	+	—	—	+
	<i>chalmersi</i>	+	+	+	—	—
<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	+	—	—	—	—
	<i>parakrusei</i>	+	+	+	—	—
	<i>aldoi</i>	+	+	+	—	—
<i>brumpti</i>	<i>brumpti</i>	+	—	—	—	—
	<i>flareri</i>	+	+	+	—	+
<i>azimática</i>	<i>zeilanooides</i>	+	—	—	—	—
	<i>deformans</i>	+	—	—	—	—
	<i>suaveolens</i>					



ASIMILACION DE NITROGENO

Según Langeron y Guerra

Grupos	Especies	Peptona	Asparagina	Histidina	Urea	Sulfato amónico
<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	+	+	+	+
	<i>triadis</i>	+	+	+	+	+
	<i>stellatoidea</i>	+	+	+	—	—
	<i>truncata</i>	+	+	+	—	+
<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	+	+	+	—	+
	<i>intermedia</i>	+	++	—	—	+
	<i>pelliculosa</i>	+	—	—	—	—
<i>pseudotropicalis</i> ^o	<i>pseudotropicalis</i>	+	+	+	+	+
<i>guilliermondi</i>	<i>guilliermondi</i>	+	+	+	—	+
	<i>chalmersi</i>	+	+	+	—	+
<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	+	+	+	+	+
	<i>parakrusei</i>	+	+	+	—	+
	<i>aldoi</i>	+	+	+	—	+
<i>brumpti</i>	<i>brumpti</i>	+	+	—	—	+
	<i>flareri</i>	+	+	+	+	+
<i>azimática</i>	<i>zeilanoides</i>	+	—	—	—	—
	<i>deformans</i>	+	+	+	++	—
	<i>suaveolens</i>	+	+	+	+	+



Candida tropicalis Castellani.Sin. **Monilia candida** Hansen**Candida vulgaris** Berkhaut

Esta levadura cuando se cultiva en mosto origina una infinidad de blastosporas ovales o redondas grandes; al principio aisladas, posteriormente en cortas cadenas. A los pocos días de iniciado el cultivo, las blastosporas se van acumulando en el fondo del tubo mientras que en la superficie del líquido se forma un fino velo constituido por un pseudomicelio y a veces por verdadero micelio. Estos filamentos micelianos tienen un aparato blastospórico muy desarrollado, produciendo rápidamente una cantidad enorme de blastosporas que se van acumulando en el fondo del tubo. Cada célula de levadura lleva en su interior dos corpúsculos polares muy refringentes que son dos gotitas de grasa. Cuando los cultivos se hacen sobre agar-patata estos aparatos blastospóricos se desarrollan rápidamente. En las colonias gigantes el borde es liso al principio pero después surgen en forma radial como unos filamentos a todo alrededor de la colonia.

En la prueba de fermentación de azúcares se comportan de una forma normal fermentando todos los azúcares menos galáctosa y lactosa.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	+
Lactosa.	-

Los cultivos en mosto originan una fuerte fermentación con producción de alcohol que se va acumulando hasta llegar a un 7 % al cabo de los seis meses cuando la temperatura oscila alrededor de los 38°. Así como a la sacarosa la fermenta bien a la rafinosa la fermenta muy débilmente. Algunas cepas de esta especie tienen la propiedad de asimilar la xilosa por lo cual se emplearon en Alemania en la preparación de forrajes.

Se encuentran muy repartidos en la naturaleza sobre frutos, hojas y restos vegetales en descomposición. En las queserías se le encuentra ordinariamente sobre los quesos blancos contribuyendo a su maduración.

CANDIDA PSEUDOTROPICALIS.

Es otra levadura que también se encuentra relacionada con los productos de las industrias lácteas, mantequerías y queserías compartiendo la elaboración de dichos productos. No fermenta la galactosa ni la maltosa.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	+
Maltosa	-
Lactosa	+

CANDIDA KRUSEI.

Esta levadura es considerada en muchas industrias como causante de la putrefacción. Ha sido aislada para su estudio de medios muy diversos como vinos, pasas, pepinillos encurtidos, líquidos de tenerías, etc.

Los cultivos en medio líquido forman un velo que tiene la característica de que asciende por las paredes del tubo. Fermenta a la glucosa y algo a la levulosa.

FERMENTACION

Glucosa	+
Galactosa	-
Sacarosa	-
Maltosa	-
Lactosa	-

Gen. TRICHOSPORON

Hongos levaduriformes que producen a la vez blastosporas y artrosporas; los filamentos del pseudomicelio que llevan tabiques muy próximos se escinden y originan al desintegrarse una enorme cantidad de oidios o artrosporas casi cuadradas. En el extremo de los filamentos se forman a manera de rizoides, como unos pinceles de filamento cortos que le sirven al hongo para sujetarse, los que reciben el nombre de *apresorios*; estos aparatos, cuyo conjunto tienen el aspecto de una coliflor, rodean a los pelos de la cabeza o del bigote originando unos glomérulos más o menos blanquecinos conocidos con el nombre de *piedras blancas* que padecen los hombres, sobre todo de los países tropicales.

T. BEIGELI *Vuillemin*

Es la especie más común de las que producen las *pedras blancas*. Exa-

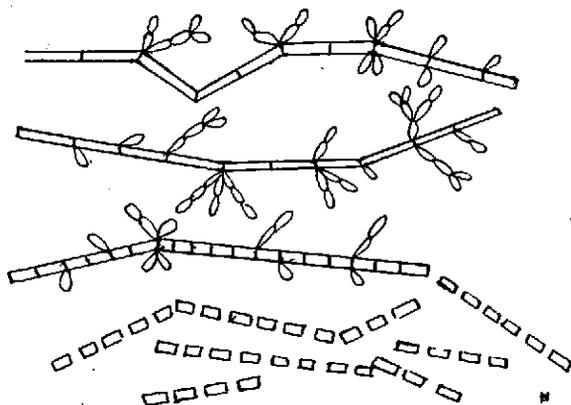


Fig. 26. *Trichosporon*

minadas éstas al microscopio y tratadas con hidróxido sódico se ven los nódulos como formados por un mosaico de piezas falsamente rectangulares de 2-4 mic. Las colonias se desarrollan bien sobre Sabouraud presentando aspecto membranoso, de color crema y de superficie plegada.

Los nódulos de las *pedras blancas* se diferencian de los que forman las *pedras negras* en el color más claro, en la consistencia cremosa y en la ausencia de ascosporas.

T. PULLULANS

Se desarrolla con preferencia a bajas temperaturas. Muchas de sus cepas estudiadas proceden de la parte norte de Europa, aisladas de exudados de árboles o de pulpa de madera.

Hay dos especies fermentativas: *T. fermentus* y *T. behrendii*, ambas fueron aisladas de tenerías y de exudados de árboles y de pasta de madera.

Gen. **GEOTRICHUM**

Sin. **Oidium**

Oospora

Hongos levaduriformes que se multiplican por astrosporas u oidios, no produciendo nunca blastosporas. Producen filamentos tabicados trans-

versalmente, con tabiques poco distanciados, los cuales cuando están en un cierto período de su desarrollo disuelven la lámina media, dejándolos en libertad y constituyendo la fase *oidio*, los cuales se alargan y originan nuevos filamentos que se desarticulan a su vez. En unas especies los oidios son cuadrados, en otras, más o menos largos, de lados paralelos o curvos hacia afuera como un tonel o una semilla de calabaza, otros son

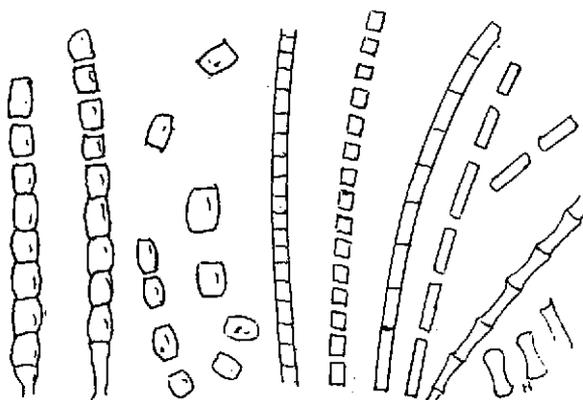


Fig. 27. *Geotrichum* u *Oidium*

más estrechos en la porción central como los artejos de la caña de bambú.

En la Micología humana es ya aceptado el nombre *Geotrichum*, en la Fitopatología se usa aún el de *Oidium*, en la industria de los alimentos se usan indistintamente el de *Oosfera* o el de *Geotrichum*.

GEOTRICHUM LACTIS (*Oospora lactis*).

Hongo filamentoso formado por un micelio de hifas gruesas, ramificada unas veces y otras no, pero siempre tabicado muy apretadamente originando oidios muy cortos, casi cuadrados. Esta especie, a pesar de ser muy pobre en enzimas, es proteolítica y lipolítica. Cuando se cultiva en agua de levadura con glucosa puede llegar a producir algo de alcohol.

Se encuentra universalmente en la Naturaleza sobre restos vegetales en descomposición.

Se desarrolla bien sobre productos de lechería, sobre todo en leches ácidas recubriendo la superficie de un fieltro blanco al principio y amarillento después. También puede desarrollarse sobre mantequilla a la cual le comunica un gusto a rancio muy desagradable. Algunas veces se ha encontrado impurificando la levadura alta de cervecerías.

G. SUAVEOLENS.

Se ha encontrado en uvas y otras bayas. En su metabolismo origina un olor aromático de acetato de amilo.

Gen. **NECTAROMYCES**

Se encuentra en el néctar de las flores en el que produce unas típicas formas gamadas «formas en aeroplano», constituídas por grupos de 3-6 células con los extremos ojivales, engarzadas de tal forma que parece un aeroplano con las alas extendidas. GRUES, que ha estudiado estas levaduras detenidamente, opina que estas formas se forman cuando la levadura

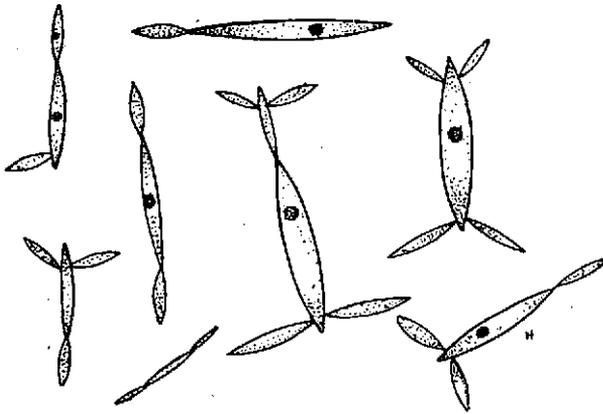


Fig. 28. *Nectaromyces*. Formas características en aeroplano. Según Henrici

está en un medio de poco valor alimenticio; en los medios ordinarios y en condiciones normales las células son redondeadas y tienen la forma de yemas corrientes, pero si a estos medios se les va disminuyendo la concentración de sustancias alimenticias van apareciendo las formas aeroplano. NADSON y KRASSILNIKOVA, como consecuencia de detenidos trabajos sobre este particular, opinan que estas formas no son más que mutaciones producidas por adaptación al medio.

Gen. **RHODOTORULA** Harrison

Levaduras de células aisladas que no difieren en nada morfológicamente de las del gén. *Cryptococcus* pero en cambio éstas tienen la propiedad de formar una materia colorante de tipo carotenoide que les comunica

color rojo o amarillo, de aquí el nombre de torulas rojas con que se las conoce vulgarmente.

Se encuentran muy abundantes en la Naturaleza, sobre todo en el aire en donde se recuentan en un 47 % de las especies de levaduras aisladas de él.

R. glutinis. Es una especie de células grandes que asimila los nitratos.

R. tesensis y *R. peneaus* lo mismo que *R. marina* han sido aisladas de camarones por PHAFF y col., producen todas un pigmento amarillo.

R. macerans fue aislado en Dinamarca del enriado de lino y está relacionada con la hidrólisis de la pectina, según FREDERIKSEN en 1956.

MEDIOS DE CULTIVO
Y
REACTIVOS COLORANTES

Medio de Czapek-Dox-Agar

Sacarosa.	30 grs.
Nitrato sódico.	2
Fosfato bipotásico	1
Sulfato magnésico crist.	0,5
Cloruro potásico	0,5
Sulfato ferroso crist.	indicios
Agar	15
Agua corriente c.s.p.	1.000

Se disuelve el agar en la mitad del agua y todas las demás sustancias en el resto; se filtra en caliente por papel en embudo de filtraciones en caliente o en un embudo que tenga una placa perforada en el fondo sobre la que se pone una capa de algodón hidrófilo. Se reparte en tubos de ensayo y se esteriliza a 110° durante 20 minutos.

Para trabajos ordinarios no es necesario que los medios queden muy transparentes.

Medio de Sabouraud

Peptona	20 grs.
Miel	80.
Agar	20
Agua corriente c.s.p.	1.000

Ajustar el pH a 6,5 y esterilizar en caliente a 110° durante media hora.

Líquido de Raulin

Acido tartárico	2,5	grs.
Tartrato amónico.	2,5	
Fosfato amónico	0,4	
Carbonato potásico	0,4	
Carbonato magnésico	0,3	
Sulfato amónico	0,2	
Sulfato de zinc	0,04	
Sulfato ferroso	0,05	
Silicato potásico	0,05	
Glucosa	45,00	
Agua c.s.p.	1 000,00	

Esterilizar a 110° durante quince minutos.

Medio de Patata-agar

Patatas	250	grs.
Glucosa	10	
Agua c.s.p.	1.000	

Las patatas peladas y troceadas se dejan hervir durante una hora; se decanta el líquido y se completa a un litro. Se añade la glucosa y el agar, se filtra en caliente, se reparte y se esteriliza a 110° durante 15 minutos. Para conservar cepas se usa sin filtrar.

Mosto de cerveza lupulado

Cebada lavada se coloca sobre un papel de filtro mojado y se mantiene en una estufa a 20° hasta que la raicilla empieza a desarrollarse y tiene medio centímetro de larga. Se eleva la temperatura de la estufa a 30-35° para que se deseque y entonces se muelen los granos en un mortero (malta). Se diluyen 200 gramos de malta en un litro de agua fría y se eleva paulatinamente la temperatura a 60°, en la que se mantiene durante 45 minutos; se añade 4 grs. de lupulo y se hierve durante una hora, se deja enfriar y se titula con Fheling la riqueza en maltosa, añadiendo agua hasta que la concentración de dicho azúcar sea de 3%; se esteriliza a 120° y se reparte en tubos o matrascitos.

Mosto de cerveza gelatinado

A un litro de mosto lupulado se añade una clara de huevo homogeneizándola con cuidado por toda la masa. Se eleva lentamente la tempe-

ratura hasta 90°. Se añade entonces 100 grs. de gelatina cortada en trozos y se deja hervir hasta que la clara se coagule y precipite (5 minutos). Se filtra a través de franela y se esteriliza a vapor fluente durante 20 minutos dos veces con intervalo de 24 horas.

Mosto de cerveza-agar

Se prepara igual que el anterior.

Agua de levadura

Se toman 200 grs. de levadura y 5 grs. de clara de huevo desecada, se agitan con 2 litros de agua corriente. La mezcla se deja en reposo hasta que se haya disuelto la gelatina de huevo. Se calienta en autoclave a 120° durante 10 minutos. Se filtra en caliente, se ajusta el pH a 6, se enfría en el frigorífico y se clarifica por filtración en frío.

Se esteriliza durante 15 minutos a 110°.

Medio de Hansen n.º 2 (para levaduras)

Peptona	1 gr.
Fosfato de magnesio	0,3
Maltosa	5
Agua	100

Se esteriliza a 110° durante 15 minutos.

Medio de Hansen n.º 1

Peptona	1 gr.
Glucosa	5
Fosfato de potasio	0,3
Sulfato magnésico	0,2
Agua	100

Medios para provocar la esporulación.

Agar de Gorodkowa

Extracto de carne	3 grs.
Cloruro sódico.	5
Glucosa	2,5
Agar	15
Agua dest. c.s.p.	1.000



Se disuelve el agar en el autoclave a 110° durante 10 minutos; se añaden las otras sustancias; se filtra en caliente a través de algodón, se reparte en tubos y se esteriliza a 110° durante 10 minutos.

(*) **Agar de Klein**

Triptosa	0,25 %
Glucosa	0,062 %
Cloruro sódico.	0,062 %
Acetato sódico.	0,5 %
Agar bacter.	2 %

Incubar a 25° o a 17°.

(*) **Agua de levadura glicerizada**

Agar-agua de levadura	95 grs.
Glicerina	5

Incubar a 25° o a 17°.

REACTIVOS COLORANTES

Azul de algodón (para coloraciones vitales)

Azul de algodón C ₁ B	1 gr.
Fenol.	20
Acido láctico	100

Este colorante tiñe bien en frío y sin previa fijación tanto los hongos como las bacterias. Al mismo tiempo que como colorante se emplea como líquido de montaje para el estudio en vivo.

Rodamina de Oppenorth (para teñir levaduras muertas)

Rodamina B	0,20 grs.
Agua destilada	100

(*) Ver SANTA MARÍA, J., *Nuevos métodos de esporulación de levaduras*, An. Inv. Agronómicas, vol. V, n.º 2, pág. 171 (1916).

Se coloca en el porta una gota del reactivo y con la aguja de platino se mezcla un poco del cultivo de levadura quedando teñidas solamente las células que estén muertas. El número de células no coloreadas que no se reproducen es sólo un 9 % de las no coloreadas (vivas).

La fórmula siguiente se funda en el mismo principio pero el error es más grande ya que el número de células *muertas no coloreadas* es de 34 % del total de las no colorcadas (vivas).

Azul de metileno de Fink Kuhle

(para teñir células muertas de levaduras)

Azul de metileno	0,05 grs (5)
Fosfato monopotásico.	7,00
Fosfato disódico.	1,00
Agua destilada	200

Ajustar el pH a 4,6.

Las células muertas se tiñen de azul, las vivas quedan incoloras.

Estos dos reactivos sirven también para determinar la vitalidad de los lactobacilos contenidos en los botes de conserva y poder orientarnos en la vigilancia de una buena esterilización.

TINCION DE ESPORAS

Método de Shaeffer y Fulton al verde malaquita

Sol. acuosa verde malaquita al 5 %

Sol. de fuchina fenicada

Fijado el material mediante el calor sobre un porta se cubre con la sol. de verde malaquita calentando hasta desprendimiento de vapores durante 10 minutos, se lava con agua corriente y se colorea con fuchina fenicada diluída al 1 : 10 durante 2 minutos. Las esporas se colorean de verde y las formas vegetativas de rojo.

Método de J. H. Shimwell

Este método varía del anterior en que el colorante de contraste es la safranina en vez de la fuchina fenicada.

TINCION DE ASCOSPORAS

Método de Kufferath

Está basado en la propiedad de la membrana de las ascosporas de ser por una parte ácidofilas y por otra alcohol-ácido resistentes.

Hacer el frotis extendiendo una emulsión de la colonia con una gota de agua destilada sobre un porta-objetos bien desengrasado, agitando con una pipeta fina mientras se deseca, sobre una platina caliente o sobre una llama.

Coloración con fuchina fenicada de Ziehl calentando hasta ebullición (o en frío durante 30 minutos).

Lavado con agua abundante.

Diferenciar metiendo la preparación en alcohol clorhídrico al 1 % durante algunos segundos o mejor en alcohol láctico al 2 %.

Lavado con agua abundante.

Coloración de contraste con azul de Nilo al 1 % durante 30 segundos.

Lavar, escurrir y añadir una gota de tinta china diluída, seca y

Montar en bálsamo.

MONTAJE

DE

PREPARACIONES MICROSCOPICAS

Lactofenol de Amann

Acido láctico	1 gr.
Fenol	1
Agua destilada	1
Glicerina	2

Este líquido tiene la ventaja de que es muy aclarante sin modificar la forma ni el volumen de los elementos. Hincha a su tamaño normal los materiales secos.

Cloral lactofenol de Amann

Hidrato de cloral crist.	2 p
Fenol crist.	1 p
Acido láctico	1 p

Este reactivo aclara más que el anterior.

PREPARACIONES DURADERAS

Goma al cloral de C. Faure

Hidrato de cloral	50 grs.
Goma arábica blanca	30
Glicerina.	20
Agua destilada.	50

Disolver el cloral en agua, añadir la glicerina y disolver la goma en una muñequilla de tela.



NOTA BIBLIOGRÁFICA

- ADAMS, A. M.—A comparative study of ascospore formation by 43 Yeast cultures. *Canad. J. Res. Sect. F.* 28, 413, 16 (1950).
- ALMEIDA, F. and LACA, C. de SILVA.—Nova tecnica para a demonstracao rapida dos ascosporos. *Folio clin. bid. S. Paulo*, 12, 129-30 (1940).
- CANTARELLI, C.—*Inst. Ind. Agrarie* (Parrigia) (1953).
- CASTELLI, T.—*Arch. Microbiol.* (1943).
- CASTELLANI, A.—Fungi and Fungous Diseases. *An. Medid. Assoc. Chicago* (1918).
- CHANCE, B.—*The Mecanism of Enzyme Action* (W. B. Mc. Ebroy and B. Glass), ed. J. Hopkins Press, Baltimore, 1954.
- CONANT, N. F.—The taxonomy of the anascospores yeast-like fungi. *Micopatologia* (1940).
- DIKENS, F.—Yeast fermentation *Bioch. Jour.* 32 (1938), 1645.
- FERKIN-SAHIRO.—*Jour. Fermentation Techno. Japon* 31-1 (1955).
- GUILLIERMOND, A.—*Ann. Sscien, Natur.* (1914).
- GUILLIERMOND, A.—*Les Levures.* Doin, París, 1912.
- GUILLIERMOND, A.—Clef dicotomique pour la determnation des levures. *Francois. París*, 1928.
- GALLOWAY, L. D. y R. BURGES.—*Applied mycology and Bacteriology.* Leonard Hils, 1946.
- HAMMER, C.—*R. Lab. Carlsberg* 1902.
- HENRICI, A. T.—*Molds. Yeast and Actinomycetes.* John Wiley and Inc. N. Y. 1930.
- JÖRJENSEN, A.—*Microbiología de las Fermentaciones Industriales.* Traducida por Federico Klein. Ed. Acribia, Zaragoza, 1959.
- LANGERON, M.—*Precis de Micologia.* Masson et Cie París, 1945.
- LODDER, J.—*Die anaskosporogen hefen.* Kon. Abad. Verhand (1934).
- LODDER, J. SLOOFF, W. Ch. and KREGER-VAN RIJ, N. J. W.—Edited by A. H. Cook. Academic Press Inc-Publishers-New York, 1958.
- NEGRON, P.—*Morfología y Biología de los hongos Técnica micológica.* «El Ateneo», Buenos Aires, 1938.
- SABOURAUD, R.—*Diagnostic et traitement des afecctions du cuir chevelu.* Masson et Cie. París, 1932.
- SCHOEN, M.—*The problem of fermentation.* Chapman and Hall Ltd. (1928). L.
- SHIMWELL, J. L.—A simple staining method for detection of ascospores in yeast cultures. *Canad. J. Res. Sect.* 28, 413-16 (1950).
- SMITH, George.—*An introduction to industrial mycology.*—Ed. van Arnold and Colld, 1947.
- STELLING-DEKKER, N. M.—*Die Sporogen Hefen.* Anst. 1954.
- VERNA, Luis, C. y HERRERO, F. J.—*Micología.* «El Ateneo», Buenos Aires, 1952.
- VUILLEMIN, P.—*Les champignons parasites et mycosis de l'homme.* Masson. París.

La determinación volumétrica de sulfatos

Método quelométrico rápido aplicable a las aguas naturales

POR

J. HERNANDEZ CAÑAVATE

Catedrático de Escuela de Comercio

I

OBJETO DEL TRABAJO

La determinación de sulfatos en las aguas naturales con vistas a conseguir un método rápido y preciso a su vez, de tipo volumétrico que pueda competir en exactitud con el gravimétrico, ha sido objeto de prolija literatura científica.

Por ello intentamos con el presente trabajo la solución de este problema fundándonos en los métodos quelométricos de tan reciente aplicación en el Análisis y en el hecho de que, de momento, no existen de adsorción apropiados.

El estudio de la bibliografía científica sobre el tema de la determinación volumétrica de sulfatos, que muy dispensa hemos revisado casi en su totalidad, nos ha llevado a la conclusión de que los métodos rápidos propuestos son más bien aplicables al caso de sulfatos puros que a un problema de tipo especial como el que supone el agua, en la cual están presentes una variedad de iones extraños al sulfato; y en ello consiste la principal dificultad del método volumétrico cualquiera que sea su fundamento, ya que es difícil conciliar la eliminación de interferencias con la rapidez del método.



En el presente trabajo presentamos primeramente un estudio descriptivo de los principales métodos volumétricos clásicos encontrados en la bibliografía, incluyendo en algunos casos la crítica de los mismos; además incluimos algunos métodos especiales, potenciométricos, conductimétricos, polarográficos y amperométricos, aunque algunos de estos últimos no sean propiamente volumétricos.

Los métodos quelométricos figuran en apartado especial en una descripción más detallada y también puesta al día desde el punto de vista bibliográfico y con alguna observación personal que pueda ser de importancia, en relación con el método que proponemos.