

870127

2  
cej

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA**

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



FALLA DE ORIGEN

IMPORTANCIA DEL HALLAZGO E IDENTIFICACION DE  
LEVADURAS EN DIFERENTES MATERIAS PRIMAS Y FORRAJES

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ADRIANA SOCORRO GALLEGOS FIGUEROA

ASESOR. Q.F.B. ARACELI ESCOBEDO M.

GUADALAJARA, JAL. MARZO DE 1995

FALLA DE ORIGEN  
EN SU TOTALIDAD



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**" IMPORTANCIA DEL HALLAZGO E IDENTIFICACION  
DE LEVADURAS EN DIFERENTES MATERIAS  
PRIMAS Y FORRAJES."**

**Adriana S. Gallegos Figueroa.**

## INDICE

Introducción .....	1
Generalidades .....	4
Materiales y Métodos .....	28
Resultados .....	47
Análisis de Resultados y Comentarios .....	56
Conclusiones .....	61
Apéndice I .....	64
Apéndice II .....	69
Bibliografía .....	75

## 1. INTRODUCCION

## INTRODUCCION.

Debido a la gran importancia que tienen los forrajes en la alimentación animal, y por el hecho de que las levaduras pueden enriquecer o descomponer dichos forrajes, se justifica la realización de la presente investigación, que pondrá de manifiesto el tipo de levaduras presentes en estos productos de consumo animal.

Las levaduras son microorganismos cosmopolitas que al estar presentes en los forrajes resultan de gran interés en la alimentación animal, sin embargo; la atención se ha enfocado hacia el grupo de hongos productores de toxinas.

Posiblemente, ésta también sea la razón por la que no está bien definida la metodología que debe seguirse para el aislamiento e identificación de las levaduras a partir de productos de consumo animal. A lo anterior, hay que añadir las dificultades tecnológicas que se le pueden presentar al investigador, ya que el alto grado de sofisticación de los recursos tecnológicos no ha ido aparejada a una difusión suficiente de los mismos, por lo que "muchos centros de investigación carecen de ellos".

## OBJETIVOS

- 1.- Demostrar la presencia de levaduras como contaminantes de materia prima y forrajes.
- 2.- Establecer la frecuencia y el grado de contaminación de estos productos.
- 3.- En base a la identificación del género llevada a cabo, determinar si se trata de levaduras patógenas o inocuas.
- 4.- Realizar la descripción morfotaxonomica de las levaduras como base para la identificación genérica.

En este trabajo las limitaciones arriba mencionadas impidieron llegar a la identificación de las especies de las levaduras aisladas, pero la identificación inequívoca del género proporciona datos valiosos del tipo de levadura presente en la materia prima y los forrajes examinados.

FALLA DE ORIGEN

Es interesante señalar que a partir de los hallazgos de la presente investigación, es posible establecer inferencias e hipótesis que sirvan como base para nuevas investigaciones. Dichos comentarios son efectuados en la parte final de esta tesis, donde también son sugeridas futuras líneas de investigación.

FALTA DE ORDEN

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 FORRAJES

- 2.1.1. Concepto
- 2.1.2. Importancia
- 2.1.3. Composición
- 2.1.4. Recolección y almacenamiento
- 2.1.5. Contaminación Microbiana

### 2.2. LAS LEVADURAS

- 2.2.1. Concepto y delimitación del grupo
- 2.2.2. Clasificación
- 2.2.3. Criterios para la clasificación

### 2.3. IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE LEVADURAS EN FORRAJES

- 2.3.1. Efectos adversos
- 2.3.2. Efectos benéficos

FALLA DE ORIGEN



## 2.1. FORRAJES

### 2.1.1. CONCEPTO.

Se le llama forraje a toda hierba o pasto verde o seco y diversas plantas u órganos vegetales (tubérculos, semillas, etc.), que se emplean para alimentar a los animales domésticos y especialmente al ganado. Las plantas forrajeras de mayor interés son las gramíneas (cebada, sorgo, maíz, avena, mijo) y las leguminosas (alfalfa, trébol); además remolacha y nabo. (7)

### 2.1.2. IMPORTANCIA.

La importancia de los forrajes se pone de relieve cuando se considera que la población mundial está creciendo a un ritmo mayor que el que las cosechas y ya, a corto plazo, se está viendo la amenaza del hambre en diversos pueblos del mundo.

Se ha dicho que "en cualquier parte del mundo, el aspecto de la tierra refleja fielmente la cultura del pueblo que vive sobre ella". A dicho aspecto contribuye la agricultura racional que implica el uso de forrajes para el mejoramiento del suelo, además de su utilidad como alimento para el ganado.

En la actualidad se acepta en modo general que el principal instrumento para la formación, el mejoramiento y la conservación de los suelos, son las gramíneas y las leguminosas adaptadas a los mismos.

El beneficio que proporcionan las plantas pratenses en las rotaciones ha sido comprobado y valorado durante muchos años. Dichas cubiertas vegetales incluidas en la rotación aumentan la permeabilidad y la capacidad de retención de agua de un suelo dado. Las raíces de las plantas forrajeras desempeñan un papel importante en la granulación del suelo y esta característica a su vez, confiere al suelo resistencia contra los efectos destructores de la erosión.

Los forrajes reducen la erosión en virtud de que detienen el escurrimiento al interceptar el agua de las precipitaciones pluviales que queda suspendida entre las hojas, pudiendo posteriormente escurrir lentamente o evaporarse. Además, protege la superficie del suelo contra el efecto de balido que producen las gotas de lluvia.

FALLA DE ORIGEN

Las raíces de los forrajes mejoran la estructura del suelo al hacerlo más poroso; con lo anterior aumenta su capacidad para absorber la lluvia que cae.

Una buena cubierta vegetal afecta la temperatura del suelo evitando que éste se hiele y permitiendo así, una mejor infiltración de agua.

En todos los casos, las cosechas forrajeras determinan la presencia de una cantidad de agregados estables de más del doble de la existencia normal.

En síntesis, cuando se practica intensamente la producción agrícola de pastos y forrajes, se renueva la materia orgánica en el suelo, se evita la erosión, se impide la formación de barrancas, se mejora la estructura del suelo, resultando en que la conservación de la suelos es una oportunidad en lugar de un problema. Un resultado mesurable e importante es que se asegura y aumenta la fertilidad del suelo además del beneficio a la alimentación animal y por ende a la humana. (7)

### 2.1.3 COMPOSICION

Como los forrajes se producen principalmente para la alimentación del ganado, es necesario conocer los factores que son pertinentes para determinar su valor nutritivo.

Se requiere más alimento para satisfacer las necesidades energéticas de los animales, que para todos los demás fines juntos. La energía es una medida altamente significativa para analizar el valor nutritivo de los alimentos, pero no deja de ser importante el conocimiento de su contenido proteico y otros principios nutritivos esenciales.

Las plantas forrajeras son agentes primarios para la utilización de la energía solar, hidrógeno y oxígeno del agua, bióxido de carbono del aire, en síntesis de los principios nutritivos que pueden proporcionar energía a los animales.

El valor principal de los forrajes depende principalmente de su contenido de carbohidratos y proteínas, así como del grado en que los principios nutritivos son digeribles. Entre los componentes se encuentran:

**PROTEINAS.-** Del 85 al 90% del nitrógeno celular de las plantas forrajeras es proteína bruta, sintetizada a partir de aminoácidos. El nitrógeno de esta proteína proviene del nitrógeno del suelo y del nitrógeno simbiótico fijado a los nódulos de las leguminosas. El análisis químico de los forrajes muestra que de 3 a 25% puede ser proteína bruta.

**LIGNINA.-** La maduración afecta el valor nutritivo de los forrajes, pues durante la misma se acumulan concentraciones crecientes de fibra lignificada. Se ha comprobado que la cantidad de lignina está relacionada con la baja digestibilidad de los principios nutritivos de los alimentos.

**CORBOHIDRATOS.-** Existen dos clases principales: la celulosa bruta y los extractos no nitrogenados. La celulosa bruta contiene los carbohidratos relativamente insolubles, en tanto que los extractos no nitrogenados comprenden las partes solubles: almidones, azúcares y especies que los forman.

**ELEMENTOS MINERALES.-** En condiciones adecuadas de fertilización los forrajes contienen cantidades suficientes de P, Ca, y Mg para satisfacer las necesidades del ganado. Los elementos menores que necesitan los animales para su crecimiento y reproducción normales ( B, Co, Cu, Cl, I, Fe, Mn, Mo, Na, Zn ), suelen encontrarse en cantidades adecuadas para la dieta en la mayoría de los forrajes.

**AGUA.-** Es el elemento constitutivo más abundante y varía de acuerdo a la fase de maduración y el contenido de humedad del suelo.

**AGENTES TOXICOS.-** Se, Mo y Mn en cantidades tóxicas existen en algunas hierbas, pudiendo producir trastornos digestivos principalmente .

**OTROS COMPONENTES.-** Las plantas forrajeras contienen además vitaminas, hormonas y enzimas; siendo las vitaminas, las más importantes desde el punto de vista nutritivo.

El valor nutritivo de los forrajes se puede expresar en varias formas tales como: PNDT (Principios Nutritivos Digeribles Totales), energía digestible, proteína digestible, energía metabolizable, energía neta y eficacia en la utilización de los alimentos.

La calidad de los forrajes puede variar, influyendo notablemente diversos factores ecológicos relacionados entre sí, pudiendo citar: relación gramíneas/leguminosas, relación C/N, disponibilidad de elementos nutritivos principales, fertilización, humedad del suelo, radiación solar, estado de maduración, intensidad y duración del pastoreo. ( 7,10 )

#### 2.1.4 RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO.

Los dos factores más importantes en la recolección y almacenamiento de los forrajes son la conservación de la calidad y del ahorro de la mano de obra, siendo el objetivo básico tratar la cosecha desde que está en pie hasta el momento y lugar de su utilización, con un aumento mínimo de las inversiones y una reducción mínima de la calidad.

HENIFICACION.- Los forrajes destinados a la producción de heno se pueden recolectar y almacenar de 3 modos básicos: 1) en forma entera y suelta; 2) en forma empacada y 3) picados o cortados en trozos. Se está empezando a utilizar una cuarta forma que consiste en comprimir el heno para formar bloques o pastillas.

El almacenamiento del heno cuando está en pacas o picado es conveniente hacerlo en almacenes bajos, ya que así se facilita su utilización, automática o manual. Se puede desecar haciendo circular aire en el henil o local del almacenamiento. En tiempo húmedo la desecación puede prolongarse facilitando el desarrollo de mohos.

ENSILAJE.- Es frecuente en América picar el forraje para poder moverlo con corriente de aire, facilitar su compresión para eliminar el aire y facilitar su suministro a los animales. El almacenamiento del ensilaje puede hacerse en silos cilíndricos verticales o en zanjas horizontales excavadas en el suelo o en la ladera de un cerro. En casos de forrajes con contenidos variables de humedad, el almacenamiento se hace en locales completamente impermeables a gases.

Se han hecho muchos estudios sobre la eficacia relativa de los diversos métodos de recolección de los forrajes. Estos estudios han conducido a un uso cada vez mayor del ensilaje como medio de conservación de las cosechas de gramíneas y leguminosas.

La calidad del ensilaje depende de diversos factores. Los mohos se desarrollan cuando no se excluye bien el aire. Los olores fuertes tal vez no desagraden al animal, pero pueden transmitir un sabor desagradable a la leche y otros productos. Los olores fuertes a ácido butírico, amonio o humedad del ensilaje, indican grandes pérdidas de principios nutritivos. La humedad del ensilaje, disminuye el valor nutritivo por kilogramo de peso, además de la pérdida de dichos principios por drenaje. En los ensilajes de buena calidad, el pH es de 4.5 o menos, el contenido de nitrógeno amoniacal es bajo, el de ácido butírico es pequeño o nulo y el contenido de ácido láctico es de 3 a 13% en materia seca. (7)

#### 2.1.5 CONTAMINACION MICROBIANA

Dado que existe poca información sobre contaminación de los forrajes por diversos microorganismos, esta investigación de tesis, se ha dirigido a la identificación de los distintos tipos de levaduras que pueden contaminar los forrajes y proliferar durante su almacenamiento.

Factores como la humedad, el contacto con el aire, el pH, el tiempo y las condiciones de almacenamiento y la composición misma del forraje pueden influir sobre el desarrollo de microorganismos.

Se pretende con los medios tecnológicos disponibles, llegar al aislamiento e identificación a nivel de género, de las diversas levaduras presentes en distintas muestras de materia prima y forrajes.

Este primer paso es necesario si se quiere entender mejor el papel que desempeñan las levaduras en la alteración de los principios nutritivos, la aceleración de la descomposición de los forrajes o bien del enriquecimiento nutritivo de este alimento animal.

Con el presente trabajo se tendrá un mejor conocimiento del grado de contaminación por levaduras que tienen los forrajes. (3,14)

## 2.2. LAS LEVADURAS

### 2.2.1. CONCEPTO Y DELIMITACION DEL GRUPO.

Antes de intentar clasificar cualquier grupo de organismos vivos es necesario delimitar y definir dicho grupo; ésto, hasta hace poco tiempo, era una gran dificultad que se presentaba respecto a las levaduras ya que forman un conjunto muy heterogéneo que no es en si una entidad taxonómica natural.

A las levaduras las podemos definir como microorganismos unicelulares de forma conspicua que se reproducen por gemación y pueden producir micelio. Debido a estas características, las levaduras son consideradas dentro del grupo de los hongos (Reino Fungi, División Eumycota).

Cabe señalar que no todas las levaduras cumplen estrictamente con estos rangos, como es el caso de los géneros *Starigmatomyces* y *Schizosaccharomyces* que no se reproducen por gemación y también se hace necesario mencionar que estos microorganismos pueden ser hialinos o presentar pigmentos que van del amarillo al rojo o café y que algunos tienen la capacidad de producir formas resistentes que ayudan a la supervivencia del organismo.

Las levaduras se clasifican en cuatro grupos diferentes:

Primer grupo: Incluye a las levaduras que forman ascos y ascosporas y que por ello pertenecen a los *Ascomycetos*.

Segundo grupo: Comprende dos géneros que debido a sus ciclos de vida se incluyen en el orden Ustilaginales dentro de los *Basidiomicetos*.

Tercer grupo: Compromete a los organismos levaduriformes que se caracterizan por la formación de balistosporas a la manera de los hongos clasificados en la familia *Sporobolamycetaceae* que pertenecen a los *Basidiomicetos*.

Por último el cuarto grupo: Considera a todos aquellos géneros de levaduras a los que no se les ha descubierto reproducción sexual y que por ello se incluyen dentro de los *Fungi Imperfecti* o *Deuteromicetos*. Es necesario aclarar, sin embargo, que a algunos de estos géneros se les ha observado una muy estrecha relación con las levaduras que pertenecen a los *Ascomycetos* y *Basidiomicetos*.

Como cabría esperar de un grupo taxonómico artificial, existen varios géneros levaduriformes dudosos o que se encuentran en los límites de la definición antes mencionada. Por ejemplo: el género *Endomyces* es morfológicamente parecido a *Schizosaccharomyces* y a algunas especies de *Endomycopsis*, pero no es considerado levadura.

Otro ejemplo lo tenemos con ciertos hongos filamentosos patógenos para hombres y animales que se caracterizan por un crecimiento levaduriforme en los tejidos infectados del huésped y por ello se conocen como hongos dimórficos. A este grupo pertenecen los géneros *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Sporotrix* y *Paracoccidioides*.

Resumiendo, es siempre necesario estar enterados de cuáles cultivos, en los que aparecen levaduras, pudieran ser formas de hongos perfectamente conocidos; ya que es bien sabido que bajo condiciones especiales muchos hongos pueden propagarse por gemación.

Los principales rasgos utilizados para la clasificación de las levaduras han sido los morfológicos, y en menor grado los genéticos. El taxón más importante, la especie, se basa en las similitudes entre cepas.

Desde 1952 se han publicado una gran cantidad de clasificaciones para las levaduras, pero para llegar a un sistema de clasificación satisfactorio es necesario hacer uso de los resultados de muchas clases de técnicas para estudiar las diferencias en estos organismos. Es por ello que la clasificación aquí propuesta está sujeta a futuros cambios. (8)

## 2.2.2 CLASIFICACION

La clasificación más perfecta es la natural, o sea la clasificación basada en la filogenia de los organismos; sin embargo, como ya se dijo, ello no es posible para las levaduras porque se carece de tal información.

La siguiente clasificación, por lo tanto, puede ser considerada como un simple paso hacia el desarrollo de un sistema clasificatorio mejor.

Las levaduras están divididas en cuatro grupos, que son:

- I.- Las levaduras que pertenecen a la subdivisión *Ascomycotina*.
- II.- Las levaduras de los géneros *Leucosporidium* y *Rhodosporidium* que se incluyen en el orden *Ustilaginales* dentro de la subdivisión *Basidiomycotina*.
- III.- Los géneros levaduriformes pertenecientes a la familia *Sporobolomycetaceae*, también dentro de la subdivisión *Basidiomycotina*.
- IV.- Las levaduras a las que no se les ha observado reproducción sexual y que por ello pertenecen a la subdivisión *Deuteromycotina* o *Fungi Imperfecti*.

El Cuadro 2.1 presenta la clasificación del Reino Fungi que ayudará a ubicar a las levaduras dentro del grupo de los hongos. ( 8 )

( 1 ) Las levaduras que pertenecen a la subdivisión *Ascomycotina*.

Las levaduras ascógenas o formadoras de ascos son los microorganismos más primitivos dentro de la subdivisión *Ascomycotina*, se les ha ubicado dentro de la clase *Hemiascomycetes*, en el orden *Endomycetales*.

El orden *Endomycetales*, entonces, es el que abarca a los organismos más primitivos formadores de ascos en donde ni la forma del ascos ni el número de ascosporas están definidos, la única condición es que la pared del ascos se rompe para dejar libres las ascosporas.

Es oportuno explicar que en este orden los gametangios no están diferenciados y que la reproducción sexual se efectúa por copulación gametangial a través de la formación de un tubo de conjugación simple.



CUADRO 2.1  
REINO FUNGI

DIVISION	SUBDIVISION	CLASE
EUMYCOTINA	PHYCOMYCOTINA	CHYTRIIDIOMYCETES HYPHOCHYTRIIDIOMYCETES OOMYCETES ZYGOMYCETES TRYCHOMYCETES
	DEUTEROMYCOTINA	*BLASTOMYCETES HYPHOMYCETES COELOMYCETES
	ASCOMYCOTINA	*HEMIASCOMYCETES EUASCOMYCETES LABOULBEMIOMYCETES LOCULOASCOMYCETES
	BASIDIOMYCOTINA	*HETEROBASIDIOMYCETES HOLOBASIDIOMYCETES
MIXOMYCOTINA		

(Ulloa, M. Y Hanlin, R./1978)

\* Clases que incluyen los géneros de levaduras.

La reproducción vegetativa o asexual se realiza por gemación y en el caso especial del género *Schizosaccharomyces* por fusión binaria.

El orden *Endomycetales* tiene cuatro familias:

1.- *DIPODASCACEAE*. Hongos formadores de micelio verdadero. Esta familia no incluye ningún género levaduriforme.

2.- *ENDOMYCETACEAE*. Hongos que presentan ascos que generalmente contienen 8 esporas o menos. No se ha definido totalmente la inclusión del género levaduriforme *Endomycopsis*.

3.- *SACCHAROMYCETACEAE*. En esta familia, las células vegetativas se reproducen por gemación, se separan y aunque pueden formarse hifas, éstas se rompen fácilmente. Presentan una habilidad relativamente marcada para fermentar azúcares. Comprende 4 subfamilias:

SCHIZOSACCHAROMYCOIDEAE

NADSONIOIDEAE

SACCHAROMYCOIDEAE

LIPOMYCETOIDEAE

4.- *SPERMOPOTORACEAE*. Comprende organismos levaduriformes haploides, con hifas aceptadas, esporangiosporas que pueden copular y formar micelio diploide. Este micelio es generalmente unicelular y pueden producirse de 9 a 12 ascosporas en forma de huso.

En la figura 2.2. se presenta el orden *ENDOMYCETALES* mostrando las familias, subfamilias y géneros de levaduras que ahí se clasifican.

Las características particulares de cada género serán mencionadas más adelante a manera de clave.

( II ) Las levaduras de los géneros *Leucosporidium* y *Rhodospordium* que se incluyen en el orden *Ustilaginales* dentro de la subdivisión *Basidiomycotina*.

El segundo grupo comprende sólo dos géneros *Leucosporidium* y *Rhodospordium*. Estas levaduras pertenecen a la subdivisión *Basidiomycotina* dentro de la clase *Heterobasidiomycetes*, en el orden *Ustilaginales*.

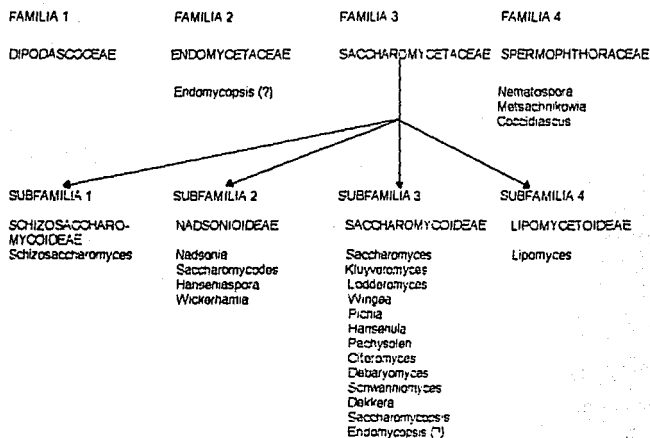
Los diferentes autores no concuerdan en incluir o excluir a estos dos géneros en la familia *Ustilaginaceae*.

**CARACTERISTICAS DEL ORDEN USTILAGINALES:**

- a) Forman teleutosporas intercalares.
- b) Las basidiosporas que produce la teleutospora al germinar no son llevadas sobre esterigmas, no se forman en cantidad definida y no sufren descarga violenta.
- c) Carecen de basidiosporas.
- d) Tienen micelio dicariótico y fibulas comunmente.

FIGURA 2.2.

Orden **ENDOMYCETALES** mostrando familias, subfamilias y géneros de levaduras ascógenas.



NOTA: El género *Endomycopsis* no tiene definida su ubicación y por ello se incluye en la familia ENDOMYCETACEAE y en la subfamilia SACCHAROMYCOIDEAE. ( 8 )

( III ) Los géneros levaduriformes pertenecientes a la familia *Sporobolomycetaceae* dentro de la subdivisión *Basidiomycotina*.

Los *Sporobolomycetaceae* constituyen una pequeña familia de hongos simples, levaduriformes, que producen conidios sobre esterigmas. Estos conidios tienen la característica de ser descargados violentamente y por ello se conocen como balistosporas. Algunas especies no forman micelio permaneciendo así durante todo su ciclo de vida, mientras otras producen hifas constituidas por células binucleadas que llevan fibulas. Algunos de estos caracteres muestran su vinculación con los basidiomicetos, de ahí la actual clasificación.

La familia incluye 5 géneros de los cuales solo 3 permanecen levaduriformes todo su ciclo vital, no tienen crecimiento filamentosos y presentan gemación. Estos géneros son:

*Sporobolomyces*

*Bullera*

*Sporidiobolus*

La clasificación de la familia *Sporobolomycetaceae* dentro de los *Basidiomycotina* es incierta ya que es necesario un mejor conocimiento de sus ciclos de vida y algunos rasgos de su reproducción sexual desconocidos hasta el momento.

( IV ) Las levaduras que pertenecen a la subdivisión *Deuteromycotina* o Levaduras Imperfectas.

Son doce los géneros de levaduras a las que no se les ha observado reproducción sexual y donde tampoco se ha encontrado formación de balistosporas. Las levaduras de este grupo se conocen como asporógenas, por tal característica, su reproducción y propagación ocurre única y exclusivamente de manera asexual (por gemación o fisión).

Este es un grupo muy heterogéneo cuya clasificación ha sido difícil, de ahí que se les coloque en la subdivisión *Deuteromycotina* en la clase *Blastomycetes*. Los géneros aquí incluidos son:

*Bretanomyces*

*Cándida*

*Cryptococcus*

*Kloeckera*

*Cosporidium*

*Rhodotorula*

*Schizoblastosporion*

*Torulopsis*

*Trichosporon*

*Trigonopsis*

Existen otros dos géneros de los cuales es necesario hablar en forma separada: *Pityrosporium* y *Sterigmatomyces*.

Sobre el género *Pityrosporium* hay que señalar que en la actualidad ya no es válido ya que recientes publicaciones lo presentan definitivamente como sinónimo del género *Malassezia*, un hongo deuteromiceto que pertenece a la clase Hyphomycetes.

Del género *Sterigmatomyces* hay que decir que su clasificación permanece incierta dentro de la subdivisión Deuteromycotina ya que su reproducción vegetativa es diferente al resto de las levaduras asporógenas incluidas en el orden Cryptococcales.

Por último, es necesario mencionar que existen similitudes entre géneros de los deuteromicetos y los ascomicetos, llegando a veces a ser casi idénticos, con la única diferencia de que los segundos presentan reproducción sexual de la que carecen los primeros. Por ejemplo: el género *Brettanomyces* es equivalente a *Debckera* y el género *Kloeckera* lo es a *Hanseniaspora*. ( 8 )

### 2.2.3 CRITERIOS USADOS PARA LA IDENTIFICACION. (8)

El actual sistema taxonómico de las levaduras es resultado del desarrollo y subsecuente integración de 3 diferentes vías de investigación y clasificación que se han efectuado con estos microorganismos.

Estos puntos de investigación se basan en la observación de: las características morfológicas de la célula (forma celular y modo de reproducción vegetativa), las características fisiológicas (como lo es la habilidad para fermentar carbohidratos) y las características de la reproducción sexual junto con sus ciclos de vida.

Los siguientes son los criterios actualmente aplicados en la clasificación de las levaduras:

#### A. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

- 1.- Características de las células vegetativas.
- 2.- Características de la reproducción vegetativa.

#### B. CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO.

- 1.- Crecimiento en medios líquidos.
- 2.- Crecimientos sobre medios sólidos.

#### C. CARACTERÍSTICAS DE LA REPRODUCCION SEXUAL.

- 1.- Características de los ascos y ascosporas.
- 2.- Características de las teliosporas y esporidios.

#### D. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.

- 1.- Utilización de compuestos de carbono.
  - a) Utilización por fermentación.
  - b) Utilización oxidativa.
  - c) Desdoblamiento de arbutina.
- 2.- Utilización de compuestos de nitrógeno.
- 3.- Crecimiento en medios sin vitaminas.
- 4.- Crecimiento en medios de alta presión osmótica

- 5.- Crecimiento a altas temperaturas.
- 6.- Producción de ácido
- 7.- Producción de compuestos amiloides extracelulares.
- 8.- Hidrólisis de urea.
- 9.- Desdoblamiento de grasas.
- 10.-Formación de pigmento.
- 11.-Producción de éster.
- 12.-Resistencia a la cicloheximida (actidione).
- 13.-Licuefacción de gelatina.

Es necesario aclarar que no se requiere estrictamente de todos los criterios para llegar a la identificación del género, pero sí de la especie.

La metodología con la que se puede observar cada una de las características será descrita más adelante en el capítulo 3.



### 2.3. IMPORTANCIA DE LA PRESENCIA DE LEVADURAS EN FORRAJES.

En este apartado se hará referencia a la importancia que tiene la presencia de levaduras en materia prima y alimentos que se pueden considerar forrajes. Así pues, recordando que el término forraje incluye productos diversos como cereales, leguminosas y oleaginosas, sobre este tipo de alimentos se hablará respecto a los efectos benéficos o adversos que les confiere la presencia de las levaduras.

Cabe señalar que hasta hace algunos años, la presencia de hongos microscópicos contaminantes ( mohos y levaduras ) en alimentos, no había sido un punto de gran importancia para el control biológico de la calidad: esto se debe, probablemente, a que el interés sobre el tema se dirigió a vigilar la calidad bacteriológica y a los problemas que se tienen con las técnicas para la investigación de mohos y levaduras.

En la actualidad se pretende regular más estrictamente la presencia de mohos y levaduras en muchos alimentos de consumo humano y animal, ya que nos encontramos frente a microorganismos que descomponen, hacen tóxicos o, en raras ocasiones, enriquecen el contenido nutritivo de estos insumos.

A. W. Anderson, en su publicación de febrero de 1977, hace mención de los estándares reguladores que sobre mohos y levaduras se están empezando a establecer en E. U. A. para controlar mejor la calidad microbiológica de varios alimentos. ( 2 )

#### 2.3.1. EFECTOS ADVERSOS.

La descomposición microbiana de alimentos y sus materias primas es un proceso competitivo que ocurre entre bacterias, mohos y levaduras.

En comparación con las bacterias y los mohos, las levaduras juegan un papel menor en la descomposición de productos alimenticios porque constituyen una población más pequeña, crecen más lentamente y no son organismos productores de sustancias tóxicas.

A las levaduras que están involucradas en el deterioro de semillas, cereales, leguminosas y de otros alimentos almacenados se les conoce junto con los mohos de este tipo, como "hongos de almacén". Este grupo se caracteriza por estar adaptado a crecer en medios de humedad relativamente baja y alta presión osmótica y por ser una de las principales causas de grandes pérdidas económicas.

Para que las levaduras sean consideradas como la mayor causa de la descomposición de cereales, leguminosas y oleaginosas almacenados es necesario que existan factores que favorezcan su desarrollo; entre estos factores podemos mencionar:

- Bajo recuento bacteriano o crecimiento bacteriano restringido.
- Tipos de levaduras presentes.
- Acidez o pH del sustrato.
- Disponibilidad de nutrientes.
- Grado de humedad del sustrato.
- Tratamiento químico que haya recibido el alimento.
- Temperatura de almacenamiento.
- Humedad relativa o actividad acuosa del medio.
- Rapidez del secado.
- Aereación.
- Presencia de insectos, polvo y desperdicios. (3,11,14)

En seguida se hace hincapié en algunos de los factores más importantes:

Tipos de levaduras presentes: Las levaduras son contaminantes comunes de los alimentos debido a su amplia distribución en la naturaleza, por ello no es raro encontrarlas en casi todos lados. Las levaduras que intervienen en la descomposición de los alimentos producirán en éstos cambios indeseables en la apariencia física así como desarrollo de olores y sabores inadecuados que vendrán a redundar en características organolépticas desagradables. Las levaduras son organismos que poseen un sistema metabólico complejo y por lo tanto son capaces de degradar una gran variedad de materiales dando como resultado la descomposición del alimento en el cual están presentes; incluso muchas especies son capaces de utilizar los ácidos orgánicos agregados como preservadores. El tipo de levadura que se encuentra como agente deteriorante en alimentos dependerá en gran parte del tipo de compuestos presentes en ellos.

Efecto de la acidez y tipo de ácido: Es bien sabido que las levaduras crecen mejor a cifras de pH bajas, en las que muy pocas bacterias son capaces. Así pues, cuando el pH del sustrato y/o del ambiente disminuyen, la población levaduriforme se favorece, teniendo crecimiento óptimo dentro del rango de pH de 4.5 a 6.5.

Cuando se ha utilizado algún ácido orgánico (como el acético, cítrico o láctico) como preservador del alimento, éste tendrá éxito en base a la combinación sal-ácido-azúcar; ya que las levaduras son capaces de asimilar dichos ácidos.

Efecto de la temperatura: Si aceptamos que un organismo psicrófilo es el que tiene una temperatura óptima de crecimiento abajo de los 20 °C, entonces muchas levaduras caen dentro de esta categoría. A excepción de las levaduras psicrófilas, la mayoría crecen mejor entre los 20° y los 25 °C y en algunos casos en el rango de 38° a 47 °C.

Es por esto que es posible encontrarlas comúnmente formando parte de la microflora contaminante de alimentos almacenados. La técnica rutinariamente utilizada en el examen microbiológico de alimentos es capaz de poner de manifiesto estos microorganismos, ya que la práctica señala incubar a temperatura ambiente ( 22 °C - 25 °C ).

Presión osmótica: La sobrevivencia y el crecimiento de todos los organismos depende de la presencia de agua en el medio ambiente. en general, las levaduras requieren de más humedad para su crecimiento que los mohos, pero menos que las bacterias. Una medida del agua disponible en los alimentos está dada por el uso del concepto de actividad acuosa (  $a_w$  ) que ha desplazado las antiguas medidas de porcentajes de sólidos que se utilizaron por mucho tiempo.

Sistemas que contienen altas concentraciones de azúcares o sales tienen valores de  $a_w$  bajos y altas presiones osmóticas y los organismos que crecen en tales sistemas se conocen como osmófilicos. Por lo tanto, podemos definir a los organismos osmófilicos como aquellos que requieren de una presión osmótica elevada para crecer y desarrollarse.

Otra definición muy diferente se tiene para los organismos que tienen la capacidad para fermentar soluciones que contienen de 60 a 75% de fructuosa, éstos son considerados por Windisch como organismos osmotolerantes y es dentro de esta clase donde mejor cabrían las levaduras.

Las especies de levaduras capaces de crecer en altas concentraciones de azúcar y que por ello eran clasificadas antiguamente dentro del género *Zygosaccharomyces*, y en la actualidad son incluidas en el género *Saccharomyces*. Estas levaduras causan la descomposición de alimentos con alto contenido de azúcares dando como resultado fermentación y producción de gas, efectos que alteran la calidad de todo alimento almacenado para futuros fines de consumo.

Hay una diferencia entre la tolerancia a sales y la tolerancia a los azúcares, porque las levaduras que desarrollan en medios con alta presión osmótica resultado de la cantidad de azúcares mas no lo hacen en medios con elevadas concentraciones de cloruro de sodio.

Para terminar con este punto, se debe recordar que las levaduras osmotolerantes no crecerán en productos con alto contenido de sustratos a menos que la exposición al aire sea suficiente para humedecer la superficie y permitir el crecimiento de los microorganismos.

Con todo lo anterior se puede concluir que debido a su capacidad de adaptación a sistemas con baja humedad y alta concentración de sólidos, especialmente carbohidratos, las levaduras son agentes importantes en la descomposición de alimentos y materia prima.

Disponibilidad de nutrientes: Como ya se vió, las levaduras son descritas en términos de sus actividades sacarolíticas preferentemente y se le ha dado poca importancia a sus propiedades proteolítica y lipolítica. Los organismos levaduriformes son capaces de atacar muchos y variados sustratos y en diferentes reportes se menciona su habilidad para atacar proteínas y lípidos.

Se sabe que aún cuando las levaduras normalmente están en pequeñas cantidades, pueden ocasionar cambios lipolíticos y proteolíticos significativos en alimentos con bajo recuento bacteriano o con crecimiento bacteriano restringido y esto tiene particular interés en semillas y forrajes almacenados ricos en proteínas y lípidos.

En resumen, las levaduras pueden ser agentes deteriorantes de alimentos y materias primas bajo condiciones específicas y los géneros que intervienen en la descomposición son seleccionadas en base al tipo de descomposición y las condiciones de almacenamiento.

La descomposición de alimentos por levaduras puede controlarse con buenas prácticas sanitarias que controlen las cargas iniciales para almacenamiento adecuado con temperatura y niveles de humedad controlados y el uso apropiado de tratamientos de desecación de agentes preservadores.

En el caso particular de los cereales, oleaginosas y leguminosas almacenados, se ha llevado a cabo un considerable número de investigaciones encaminadas a determinar la utilidad de agentes químicos en la preservación de estos productos. Los agentes antimicrobianos, idealmente deben ser: efectivos contra un amplio espectro de microorganismos, inocuos para el hombre y animales y adecuados para preservar la calidad de los alimentos. Aún no se ha encontrado un agente químico que satisfaga estas necesidades y se siguen utilizando ácidos orgánicos como el cítrico y acético con tal fin. (3, 11, 14)

### 2.3.2 EFECTOS BENEFICOS

Más que hablar acerca de los beneficios que proporcionan las levaduras a los alimentos y materias primas donde se hallan presentes, se tratará sobre la calidad nutricional propia de tales organismos y el porqué se planea utilizarlos como alimentos en el futuro. Con esto también se puede inferir que la presencia de las levaduras en diferentes alimentos, de alguna manera, los enriquece en nutrientes.

Además, no se debe olvidar que la fermentación por levaduras fué uno de los primeros métodos utilizados en la preservación de alimentos con que el hombre contó y que en la actualidad sigue siendo uno de los procesos más explotados. Como se sabe, la preservación de productos por fermentación ocurre por cambios en los sustratos iniciales debidos a la actividad metabólica de la levadura, dando como resultado disminución del pH y formación de sustancias que limiten el desarrollo de otros microorganismos. Pero durante la fermentación hay más pérdida que ganancia de factores nutricionales como carbohidratos y proteínas y por ello no se puede asegurar que un producto de la fermentación tenga mayor suplemento nutricional que la materia prima que le dió origen.

Una vez aclarado lo anterior, se circunscribirá a lo que se refiere a las levaduras y las ventajas nutricionales que representan.

Es bien sabido que el consumo de microorganismos en alimentos es incidental y fué hasta 1910, en Alemania, cuando se empezó el cultivo consciente de microorganismos para consumo humano. En esta ocasión se utilizaron levaduras cerveceras separadas de los sistemas de fermentación, lavadas y secadas. También se tiene registro que durante la Segunda Guerra Mundial se cultivó *Candida utilis* para consumo humano.

En los años 60's, la escasez mundial de proteína llevó a renovar los intentos por obtener proteína alimenticia mediante la producción en gran escala de biomasa levaduriforme cuyo contenido proteínico bruto es de alrededor del 50% en peso.

En la actualidad, el principal uso de la biomasa levaduriforme es como forraje; sin embargo, una porción significativa ya se utiliza como alimento para consumo humano.

La preferencia que se le ha dado a las levaduras como alimento se debe a su reconocida inocuidad y a lo económico que resulta su cultivo porque crecen en muchos medios y su separación del mismo.

(8,12)

Son cuatro las especies que se usan con fines alimenticios:

- Saccharomyces cerevisiae*
- Saccharomyces uvarum*
- Candida utilis*
- Kluyveromyces fragilis*

Hasta aquí se ha hablado de las levaduras como recurso alimenticio cuando son especialmente cultivadas para ello, pero también se debe tomar en cuenta que la presencia fortuita de estos microorganismos como contaminantes en alimentos que no tienen un adecuado control microbiológico (como sucede con los alimentos para consumo animal) podrían, de alguna manera, enriquecer la calidad nutricional de dicho alimento.

A continuación se hará referencia a la composición bioquímica de las células levaduriformes, observando las sustancias que hacen de ellas mejoradas de calidad nutricional cuando están presentes en alimentos.

-Proteínas	45-55%
-Nitrógeno	7,5-9%
-Ac. Nucleicos	6-12%
-Lípidos	2-6%
-Composición de Aminoácidos ( gr/16 gr. N )	
-Lisina	7,2-8,4
-Valina	5,3-6,7
-Leucina	7-8,1
-Isoleucina	4,3-5,2
-Treonina	4,7-5,2
-Metionina	1,0-1,8
-Cistina	0,6-1,6
-Fenilalanina	3,7-4,5
-Triptófano	0,04-1,4
-Histidina	2,0-3,1
-Tirosina	3,3-4,9
-Arginina	5,1-7,2

Para terminar se puede agregar que el mejoramiento nutritivo de un forraje debido a la presencia de levaduras se vería solo si estos microorganismos fueran la población dominante y no hubiera descomposición. ( 12,13 )

### **3. MATERIALES Y METODOS**

**3.1. MUESTREO Y CONSERVACION DE MUESTRAS**

**3.2. PREPARACION DEL MATERIAL**

**3.3. AISLAMIENTO Y RECuento DE LEVADURAS**

**3.4. CONSERVACION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS**

**3.5. METODOLOGIA EMPLEADA EN LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE LAS**

#### **LEVADURAS AISLADAS**

**3.5.1. Observación de las características morfológicas**

**3.5.2. Observación de las características de cultivo**

**3.5.3. Observación de las características de la reproducción sexual**

**3.5.4. Observación de las características fisiológicas**



### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. MUESTREO Y CONSERVACION DE MUESTRAS.

En la realización del presente trabajo se contó con muestras de materias primas y forrajes provenientes de cuatro forrajeras de la ciudad de Guadalajara, Jalisco. Las muestras obtenidas incluyeron diferentes tipos, tales como: granos molidos, harinas, pastas de grano, glútenes de grano, salvado de gramíneas, levadura de cerveza seca, y productos forrajeros terminados y listos para el consumo animal utilizados con diversos fines ( iniciadores de crecimiento, para la producción de leche, carne, huevo, etc. o bases para engorda ).

Las muestras corresponden en su totalidad a materiales que antes de su recolección permanecían almacenados y debido a ello, se trató de mantenerlas bajo parecidas condiciones de temperatura, aereación y luz en el laboratorio, mientras que se trabajaba con ellas.

No hubo problemas en el manejo de las muestras ya molidas; sin embargo, las muestras de productos terminados sólidos, tuvieron que ser sometidas a un leve proceso de machacamiento en un mortero estéril.

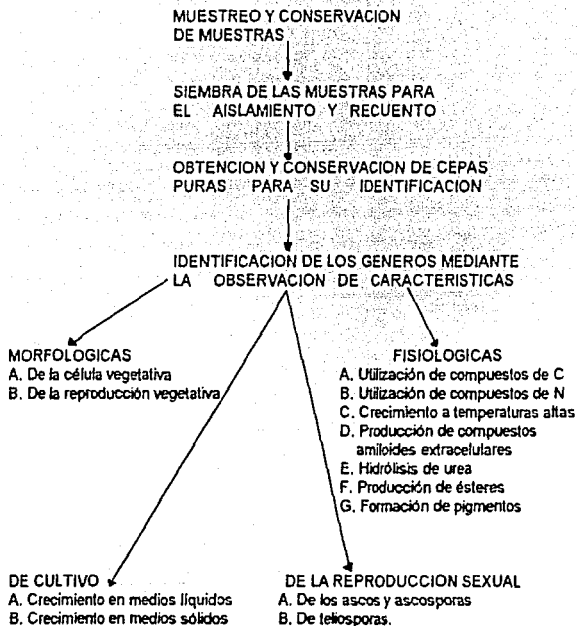
El muestreo efectuado no fué sistemático y se trabajó con las muestras que cada empresa forrajera donó para esta investigación.

#### 3.2. PREPARACION DEL MATERIAL.

Para el procesamiento de las muestras, la preparación y uso de los materiales y medios, así como la utilización de aparatos e instalaciones se contó con el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Guadalajara.

Tanto la preparación del material de vidrio, como la de los medios necesarios fué realizada personalmente conforme los requerimientos de la investigación.

**CUADRO No.3.1** DIAGRAMA DE LAS ETAPAS COMPRENDIDAS EN LA IDENTIFICACION  
 GENERICA DE LEVADURAS AISLADAS A PARTIR DE MATERIAS  
 PRIMAS Y FORRAJES



### 3.3. AISLAMIENTO Y RECuento DE LEVADURAS.

Antes de iniciar la descripción de la metodología que se llevó a cabo durante este trabajo de tesis, sería recomendable que se revisara el diagrama del Cuadro No. 3.1. que esquematiza sintéticamente cada una de las etapas de la investigación y que podría ser de ayuda en el seguimiento y fin de cada método.

Una vez aclarado lo anterior, es posible empezar a hablar sobre la forma en que se hizo el aislamiento y conteo de las levaduras a partir de las muestras.

Siempre es importante, y se debe tomar en cuenta, que para que haya una correcta identificación de las levaduras es indispensable un adecuado aislamiento a partir de las muestras y el posterior mantenimiento de las cepas puras.

Como las levaduras son microorganismos mesófilos y capaces de desarrollar sobre un amplio rango de pH, su aislamiento presentaría normalmente, poca o ninguna dificultad. Así, el aislamiento de las levaduras a partir de materiales que contengan poca cantidad de bacterias y mohos, es relativamente fácil y basta sembrar por aislamiento sobre una placa de agar-extracto de levadura (AEL) una suspensión del material a estudiar.

Sin embargo, para el aislamiento de levaduras a partir de sustratos cuya contaminación microbiana sea predominante de bacterias, de mohos o ambas, como es el caso de las muestras con las que se contó, hay que usar ciertos medios y técnicas de cultivo selectivos para las levaduras. Es por esto que se utilizaron medios acidificados (pH 3) que se incubaron a bajas presiones de oxígeno; la acidificación del medio de cultivo restringe el desarrollo de bacterias y la exclusión de aire la de mohos.

De esta manera y aprovechando estos conocimientos se llevó a cabo el aislamiento y recuento de las levaduras de las matenas primas y los forrajes. Para empezar se hizo una suspensión de la muestra (1 gr. de muestra en 10 ml. de agua destilada estéril) y tres diluciones más a partir de ella: 1:10, 1:100 y 1:1000; la suspensión inicial se sembró por aislamiento en placas de agar-extracto de levadura (AEL) y papa-déxrosa-agar (PDA), ambos acidificados y tanto la suspensión como las diluciones se sembraron con la técnica de la dilución en placas de agar-extracto de levadura acidificado.

Todas las placas; las sembradas por aislamiento y las sembradas por dilución, fueron selladas con cinta adhesiva para su incubación a 25 °C durante una semana, siendo revisadas al 3o., 5o. y 7o. días. Las placas negativas fueron dejadas una semana más antes de desecharse como negativas.

Después del procedimiento anterior y una vez que hubo crecimiento sobre los medios incubados, se revisaron todas y cada una de las colonias sospechosas de ser levaduras. Dicha revisión se llevó a cabo mediante la observación al microscopio de preparaciones en fresco y con azul de lactofenol hechas a partir de las colonias, obteniendo así las cepas de levaduras a identificar y el recuento de las mismas al ver en que dilución se obtuvo cada una.

Es necesario aclarar que las muestras fueron procesadas en lotes de 10 o 15 muestras hasta obtener todas las cepas de levaduras.

#### 3.4. CONSERVACION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS.

Para la conservación de las cepas de las levaduras aisladas se recurrió a tubos con tapón de rosca que contenían GELPA (glucosa-extracto de levadura-peptona-agar) inclinado. Así, todas las colonias que en las placas resultaron ser levaduras, fueron resembradas en estos tubos que se incubaron a 25 °C por 5 a 7 días y luego puestas en refrigeración para continuar su estudio.

Con estas cepas de levaduras se trabajó a lo largo de la investigación, teniendo cuidado en su manejo para no contaminarlas y revisándolas al microscopio y resembrándolas para evitar su envejecimiento cada 15 días. De esta forma, cada microorganismo conservó sus características sin cambios, lo cual es deseable en cualquier estudio de identificación.

### 3.5. METODOLOGIA EMPLEADA EN LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS.

A continuación se hablara sobre los métodos necesarios y los criterios usados para la identificación de levaduras.

#### 3.5.1. OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS

##### A.- Características de la célula vegetativa.

##### a) Morfología de las células vegetativas creciendo en medios líquidos o sólidos.

La forma de las células vegetativas es útil como criterio taxonómico, ya que su forma está relacionada con la manera en la que se reproducen asexualmente.

Las células pueden ser esferoidales, globosas, elipsoidales, ovoides, cilíndricas, elongadas, apiculadas, ovoides o en media luna y en algunos casos la forma misma de las células es tan característica que puede ser empleada en la identificación genérica.

La forma y tamaño de las células puede observarse tanto en medios sólidos como en líquidos y se utilizan para tal fin cultivos de levaduras desarrollados en GELPL (glucosa-extracto de levadura-peptona-líquido) o en GELPA que pueden ser observados al microscopio luego de ser incubados a 25 °C durante 3 días. En este caso, también las preparaciones en fresco o con azul de lactofenol facilitan la observación.

##### b) Formación de pseudomicelio y micelio verdadero.

Cuando la levadura se reproduce asexualmente (por gemación o fisión) la célula hija puede separarse o permanecer adherida a la célula madre, y eventualmente dar lugar a cadenas de células. Esta tendencia a permanecer unidas puede resultar en la formación de pseudomicelio.

El pseudomicelio puede ser rudimentario, a manera de rosario, o bien un micelio verdadero. Para observar la formación de pseudomicelio o micelio verdadero se pueden utilizar varios medios de cultivo, entre los cuales se eligió el agar-harina de maíz (AHM). Este medio fué sembrado con la técnica de Dalmay, incubado a 25 °C por 5 días y observado al microscopio.

c) Formación de clamidosporas.

Debido a que las clamidosporas son estructuras características de algunos géneros, el hallazgo de las mismas es de gran utilidad.

Las clamidosporas son estructuras reconocibles a través de la observación microscópica de los cultivos viejos, ya que además de tener paredes celulares gruesas son ricas en material lipídico y muestran mayor tamaño.

Para la observación de las clamidosporas, cuya búsqueda se hizo en cultivos viejos crecidos sobre AHM, se usaron preparaciones en fresco, con KOH y con azul de lactofenol.

d) Formación de balistosporas.

La formación de balistosporas es un modo de reproducción muy característico y por tanto, es un criterio decisivo para la clasificación e identificación de las levaduras pertenecientes a la familia Sporobolomycetaceae.

Las balistosporas pueden ser detectadas en los cultivos en placa; ya que en la tapa de la caja de Petri se forma una imagen especular de la colonia que crece en el medio, dicha imagen está formada por las balistosporas descargadas por la levadura.

Para la observación de balistosporas se utilizaron los cultivos desarrollados sobre los medios de agar-harina de maíz (AHM), en los cuales se revisó la tapa de la caja de Petri buscando la imagen de la colonia formada por las balistosporas descargadas.

e) Presencia de cápsula.

La detección de cápsula alrededor de las células levaduriformes tiene cierta importancia para la identificación, ya que algunos géneros se caracterizan precisamente por ser capsulados. Sin embargo, este no es rasgo definitivo para la identificación debido a que las cepas levaduriformes en algunas ocasiones pierden la capacidad para formar la cápsula.

El crecimiento mucóide de una colonia sobre medio sólido, está frecuentemente asociado a la presencia de cápsula; por ello, a todas las colonias con la característica mucóide que crecieron sobre

GELPA (inciso a), se les practicó la técnica de la tinta china. Esta técnica es la que pone de manifiesto la presencia de la cápsula, facilitando la observación microscópica de la misma.

#### B. Características de la reproducción vegetativa.

La reproducción asexual o vegetativa de las levaduras ocurre por gemación, por fisión o por una combinación de ambos procesos. De las tres, la gemación es la más representativa y más frecuente entre las levaduras y como se sabe consiste en la formación de una célula hija a partir del crecimiento de una yema o blastospora en la levadura madre.

Cuando las yemas o blastosporas se forman en diferentes sitios sobre la superficie de la célula madre, se dice que ocurre gemación multipolar o multilateral y es la forma clásica y más común en las levaduras. Si las yemas se forman en dos polos distintos de la cápsula, la gemación se llama bipolar y si la célula origina una yema única se conoce como unipolar.

Otra forma de reproducción vegetativa que podemos encontrar en las levaduras es la formación de conidios nacidos sobre esterigmas, que ocurre cuando una célula forma un esterigma el cual da lugar a un solo conidio.

Todas las características de la reproducción vegetativa se pueden observar conjuntamente con las de las células vegetativas (inciso a), utilizando para ello los mismos medios y técnicas.

FALLA DE ORIGEN

### 3.5.2. OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS DE CULTIVO.

Puesto que prácticamente todas las levaduras pueden ser cultivadas en medios líquidos y sólidos, las características de tales cultivos, observables a simple vista, pueden ser empleadas con propósito diagnóstico.

#### A. Crecimiento en medios líquidos.

El crecimiento en medios líquidos de las levaduras, puede resultar en la formación de sedimento, anillo islotos o película superficiales o en el fondo del recipiente, o bien dar al líquido una consistencia viscosa. La formación de película en la superficie es una propiedad que se asocia parcialmente con la demanda de oxígeno de las levaduras; dicha película se forma en 1 ó 2 días después de inocular el medio, si es pesada, arrugada y se desliza fácilmente se le conoce como "Kahmhaut". Cuando la película pasa a ser brillante y húmeda en su aspecto significa que el cultivo ha sido prolongado.

Al formarse elseudomicelio o micelio verdadero en los medios líquidos se produce un crecimiento grueso y pegajoso que aparece en la superficie y que eventualmente resultará en masa mucóide en el recipiente.

La aparición del "kahmhaut" está asociada con especies que dependen de la asimilación oxidobióntica para la producción de energía necesaria en su crecimiento.

El crecimiento de las levaduras en medios líquidos se observó en matraces que contenían GELPL, que una vez inoculados, se incubaron a 25 °C durante 3 días. Se observó por la aparición de desarrollo tanto en la superficie como en el fondo.

#### B. Crecimiento en medios sólidos.

Sobre medios sólidos, el crecimiento levaduriforme puede ser mucóide, afelpado, cremoso o parejo; el crecimiento mucóide está asociado a la presencia de cápsula, como ya se mencionó, mientras que el crecimiento parejo o afelpado lo está a la presencia deseudomicelio o micelio verdadero.



La superficie de crecimiento y los márgenes de la colonia son datos útiles, pero no definitivos para la identificación; ya que una misma cepa puede presentar dimorfismo colonial (ser lisa y rugosa) y seguir teniendo las mismas propiedades fisiológicas.

El crecimiento puede presentar coloración fuerte o débil debida a la presencia de algunos pigmentos, y esto sí daría la pauta para seguir más fácilmente la identificación, porque son pocos los géneros lavaduriformes pigmentados.

Las características del desarrollo sobre medios sólidos se observa en las colonias únicas que crecieron en placas de GELPA luego de 3 días de incubación a 25 °C. A estas colonias se les permite seguir desarrollando en esa misma temperatura de incubación hasta por un mes con el fin de observar los cambios que con el tiempo sufre.

FALLA DE ORIGEN

### 3.5.3. OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS DE LA REPRODUCCION SEXUAL.

#### A. Características de los ascos y ascosporas.

De las levaduras que tienen reproducción sexual, son las que pertenece a los Ascomycetos (familia Saccharomycetaceae y Spermophthoraceae) los únicos géneros en observar a producción de ascos y ascosporas. Para facilitar la comprensión del rol que juegan estas estructuras en el ciclo biológico de las levaduras ascosporógenas se presenta la figura No. 3.2.

Existen varias maneras en que el asco se origina, pero todas ellas van a dar una célula diploide o cigoto que posteriormente se transformará en asco conteniendo las ascosporas. Al llegar a la madurez, los ascos pueden permanecer intactos, romperse como resultado del agrandamiento de las esporas germinantes o romperse espontáneamente y liberar las ascosporas maduras sin germinar.

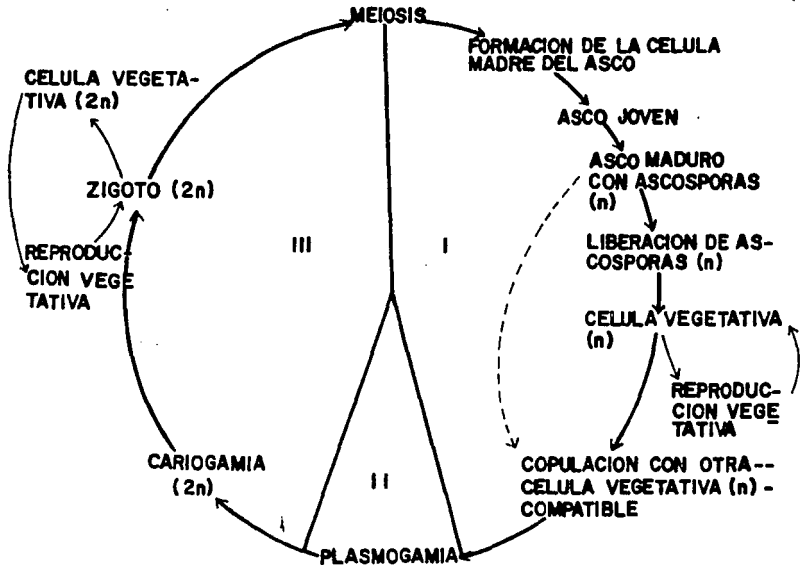
Respecto a las ascosporas, al igual que los ascos, se puede encontrar una gran diversidad de formas (ya mencionadas en el capítulo anterior) que en casos muy especiales ayudaría a la identificación del género por sí misma. Algunas ascosporas son pigmentadas y esta característica puede ayudar en la identificación.

La pared de la ascospora madura tiene afinidad por ciertos colorantes básicos y ácidos; esto se pone de manifiesto utilizando los colorantes de la tinción ácido-alcohol-resistente.

Las ascosporas están adaptadas para mantener su viabilidad por periodos largos y por ello la formación de las ascosporas depende de factores como la calidad de nutrientes del cultivo, la composición del medio y su pH, etc.

Para lograr un mayor éxito en la esporulación se recomienda que las cepas de levaduras provengan de medios ricos (como el GELPA) y sean inoculados en medios especiales que favorezcan la actividad ascógena. Estos medios especiales para la esporulación se caracterizan por tener una concentración limitada de carbohidratos, que restringe la reproducción vegetativa. También la temperatura a la cual se incuben los medios para esporulación juega un papel importante, ya que para la mayoría de las cepas es alrededor de 25 °C.

FIGURA No. 32. ESQUEMA GENERAL DEL CICLO BIOLÓGICO DE LAS LEVADURAS ASCOGENES.



- I HAPLOFASE  
 II FASE DICARIOTICA  
 III DIPLOFASE

(Fuente: Alexopoulos modif. Gallegos)

Para la observación de las características de la reproducción sexual se utilizaron trozos de zanahoria y de papa estériles dentro de tubos y bloques de gis en igual forma. Los medios se inoculan y se incuban a 25 °C por 3 días, pasados los cuales se empieza una revisión periódica haciendo observación microscópica de ellos. Los cultivos no son desechados en por lo menos 6 semanas para decir que son negativos.

La formación de las ascosporas se verifica observando preparaciones fijadas y tefidas con la técnica de Schaeffer-Fulton modificada que son revisadas al microscopio y donde se pueden encontrar con mayor facilidad

#### B. Características de teliosporas.

Los géneros levaduriformes que pertenecen a los basidiomicetos, comparten con los hongos de este grupo varias características durante su ciclo biológico. Por esto, es conveniente revisar a grandes rasgos las etapas del ciclo biológico que se presentan en estas levaduras. (figura No. 3.3.)

Dentro del ciclo vital se puede encontrar haplofase, diplofase y fase dicariótica, pero no todos los géneros deben presentar cada una de ellas necesariamente.

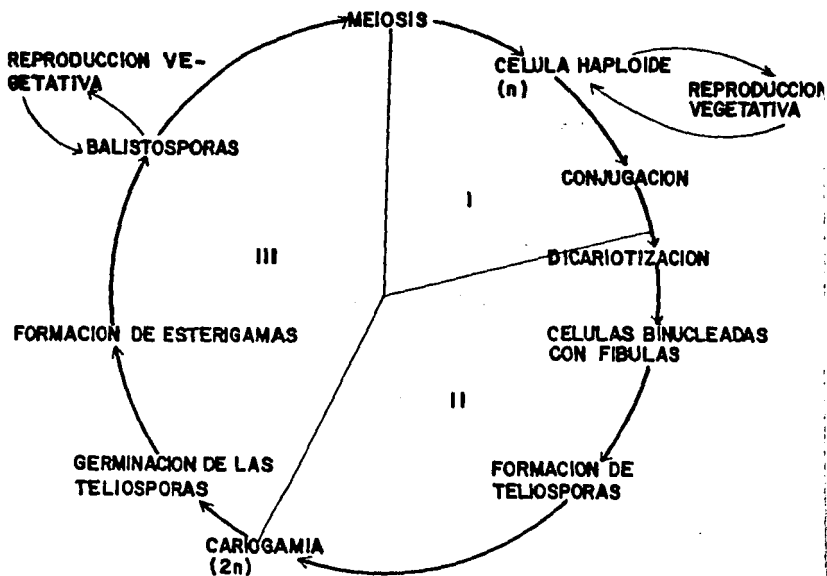
La formación de teliosporas diploides o de esporas sexuales homólogas a éstas es la característica a identificar en los géneros levaduriformes correspondientes a los basidiomicetos. Las esporas en cuestión tienen pared gruesa y son ricas en lípidos, pueden tener formas esferoidales o angulares o ser hialinas u oscuras.

La formación y germinación de teliosporas es influenciada marcadamente por las condiciones del medio, siendo los medios nutricionalmente deficientes los que favorecen su aparición.

Para observar la presencia de teliosporas y esporas relacionadas se usa el medio agar-harina de maíz (AHM) utilizando la técnica de Dalmau. Estos medios ya inoculados se incuban a 25 °C por 10 días.

La revisión al microscopio de los cultivos van encaminados al hallazgo de células esferoidales o elipsoidales, ricas en lípidos, de pared gruesa y colocadas en posición terminal, lateral o en racimos.

FIGURA No.33. ESQUEMA GENERAL DEL CICLO BIOLÓGICO DE LAS LEVADURAS PERTENECIENTES A LOS BASIDIOMICETOS.



- I HAPLOFASE  
 II FASE DICARIOTICA  
 III DIPLOFASE

(Fuente: Alexopoulos modif. Gallegos)

### 3.5.4. OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS.

La observación de las características fisiológicas es con frecuencia utilizada para delimitar las especies de los géneros de levaduras y se consideran poco necesarias para demarcar taxa mayores.

La experiencia ha enseñado que la característica fisiológica más fundamental ocurre en términos del metabolismo de la levadura de ahí su valor e importancia.

Las características fisiológicas que han probado ser más útiles en la clasificación e identificación de las levaduras son aquellas asociadas con: utilización de fuentes de C y N; factores necesarios para el crecimiento; crecimiento a temperaturas elevadas y sobre medios con alta presión osmótica; formación de metabolitos típicos y la susceptibilidad a ciertos antibióticos que tienen algunas levaduras.

A continuación se dará la lista de las características fisiológicas a ser observadas en esta investigación, ya que no se realizó metodología para todas las recomendadas en bibliografía debido a que el objetivo de este trabajo es llegar a la identificación de los géneros únicamente, y para ello son necesarias solo unas cuantas.

Las características fisiológicas que son necesarias para la identificación de los géneros de levaduras son:

- A. Utilización de compuestos de carbono.
- B. Utilización de compuestos de nitrógeno.
- C. Crecimiento a altas temperaturas.
- D. Producción de compuestos amiloideos extracelulares.
- E. Hidrólisis de urea.
- F. Producción de ésteres.
- G. Formación de pigmento

FALLA DE ORIGEN

- A. Utilización de compuestos de carbono.

Una levadura que desarrolle sobre una fuente de carbohidratos debe tener capacidad de fermentarlo o de utilizarlo para la respiración; es costumbre referirse al primer proceso como fermentación y

al segundo como asimilación, aunque en la actualidad se sabe que tanto en los procesos fermentativos como en los oxidativos hay asimilación del azúcar.

Con muy pocas excepciones, se ha encontrado que cuando una cepa levaduriforme utiliza una fuente de carbono por fermentación, también es capaz de utilizarla oxidativamente, pero no viceversa. En base a esto y a que las pruebas para la utilización de compuestos de carbono se prefieren en la identificación específica de las especies, solo se realizaron algunas pruebas necesarias para la observación de la fermentación característica de los géneros.

#### a) Utilización fermentativa de los compuestos de carbono.

El concepto clásico de la fermentación alcohólica por levaduras ha sido el de un proceso anoxibiótico que se realiza bajo condiciones estrictamente anaeróbicas. Más aún, que se trata de un proceso que se deprime con la presencia de oxígeno molecular (fenómeno conocido como Efecto Pasteur). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que este concepto de fermentación de las levaduras no siempre es sostenible, ya que se ha observado que si bien el efecto Pasteur es cierto para la mayoría de las especies, en algunas el oxígeno molecular estimula la fermentación.

Como ya se mencionó antes, la capacidad o incapacidad de una levadura de fermentar carbohidratos para dar etanol y  $\text{CO}_2$  es una característica muy útil en la diferenciación de especies, pero también tiene cierta aplicación en la identificación de los géneros.

Se han diseñado un buen número de pruebas para determinar la capacidad fermentadora de las levaduras, sin embargo todas se basan en la detección de  $\text{CO}_2$ , etanol y ácidos orgánicos producidos durante el proceso.

La técnica que se utilizó en el presente trabajo para la investigación de la capacidad fermentadora de las cepas fue la inoculación en tubos de Durham. Los tubos debían contener una solución al 2% del azúcar a probar en un medio base; dicho medio base provee a la cepa en estudio de una fuente de nitrógeno y nutrientes esenciales y tiene el indicador de pH que pone de manifiesto los cambios de acidez.

Los inóculos empleados en estas pruebas deben de ser grandes para disminuir la disponibilidad de oxígeno y restringir la proliferación celular: 0.1 ml. de una suspensión de células hecha de cultivos de AEL de 48 horas en 4.5 ml. de agua destilada estéril.

Los tubos inoculados se incuban a 25 °C, se les agita frecuentemente y se revisan diario por 24 días, buscando la aparición de gas y el cambio de color del indicador.

Los carbohidratos empleados en las pruebas de fermentación fueron: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa: por ser azúcares más representativos. Es importante señalar que cuando una cepa es fermentadora, siempre presenta esta capacidad con la glucosa.

#### B. Utilización de compuestos de nitrógeno.

Puesto que el metabolismo del nitrógeno es básico en el crecimiento de cualquier organismo, la capacidad de utilizar diferentes fuentes de nitrógeno resulta útil en la identificación de las levaduras.

Las levaduras tienen habilidad para utilizar diversas fuentes de N, tales como los nitratos, nitritos, aminas alifáticas y algunos aminoácidos específicos. Con el propósito de diferenciar los géneros se usa la prueba para la utilización de nitratos por ser la más representativa.

##### a) Utilización de nitratos.

Para probar la capacidad de las cepas levaduriformes de utilizar nitratos como única fuente de nitrógeno, se recurrió a la técnica de asimilación en medio líquido. Esta técnica consiste en la inoculación de las cepas en un medio que contiene una fuente de carbohidratos, los nutrientes esenciales para el crecimiento y nitrato de potasio. Paralelamente se inoculan tubos que contengan solo el medio con la fuente de C y los nutrientes (tubos testigo).

El inóculo de cada tubo es similar al utilizado en las pruebas de fermentación y una vez listos los tubos se incuban a 25 °C por 4 semanas, revisándolos semanalmente. El desarrollo en los tubos que contienen nitrato siempre se comparará con el que pudiera ocurrir en los testigos para dar la prueba como positiva.



### C. Crecimiento a altas temperaturas.

El rango óptimo de temperatura para el crecimiento de las levaduras es de 20 °C a 28 °C; sin embargo, hay excepciones y algunas desarrollan a temperaturas más bajas (4 y 15 °C) o más altas (37 y 45 °C). Es interesante determinar, cuando las levaduras son capaces de crecer a 37 °C si su desarrollo está asociado con animales de sangre caliente.

El crecimiento de las levaduras a temperaturas elevadas puede observarse sobre diferentes medios. Se escogió el uso de AEL para esta prueba. El agar fué inoculado por estría e incubado a 37 °C por 4 días, luego de los cuales se revisó y cuando el desarrollo obtenido fué débil, se hizo un subcultivo que fué incubado otros 4 días a la misma temperatura.

### D. Producción de compuestos amiloides extracelulares.

Desde hace tiempo, se ha venido estudiando la producción de material amiloide extracelular de las levaduras capsuladas y se ha encontrado que bajo condiciones de cultivo adecuadas, muchas cepas elaboran polisacáridos extracelulares que en presencia de soluciones de yodo dan coloración azul-morada.

La prueba que se usó para poner de manifiesto los compuestos amiloides extracelulares consiste en inundar las cajas de Petri que contienen colonias únicas de levaduras con una solución de Lugol de Gram modificada. El medio de cultivo utilizado en este caso es GELPA acidificado, que una vez inoculado se incubó 2 semanas a 25 °C.

La presencia de color azul moráceo en la caja luego de ponerle el Lugol dá la prueba positiva.

### E. Hidrólisis de urea.

FALLA DE UNIDAD

Prácticamente, todas las levaduras pueden utilizar la urea en bajas concentraciones como única fuente de N. sin embargo difieren en su capacidad para hidrolizarla en altas cantidades en medios que contienen peptona como fuente de N orgánico.

Para observar la capacidad de cada cepa para hidrolizar urea se utilizó el medio Christensen (Agar-urea de Christensen) que luego de ser inoculado se incubó a 25 °C, examinando los cultivos diario por 5

días. La hidrólisis de la urea se toma como positiva cuando aparece el color rosa fuerte en el medio que originalmente es violáceo.

#### F. Producción de ésteres.

Ya que las levaduras fermentadoras pueden formar una gran variedad de ésteres durante la fermentación, esta característica se utiliza solo como ayuda en la identificación general de los géneros.

Para detectar la formación de ésteres por una cepa levaduriforme se recurre a examinar el olor de los cultivos crecidos sobre GELPA o en GELPL incubados a 25 °C por 48 horas. Se buscará el olor característico de los ésteres.

#### G. Formación de pigmento.

La formación de pigmentos distintivos puede ser usada en la diferenciación de algunos géneros levaduriformes.

Entre las levaduras se distinguen diferentes tipos de pigmentos, pero los más comunes y de mayor importancia taxonómica son los carotenoides. Los pigmentos carotenoides dan al cultivo tonalidades que van del amarillo al rojo y esto se puede observar tanto en medios líquidos como en sólidos: de esta manera, se pueden utilizar las mismas colonias que se usaron en la observación de las características de cultivo para detectar la formación de pigmento.

FALLA DE ORIGEN

## 4. RESULTADOS

#### 4. RESULTADOS

Durante esta investigación se manejaron en total 50 muestras provenientes de cuatro industrias forrajeras diferentes; de las 50 muestras, 31 correspondieron a materia prima y los 19 restantes a producto forrajero terminado listo para el consumo animal. La tabla No 4.1, presenta la distribución y el tipo (materia prima o forraje) de las muestras que fueron proporcionadas. Cabe señalar que la elección de la muestra dependió exclusivamente de las empresas donadora y se hizo en función de sus existencias.

Las muestras donde se realizó el hallazgo de levaduras fueron 24 (48 % del total): 14 de materias primas y 10 de productos terminados; dichas cifras corresponden a 45% y 52% de cada tipo de muestra en particular.

En la tabla No. 4.2, se presenta la relación de las muestras positivas y los géneros levaduriformes identificados, así como el conteo de los microorganismos. En la siguiente lista se resumen los nombres de los 10 diferentes géneros aislados e identificados:

***Candida***

***Cryptococcus***

***Hansenula***

***Kloeckera***

***Kluyveromyces***

***Pichia***

***Rhodotorula***

***Saccharomyces***

***Tortilopsis***

***Trichosporon***

TABLA No. 4.1. DISTRIBUCION Y TIPO DE MUESTRAS PROPORCIONADAS POR CUATRO FORRAJERAS DE LA CIUDAD DE GUADALAJARA, JALISCO.

FORRAJERA	TOTAL DE MUESTRAS	NUMEROS ASIGANDOS	TIPO DE MUESTRA	
			MATERIA PRIMA	FORRAJE TERMINADO
I	10	1 AL 10	2	8
II	10	11 AL 20	6	4
III	10	21 AL 30	5	5
IV	20	31 AL 50	18	2
			31	19

( Febrero 83 )

TABLA 4.2. GENEROS Y RECUENTO DE LEVADURAS PRESENTES EN 24 MUESTRAS DE  
MATERIAS PRIMAS (MP) Y FORRAJES TERMINADOS (FT).

MUESTRAS No.	TIPO	GENEROS*	RECUENTO TOTAL	No./ GR. PESO DIFERENCIAL
2	FT	8	1	1
8	FT	8	1	1
9	FT	7	1	1
10	FT	1,7	3	1,2
11	MP	7,8	250	100,150
12	MP	2	40	40
13	FT	1,2,6	600	200,300,100
15	MP	10	1	1
16	MP	7,10	2	1,1
17	FT	1,2,9	400	100,200,100
18	FT	2,9	20	10,10
20	FT	1,2	20	10,10
21	MP	7	300	300
25	MP	1,3,7	30	10,10,10
28	MP	7	20	20
30	FT	8	1	1
32	FT	1	1	1
33	MP	5,7	2	1,1
36	MP	7,10	300	200,100
37	MP	2	1	1
41	MP	7,8	50	40,10
42	MP	4	1	1
48	MP	2,8	2	2
50	MP	10	1	1

\*CLAVE:

1 Candida      3 Hansenula      5 Kluyveromyces      7 Saccharomyces      9 Torulopsis  
2 Cryptococcus      4 Klöeckera      6 Pichia      8 Rhodotorula      10 Trichosporon

(Febrero-Agosto/83)

FALLA DE ORIGEN

Basándose en las tablas No 4.1. y No. 4.2. se observa que:

-De la forrajera I el 40% de las muestras fueron positivas al hallazgo de levaduras, correspondiendo éstas a forrajes terminados exclusivamente. En dichas muestras, el conteo promedio por muestra fué de 1.5 microorganismos/muestra, encontrándose solo 3 géneros diferentes: *Candida*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*.

-De la forrajera II, el 80% de las muestras presentó contaminación por levaduras, siendo en este grupo donde se encontró el mayor número de microorganismos/muestra. La diversidad genérica fué de 7. Todas las muestras de forrajes terminados y la 2/3 partes de las materias primas fueron positivas a la contaminación en cuestión. Los 7 géneros aquí identificados fueron: *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Trichosporon* y *Torulopsis*.

-De la forrajera III también se tuvo el 40% de las muestras positivas, dando un recuento promedio de 88 microorganismos/muestra. Las muestras positivas fueron en su mayoría materias primas. Se encontraron 4 géneros diferentes: *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces* y *Rhodotorula*.

-En la forrajera IV se encontró el 40% de las muestras positivas, 2/5 partes de las materias primas y la mitad de los forrajes terminados, que resultaron con un conteo promedio de 45 microorganismos/muestra. En este grupo la diversidad genérica fué de 7: *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* y *Trichosporon*.

La tabla No. 4.3. muestra los 10 géneros de levaduras identificados a través de este trabajo de tesis y la frecuencia con que cada uno de ellos fué encontrado. De igual forma, la figura No. 4.1. representa graficamente estos datos de frecuencias.

Por último, en la tabla No. 4.4. se muestran los resultados de las pruebas realizadas para la observación de los caracteres fisiológicos de cada cepa aislada. Esta tabla, junto con los resultados obtenidos en las pruebas para las características morfológicas, de cultivo y de reproducción sexual conforman la base de la identificación efectuada.

Las cepas a identificar totalizaron 39, lográndose conocer el género de cada una de ellas.

FALLA DE ORIGEN

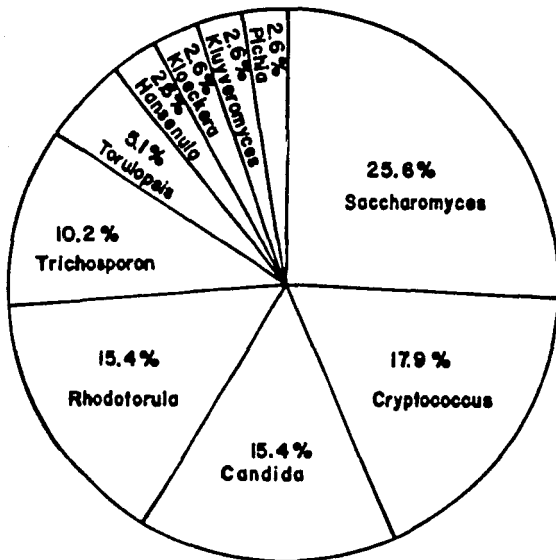


TABLA No. 4.3. FRECUENCIA DE GENEROS LEVADURIFORMES AISLADOS DE 24 MUESTRAS DE MATERIAS PRIMAS Y FORRAJES.

GENEROS	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Saccharomyces	10	25.6 %
Cryptococcus	7	17.9 %
Candida	6	15.4 %
Rhodotorula	6	15.4 %
Trichosporon	4	10.2 %
Torulopsis	2	5.1 %
Hansenula	1	2.6 %
Kloeckera	1	2.6 %
Kluyveromyces	1	2.6 %
Pichia	1	2.6 %
	39	

(Febrero-Agosto 83)

**FIGURA No. 4.1. ESQUEMA DE LAS FRECUENCIAS DE LOS GENEROS DE LEVADURAS AISLADOS DE 24 MUESTRAS DE MATERIAS PRIMAS Y FORRAJES.**



(Febrero-Agosto/83)

FALLA DE ORIGEN

TABLA No. 4.4. PATRON BIOQUIMICO Y COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS LEVADURIFORMES AISLADAS.

CEPA	FERMENTACION D G S L M	UTILIZACION DE NO <sub>3</sub>	CRECIM. PRODUCCION A 37°C C A E	HIDROLISIS DE UREA	PRODUCC DE ESTER	PIGMENTO PRESENTE
2	-----	-	-	+	+	+
8	-----	-	-	+	+	+
9	+++++	-	-	-	+	-
10a	+++++	-	-	-	+	-
10b	+++++	+	+	-	-	-
11a	-----	-	-	+	+	+
11b	+++++	-	-	-	+	-
12	-----	-	+	+	+	-
13a	-----	-	-	+	-	-
13b	+++++	+	+	-	-	-
13c	+++++	-	-	-	-	-
15	-----	-	-	-	-	-
16a	+++++	-	-	-	+	-
16b	-----	-	-	-	-	-
17a	+++++	-	-	-	-	-
17b	+++++	+	+	-	-	-
17c	-----	+	+	+	+	-
18a	+++++	-	-	-	-	-
18b	-----	-	+	+	+	-
20a	+++++	+	+	-	-	-
20b	-----	-	+	+	+	-
21	+++++	-	-	-	+	-
25a	+++++	+	+	-	-	-
25b	+++++	-	-	-	+	-
25c	+++++	+	+	-	-	-
28	+++++	-	-	-	+	-
30	-----	-	-	+	+	+
32	+++++	+	+	-	-	-
33a	+++++	-	-	-	+	-
33b	+++++	-	+	-	-	+
36a	+++++	-	-	-	+	-
36b	-----	-	-	-	-	-
37	-----	-	+	+	+	-
41a	-----	-	-	+	+	+
41b	+++++	-	-	-	+	-
42	+++++	-	-	-	-	-
48a	-----	-	+	+	+	-
48b	-----	-	-	+	-	-
50	-----	-	-	-	-	-

D= Dextrosa, G= Galactosa, S= Sacarosa L= Lactosa M= Manosa  
C.A.E.= Compuestos Amiloides Extracelulares.

(Febrero-Agosto/83)

5. ANALISIS DE RESULTADOS  
Y COMENTARIOS

FALLA DE ORIGEN

## 5. ANALISIS DE RESULTADOS Y COMENTARIOS

### ANALISIS DE RESULTADOS.

A partir de los resultados obtenidos, existen varias conclusiones a las cuales es posible llegar:

1.- Como era de esperarse, por tratarse de microorganismos ubicuos, diferentes levaduras fueron aisladas de las muestras de forrajes y sus materias primas. Sin embargo, el número de éstas es pobre en comparación con la población de bacterias y mohos presentes en tales productos alimenticios observadas en la etapa del aislamiento.

2.- Se puede afirmar que cada una de las forrajeras investigada, con excepción de la No. II, presenta contaminación con levaduras en el 40% de las muestras donadas para este trabajo. Este porcentaje corresponde en su mayoría a forrajes terminados por motivos que se señalan más adelante. También es importante mencionar que la ocurrencia de géneros y los conteos realizados guardan cierta similitud.

3.- El caso de la forrajera No. II es muy particular y así se puede ver en los resultados reportados: 80% de las muestras presentaron contaminación con levaduras dando los conteos más elevados y se señala al género *Cryptococcus* como el más abundante. De esta forma, son los resultados de las muestras de la forrajera No. II los únicos que se salen del rango de los resultados totales.

4.- En general y contrariamente a lo que pudiera pensarse, los forrajes o productos terminados mostraron más frecuentemente estar contaminados con levaduras en comparación con las muestras de materias primas. Esto obedece a que las empresas productoras de alimentos para animales que proporcionaron las muestras, procesan en corto plazo después de su compra, las materias primas y almacenan sus productos terminados conforme la demanda de los mismos.

5.- Respecto a los géneros de levaduras aislados e identificados, se puede decir que forman parte de la microflora del suelo y que se les puede encontrar en una gran variedad de habitats. Todas las cepas aisladas fueron genéricamente identificadas: siendo, sin lugar a dudas, el género *Saccharomyces* el más frecuente en las muestras. Sin embargo, como se menciona en el punto 3o., el género *Cryptococcus* tuvo la frecuencia máxima de aislamiento dentro de un grupo de muestras (todas ellas provenientes de la forrajera No. II).

6.- Continuando con los géneros identificados en esta investigación, es de hacerse notar que se aislaron levaduras con las que no se trabaja comunmente en el laboratorio clínico ni el de control de calidad de las industrias fermentadoras. Tal es el caso de *Pichia*, *Hansenula*, *Kloeckera* y *Kluveromyces*.

7.- De los géneros aislados e identificados, *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporon*, son los únicos que se consideran potencialmente patógenos para el hombre y los animales. Debido a que no se realizó la identificación de especies, no se tienen datos de cuantas de las cepas de cada uno de estos géneros son las oportunistas.

8.- Hablando del mejoramiento de la calidad de los forrajes por la presencia de géneros levaduriformes, no se puede afirmar que ocurra. Aunque *Candida*, *Saccharomyces* y *Kluveromyces* (que tienen importancia nutricional) están presentes, sus conteos son tan bajos como para mejorar la calidad nutricional de los forrajes y con este fin sería preferible optar por el cultivo en gran escala de géneros y especies indicados para utilizarlos como forrajes propiamente o como complemento de forrajes vegetales.

9.- Definitivamente, las condiciones de manejo y almacenamiento de las materias primas y los forrajes terminados deciden el papel que juegan las levaduras en el deterioro de estos productos, ya que aún encontrándose en pequeñas cantidades, son capaces de iniciar procesos de degradación importantes.

10.- Es conveniente señalar que, de los casos en que las muestras eran levadura de cerveza desecada (muestras 25 y 40), solo en uno de ellos se pudieron aislar organismos levaduriformes viables. Ello probablemente debido al proceso del secado mismo.

#### COMENTARIOS.

Los siguientes comentarios se hacen respecto a algunas de las conclusiones.

Sobre el punto 1. Se hace notar que aún cuando no se hicieron recuentos de bacterias y hongos filamentosos, se tuvo la apreciación de su presencia al realizar las técnicas para el aislamiento de las levaduras. Es probable que las muestras que fueron negativas al hallazgo de levaduras hayan contado con una población bacteriana y de mohos tan importante, que se encuentre severamente restringiendo el desarrollo levaduriforme.

FALLA DE ORIGEN

Los puntos 2., 3. y 4. confirman que condiciones inadecuadas en el manejo y almacenamiento de materias primas y forrajes darán por resultado cambios en la cantidad y calidad de levaduras contaminantes y como se señala en el punto 9., ellas son, muchas veces, responsables de la descomposición inicial de estos materiales debido a la carga enzimática y capacidad metabólica que poseen, aún en conteos bajos. Tal vez la variación en las condiciones de humedad, pH y aereación de los lugares de procesamiento y almacenaje de productos sean los responsables de la diferencia en los resultados de la forrajera No. II.

Es importante mencionar que la aparición tan frecuente de *Cryptococcus* en las muestras de la forrajera No. II indica que este hongo abunda en ese sitio y que los productos que de ahí provienen representan un peligro de contaminación para los animales sensibles con los que tenga contacto. (Puntos 3. y 7.). Otra observación importante referente a este mismo género es que en estudios recientes, publicados a partir de 1990, se descubrió que *Cryptococcus* presenta fase sexual perteneciente al orden *Ustilaginal*, familia *Ustilaginaceae* y género *Filobasidiella*. Dicha característica no fué considerada en este trabajo ya que en el tiempo de la realización de esta investigación los criterios para este género eran diferentes ( 15 ).

No cabe duda sobre la frecuencia con que el género *Saccharomyces* fué aislado, ya que es uno de los más abundantes en la naturaleza; sin embargo, aunque en este caso en especial, no confiere al sustrato en el que está presente un mayor valor nutritivo por su bajo conteo, si asegura la fermentación de carbohidratos como inicio del deterioro de los productos. De ahí su importancia.

El hecho de describir los criterios de clasificación y las características de los géneros en el capítulo 2 y la metodología para la identificación en el capítulo 3 se debe, principalmente, a que se pretende que esta tesis pueda servir a quienes quieran conocer en el futuro los requerimientos mínimos para identificar levaduras y de ayuda para formar un plan de trabajo; ya que tanto la información bibliográfica como algunos de los recursos técnicos para la identificación de especies son de difícil acceso. En la

búsqueda de la información para el desarrollo de este trabajo, se pudo comprobar <sup>que</sup> excluyendo a las levaduras de importancia médica e industrial, la propagación de bibliografía sobre el tema se encuentra restringido a centros de estudios altamente especializados.

Para terminar, se cree que los resultados y conclusiones obtenidos son una representación objetiva de la importancia del hallazgo e identificación de las levaduras en diferentes materias primas y forrajes.



## 6. CONCLUSIONES

FALLA DE ORIGEN

## 6. CONCLUSIONES

Hasta el momento de la realización de este trabajo no se tenían reportes publicados en la bibliografía sobre la presencia de levaduras en forrajes u otros alimentos animales. Así mismo, tampoco se encontraron datos numéricos que sirvieran para comparar los resultados obtenidos aquí; por lo tanto las cifras reportadas en este trabajo pueden considerarse entre ellas mismas, dejando de esta forma un antecedente para posteriores investigaciones.

El trabajo práctico efectuado durante la investigación se basó exclusivamente a la bibliografía que en ese tiempo era novedosa; de ahí que, innovaciones en la metodología para la identificación de las levaduras llevadas a cabo después de 1983, así como modificaciones en la clasificación, no hayan sido tomadas en cuenta.

Respecto a los géneros levaduriformes identificados, se considera que representan solo una parte de los que en realidad existen en los productos estudiados; ya que por presentarse tan escasamente en estos materiales, tienen restringido su desarrollo por otros microorganismos. Tampoco se puede afirmar con certeza que las levaduras encontradas en las muestras sean contaminantes del sitio de almacenamiento, porque como es bien sabido, desde el cultivo, recolección, manejo y precesamiento de las plantas forrajeras existe la posibilidad de contaminación con levaduras.

El hecho de que se hayan aislado géneros de levaduras, que a través de su identificación, mostraron ser oportunistas, merece una mayor atención en el cuidado de la calidad de los forrajes debido a que estos alimentos contaminados se convierten en importantes fuentes de infección que pueden llegar al hombre y producir patologías en individuos inmunodeprimidos.

Debido a la dificultad para realizar la metodología recomendada para el estudio e identificación de las especies, sólo fue posible efectuar la identificación genérica. La razón de tal dificultad reside en la necesidad de recursos tecnológicos poco comunes e inaccesibles para la mayoría de los centros de estudios superiores.

## APENDICE I

TECNICAS Y MEDIOS UTILIZADOS EN  
LA METODOLOGIA

FALLA DE ORIGEN

APENDICE I: TECNICAS Y METODOS UTILIZADOS EN EL CAPITULO 3.

I.1. AISLAMIENTO Y RECuento: Técnica de Dilución en medios de cultivo acidificados a pH<sub>4</sub>.

+ Técnica de dilución: se utilizó en la forma siguiente.

Tubo No. 1: suspensión de la muestra ( 1 gr. de muestra 10 ml. agua destilada estéril)

Tubo No. 2: dilución 1:10

Tubo No. 3: dilución 1:100

Tubo No. 4: dilución 1:1000

+ Medios de cultivo acidificados a pH<sub>4</sub>

I. AGAR EXTRACTO DE LEVADURA ACIDIFICADO

5 gr. Extracto de levadura

20 gr. Bactoagar

1 lt. Agua Destilada

ácido tartárico el necesario para alcanzar pH<sub>4</sub>

II. PAPA DEXTROSA AGAR ACIDIFICADO

Medio preparado comercialmente y acidificado con ácido tartárico.

I.2. CONSERVACION DE LAS CEPAS PARA POSTERIOR IDENTIFICACION: Inoculación de tubos con GELPA inclinado.

+ Técnica: siembra por estría en el tubo con medio de cultivo inclinado.

+ Medio de cultivo: GLUCOSA-EXTRACTO DE LEVADURA-PEPTONA-AGAR 2%

20 gr. Glucosa

5 gr. Extracto de levadura

10 gr. Peptona

20 gr. Agar base

1 lt. Agua destilada.

FALLA DE ORIGEN

**I.3. IDENTIFICACION DE LOS GENEROS LAVADURIFORMES AISLADOS: A través de la observación de los diferentes caracteres morfológicos, fisiológicos, de cultivo y de la reproducción sexual.**

**I.3.A. Características morfológicas.**

**a) Célula vegetativa.**

-Morfología de la célula vegetativa: Inoculación directa a GLUCOSA-EXTRACTO DE LEVADURA-PEPTONA -AGAR (GELPA) Y GLUCOSA-EXTRACTO DE LEVADURA-PEPTONA-LIQUIDO (GELPL) y posterior observación de las colonias mediante preparación en fresco con KOH y A. DE L.

-Formación de pseudomicelio y micelio: Inoculación de AGAR HARINA DE MAIZ (AHM), preparado comercialmente, usado en la técnica de Dalmau.

+Técnica de Dalmau: Se preparan cajas de Petri con AHM, deben de ser preparaciones muy delgadas y que permitan el paso de luz a través de ellas.

A parte se esterilizan cubreobjetos, pinzas para manejarlos. Las cajas de Petri conteniendo el agar se inoculan por estría muy separada colocando sobre cada medio de cultivo y encima de la estría, uno o dos cubreobjetos. Luego de incubar, se observan las cajas de Petri ya crecidas bajo la lupa del microscopio.

-Formación de Clamidosporas: Observación de preparaciones en fresco con KOH y Azul de Lactofenol micológicos, provenientes de cultivos envejecidos crecidos sobre AHM.

-Formación de Ballistosporas: Observación de una imagen especular en la tapa de cajas de Petri donde ha crecido una colonia única sobre AHM.

-Presencia de Cápsula: A partir de crecimientos en medios GELPA y GELPL de colonias de apariencia mucóide, se hacen preparaciones fijas usando Tinta China como contraste para observar la microscopio.

**b) Reproducción vegetativa: Se observa conjuntamente con la morfología de la célula vegetativa haciendo preparaciones en fresco con KOH y Azul de Lactofenol micológicos de las colonias crecidas sobre GELPA o GELPL.**

### I.3.B. Características de cultivo.

-Crecimiento en medio líquido: Observación del crecimiento de la cepa en GELPL contenido en pequeños matraces Erlenmeyer.

-Crecimiento en medio sólido: Observación del crecimiento de la colonia única crecida en GELPA.

### I.3.C. Características de la reproducción sexual.

a) Ascosporas y Ascosporas: Observación al microscopio de preparaciones fijas teñidas con la técnica de Schaeffer Fulton (ácido alcohol resistente) modificada para hongos a partir de colonias crecidas sobre trozos de zanahora, papa y bloques de gis previamente esterilizados y contenidos en tubos.

b) Tetosporas: Observación de preparaciones con KOH y Azul de Lactofenol micológicos provenientes de colonias crecidas sobre AHM.

### I.3.D. Características fisiológicas.

#### a) Utilización de compuestos de carbono.

-Utilización fermentativa: Inoculación de medios libres de carbohidratos provenientes de otra fuente que no sea la elegida para la prueba y su posterior observación luego de incubar, buscando el viraje del color del indicador como presencia de fermentación. Se utilizaron los siguientes carbohidratos: GLUCOSA, GALACTOSA, SACAROSA, MALTOSA Y LACTOSA en medios conteniendo peptona, agua destilada y el indicador esterilizados con Micropore.

#### b) Utilización de compuestos de nitrógeno.

-Utilización de nitratos: Observación de crecimiento en medios líquidos (tubos de ensayo) conteniendo  $KNO_3$  y glucosa como única fuente de carbohidratos.

#### c) Crecimiento a altas temperaturas.

-Crecimiento a 37 °C Observación de crecimiento en tubos conteniendo AGAR EXTRACTO DE LEVADURA incubados a 37 °C.

FALLA DE ORIGEN

d) Producción de CAE (Compuestos Amiloides Extracelulares). Se hace vaciando Lugol de Gram modificado sobre las colonias únicas crecidas sobre GELPA acidificado. La prueba es positiva cuando aparece coloración morada que pone de manifiesto la presencia de CAE.

e) Hidrólisis de urea.

Inoculación de tubos conteniendo AGAR UREA DE CHRISTENSEN bacteriológico y observando el cambio de color después de la incubación.

f) Producción de ésteres.

En las colonias crecidas sobre Gelpa se busca el olor característico a éster.

g) Formación de pigmentos.

Observación de las colonias pigmentadas crecidas en GELPL y GELPA.



## APENDICE II

-GLOSARIO DE TERMINOS RELACIONADOS CON LAS  
LEVADURAS UTILIZADOS EN EL TEXTO.

-LISTA DE NOMBRES DE LAS MUESTRAS DE  
MATERIAS PRIMAS Y FORRAJES.

FALLA DE ORIGEN

**ARTROSPORA:** Espora resultante de la fragmentación de una hifa.

**ASCO:** Estructura sacciforme que por lo general contiene un determinado número de ascosporas, las cuales se forman como resultado de cariogamia y meiosis. Se trata de un rasgo característico de la subdivisión Ascomycotina.

**ASCOSPORA:** Espora que resulta de la meiosis y es llevada dentro de un asco.

**BALISTOSPORA:** Espora que una vez formada es descargada violentamente a partir de la estructura que la originó.

**BASIDIOSPORA:** Espora resultante de cariogamia y meiosis llevada sobre una estructura llamada basidio. Basidio y basidiosporas son típicos de la subdivisión Basidiomycotina.

**BLASTOSPORA:** Espora que resulta de la gemación.

**CAPSULA:** Estructura extracelular que consiste en material amioide que recubre a la célula.

**CARIOGAMIA:** Fusión de dos núcleos.

**CLAMIDOSPORA:** Célula hifal encerrada por una pared gruesa, una vez desarrollada, se separa de la hifa madre y se comporta como espora de resistencia.

**COMPATIBILIDAD SEXUAL:** Término que se da a la necesidad de encontrar en una misma especie, individuos cuyos núcleos sean compatibles para llevar a cabo la reproducción sexual. Existen cepas que son autofértiles y cepas autoestériles, estas últimas requieren de la presencia de otra compatible con el fin de aparearse. La compatibilidad sexual es regulada genéticamente.

**COPULACION GAMETANGIAL:** Uno de los tipos de producción sexual de los hongos; consiste en la fusión de todo el contenido de los dos gametangios en contacto.

**DICARIOTICO:** Se refiere a la célula que presenta un par de núcleos estrechamente asociados, cada uno derivado de células madres diferentes.

**DIPLOFASE:** Etapa del ciclo biológico donde un individuo tiene el número doble ( $2n$ ) de cromosomas.

**ESTERIGMA:** Una pequeña rama o estructura hifal que sostiene un esporangio, un conidio o una basidiospora.

**ESFORA:** Pequeña unidad de propagación producida por los hongos y que les sirve para dar nuevos individuos. Existen diferentes tipos de esporas.

**FIBULA:** Conexión hifal a manera de puente; es una característica del micelio de muchos basidiomicetos.

**FISION:** División de una célula en dos por el crecimiento centripeto de la pared celular. Una forma de reproducción asexual.

**GAMETANGIOS:** Estructuras que contienen las gametas, los hay femeninos y masculinos. En las levaduras la célula completa pasa a serlo.

**GEMACION:** Proceso de formación de una pequeña yema a partir de una célula, dicha yema crecerá hasta formar una célula totalmente independiente que puede o no permanecer unida a la célula madre. Una de las formas de la reproducción asexual.

**HAPOFLASE:** Etapa del ciclo biológico donde se presentan individuos haploides que contienen el número reducido ( $n$ ) de cromosomas.

**HETEROTALICO:** Se refiere a una especie constituida por individuos autoestériles (autoincompatibles), que para la reproducción sexual requiere de dos tipos diferentes de micelio que sean compatibles.

**HIFA:** Unidad estructural de los hongos; se trata de una estructura tubular. Varias hifas forman el micelio.

**HOMOTALICO:** Se refiere a los hongos para cuya reproducción sexual basta de un solo micelio que es por tanto, autocompatible.

**MICELIO:** Masa de hifas que constituye el cuerpo de un hongo. También se le llama talo.

**PLASMOGAMIA:** Fusión de dos protoplastos.

**SEUDOMICELIO:** Serie de células adheridas por los extremos formando una cadena. Se produce sólo en las levaduras.

**TELIOSPORA O TELEUTOSPORA:** Espora de resistencia de pared gruesa propia de algunos Heterobasidiomycetes; en esta estructura se realiza la cariogamia y se considera parte del aparato basidial. Cada teliospora se origina en los telios que son células binucleadas.

**ZIGOTO:** Célula diploide resultante de la unión de dos células haploides.

## LISTA DE NOMBRES DE LA MUESTRAS DE MATERIAS PRIMAS Y FORRAJES.

- |                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1.- Porcifalina                      | 21.- Gluten de maíz                  |
| 2.- Iniciarina                       | 22.- BCC (Base cría cerdos)          |
| 3.- Jamonina                         | 23.- BPI (Base para engorda inicial) |
| 4.- Cría Leche 16%                   | 24.- BGL 16% (Base ganado lechero)   |
| 5.- Lecharina 16%                    | 25.- Levadura de cerveza desecada    |
| 6.- Sorgo molido                     | 26.- Sorgo molido                    |
| 7.- Sorgo molido                     | 27.- Finalizador de cerdos           |
| 8.- Lechonina                        | 28.- Pasta de soya                   |
| 9.- Crecentina                       | 29.- Salvado de trigo                |
| 10.- Engordina                       | 30.- BPI (Base para engorda inicial) |
| 11.- Pasta de soya                   | 31.- Gluten de maíz                  |
| 12.- Sorgo molido                    | 32.- Finalizador de pollos           |
| 13.- Cartarina                       | 33.- Harina de pescado               |
| 14.- Salvado de maíz                 | 34.- Pasta de soya                   |
| 15.- Salvado de trigo                | 35.- Finalizador de cerdos           |
| 16.- Pasta de soya                   | 36.- Gluten de maíz                  |
| 17.- BCL-M (Base cría de leche)      | 37.- Salvado de trigo                |
| 18.-BPEI (Base para engorda inicial) | 38.- Pasta de girasol                |
| 19.- Girasol                         | 39.- Pasta de soya                   |
| 20.- BPEF (Base para engorda final)  | 40.- Levadura de cerveza desecada    |
|                                      | 41.- Gluten de maíz                  |
|                                      | 42.- Harina de pescado               |
|                                      | 43.- Cáscara de malta                |
|                                      | 44.- Harina de alfalfa               |

FALLA DE ORIGEN

- 45.- Soya integral
- 46.- Gluten de sorgo
- 47.- Pasta de girasol
- 48.- Salvado de trigo
- 49.- Pasta de soya
- 50.- Salvado de malz

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Alexopoulos, C. J.  
INTRODUCCION A LA MICOLOGIA.  
Eudeba Manuales. Buenos Aires, Argentina.
- 2.- Anderson, A. W.  
"THE SIGNIFICANCE OF YEAST AND MOLDS IN FOODS".  
FOOD TECHNOLOGY.  
Feb. 1977 (31:2:47-51)
- 3.- Beuchat, L. R.  
"MICROBIAL ALTERATIONS OF GRAINS, LEGUMES AND OLISEEDS."  
FOOD TECHNOLOGY.  
May 1978 (32:5:193-197)
- 4.- DeLashmuff, R. E.  
MYCOLOGY: TECHNICAL PROCEDURE MANUAL  
1975.
- 5.- Fields, M.  
FUNDAMENTALS OF FOOD MICROBIOLOGY.  
AVI Ed.  
1979.
- 6.- Girard, H. y R. Rougieux.  
TECNICAS DE MICROBIOLOGIA AGRICOLA.  
Ed. Acribia. España.  
1964.
- 7.- Heath, M., D. Metcalfe y R. Barnes.  
FORRAJES.  
The Iowa State Univ. Press. E. U. A.  
1975.
- 8.- Lodder, J.  
THE YEASTS: A TAXONOMIC STUDY.  
North-Holland Publishing.  
1970.
- 9.- Mendoza, E. y J. Asenja.  
"LA PRODUCCION DE ALIMENTOS MEDIANTE EL USO DE MICROORGANISMOS."  
REV. TECNOL. ALIMENT.  
1977 (12:165-168)
- 10.- McDonald, P., Edwards y J. Greenhalgh.  
NUTRICION ANIMAL.  
1969.

FALLA DE ORIGEN



- 11.- Pepler, H. J.  
"YEAST PROPERTIES ADVERSELY AFFECTING FOOD FERMENTATIONS."  
FOOD TECHNOLOGY.  
Febr 1977 (31:2:62-65)
- 12.- Reed, G.  
"USE OF MICROBIAL CULTURES: YEAST PRODUCTS."  
FOOD TECHNOLOGY.  
Ene:1981 (35;1:80-84)
- 13.- Servin, B.  
"PROTEINAS DE ORGANISMOS UNICELULARES."  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.  
Sept.-Oct./1971.
- 14.- Waker, H.  
"SPOILAGE OF FOOD BY YEASTS."  
FOOD TECHNOLOGY.  
Febr 1977 (31:2:57-61)
- 15.- Bonifaz, A.  
"MICOLOGIA MEDICA BASICA"  
Ed. Mendez Cervantes, México  
1990. (p. 313)
- 16.- Herrera, T. y Ulloa, M.  
"EL REINO DE LOS HONGOS"  
FCE-UNAM. MÉXICO  
1990.

FALLA DE ORDEN