

# LEVADURAS

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituídas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9  $\mu\text{m}$  de ancho y 2 a más de 20  $\mu\text{m}$  de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. Algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos (1).

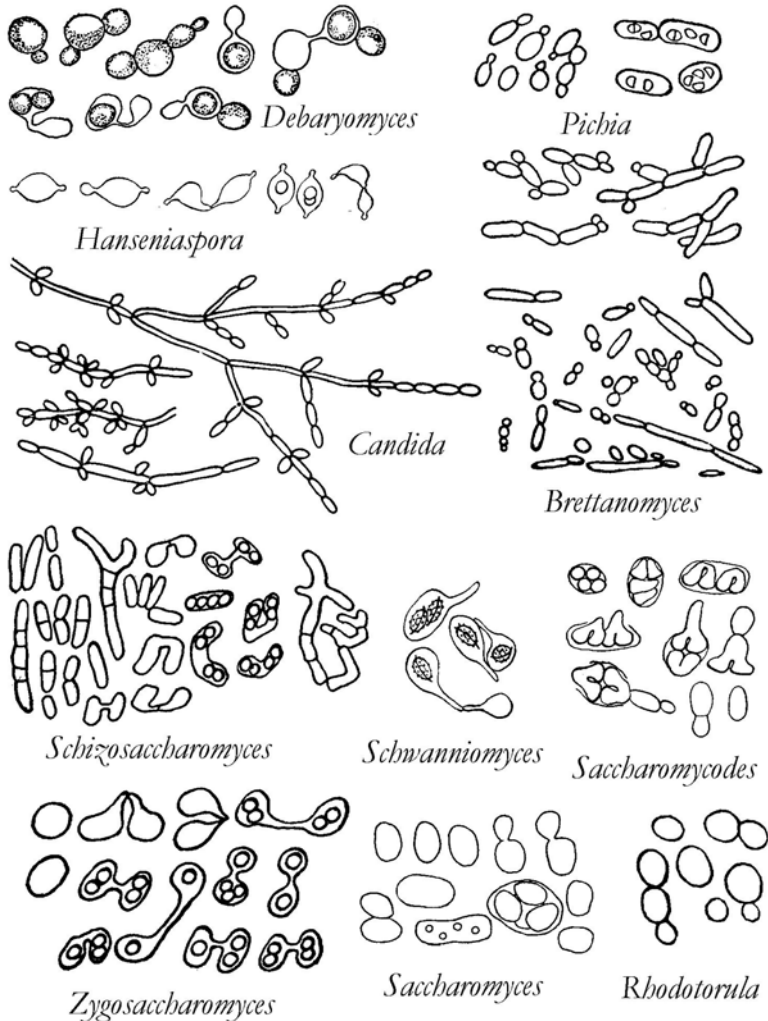
En general, las células de las levaduras son conidios formados según diferentes tipos de conidiogénesis. En *Saccharomyces* una célula madre da lugar a la formación de yemas en diferentes puntos de la superficie produciendo en cada uno sólo una célula hija (blastoconidio o blastospora), pero en *Rhodotorula* o *Cryptococcus* todos los brotes surgen desde un solo punto. La célula apiculada de *Saccharomycodes* brota repetidamente de cada extremo, extendiéndose un poco con cada conidio formado. En el caso de *Schizosaccharomyces* la célula es casi cilíndrica y los conidios tienen una base muy ancha. Las levaduras hifales, como *Trichosporon* o *Geotrichum* producen artroconidios (o artrosporas) por formación de septos dobles en las hifas, que luego se escinden (2).

Las levaduras pertenecen a dos clases de hongos: ascomicetos o basidiomicetos, aunque muchas de ellas se presentan comúnmente en la forma imperfecta. Las levaduras ascomicéticas forman ascas libres, con 1 a 8 ascosporas, y en las especies hifales las ascas están desnudas. Las ascosporas de las levaduras son algo más resistentes al calor y la desecación que las células vegetativas, si bien tienen mucha menor resistencia térmica que las esporas bacterianas, por lo que mantienen la viabilidad de la especie durante los cambios adversos del medio ambiente (1).

El modo de diploidización en las levaduras ascomicéticas se efectúa entre una célula y su brote, como es el caso de *Schwanniomyces*, *Debaryomyces* y otras, o puede efectuarse entre dos células independientes, por fusión directa (*Schizosaccharomyces*) o por medio de un tubo de conjugación

(*Zygosaccharomyces*). En el caso de levaduras estabilizadas en el estado diploide, éste se restaura por conjugación de las ascosporas dentro del asca (*Saccharomyces*). En ciertos casos, si el cigoto se reproduce por mitosis, existen en el mismo ciclo las fases vegetativas haploide y diploide (*Saccharomyces*) (2).

La figura siguiente muestra un esquema de varios géneros de levaduras (3).



Entre las levaduras basidiomicéticas se encuentran *Filobasidium* (teleomorfo de *Cryptococcus*) que forma hifas con fíbulas, *Sporobolomyces* que produce esporas exógenas en la punta de una protuberancia de la célula y las descarga con fuerza, y *Rhodotorula* que, como la anterior, forma un pigmento carotenoides rojo (2).

Las levaduras son organismos aerobios y aunque muchas especies son fermentadoras, otras no lo son, como los géneros *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Las levaduras suelen fermentar unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y disacáridos. El género *Saccharomyces* y unos pocos más, son fermentadores enérgicos de los azúcares bajo condiciones anaeróbicas. *Dekkera*, su anamorfo *Brettanomyces* y algunas otras, fermentan glucosa más rápido en aerobiosis (4).

Las levaduras oxidativas, como *Pichia membranaefaciens*, producen niveles inaceptables de acetaldehído, ésteres y ácido acético en vinos. Las especies fermentativas *Z. bailii*, *Dekkera intermedia* y *Saccharomycodes ludwigii* causan una carbonatación excesiva, sedimento, turbiedad, ácidos y ésteres desagradables. Sólo *Schwanniomyces*, *Lipomyces* y *Saccharomyces diastaticus* pueden hidrolizar almidón. Otras poseen actividad pectinolítica. Muchas especies sintetizan todas las vitaminas necesarias, pero algunas requieren biotina y otros compuestos (5).

Las levaduras 'asesinas' secretan polipéptidos tóxicos para otras especies de levaduras, aún del mismo género, y además suelen inhibir a otros organismos. Pueden ser contaminantes en la fermentación de mostos, dominando a la cepa industrial para dar un producto espúreo, aunque por otra parte una cepa 'asesina' seleccionada puede suprimir a las levaduras salvajes indeseables (1).

## AMBIENTE

Las levaduras se encuentran con frecuencia en las hojas y las flores, aunque en número muy pequeño, siendo los insectos un importante vector de diseminación de las mismas. Están sobre la epidermis de frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico. El suelo es un importante reservorio, desde el cual pueden llegar a los alimentos, pero también suelen hallarse en el agua de lagos y

ríos. Su presencia depende de la temperatura, el pH, la humedad y la disponibilidad de azúcares simples (1).

Las levaduras constituyen la causa más común de alteración de frutas y jugos, pues tienen azúcares fermentables y elevada acidez. Comúnmente asociadas con el deterioro de las frutas secas están *Zygosaccharomyces rouxii* y especies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaryomyces* y *Pichia*. También forman parte de la microbiota de productos lácteos y cárnicos.

Las levaduras de las pasturas y suelo de los corrales pueden ser transportadas a los mataderos y de allí a las carcasas. *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus luteolus*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Debaryomyces hansenii* suelen hallarse en carcasas de cordero y cerdo. Por otra parte, *Schwanniomyces* y *Lipomyces* son géneros típicos del suelo.

Las principales especies presentes en los productos lácteos son *Kluyveromyces marxianus* y *D. hansenii*, aunque también se encuentran *R. mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* y *Candida parapsilosis* (4).

## IDENTIFICACIÓN

La forma no es un indicio para la identificación de las especies, ni la variedad morfológica en un mismo cultivo es una prueba de la contaminación del mismo. El comportamiento fisiológico es muy importante para la identificación. Mientras que las características morfológicas y sexuales permiten generalmente identificar el género, las características bioquímicas definen la especie de la levadura, por ejemplo la utilización de compuestos carbonados (almidón, L-arabinosa, cadaverina, celobiosa, 2-cetogluconato, citrato, eritritol, galactosa, inositol, lactosa, lisina, maltosa, manitol, melibiosa,  $\alpha$ -metilglucósido, rafinosa, ramnosa, sacarosa, trehalosa, xilosa) y nitrogenados (nitratos), el crecimiento a 37 °C, la fermentación de glucosa y sacarosa, la necesidad de vitaminas, la resistencia a la cicloheximida, la hidrólisis de urea o el desarrollo en presencia de algunos inhibidores (acetato de sodio 1%, cloruro de sodio 16%, glucosa 60%) (4).

La identificación sólo puede llevarse a cabo sobre una cepa en cultivo puro, previamente aislada en una placa de medio gelificado. Se comienza examinando el aspecto de los cultivos tras incubación a 28°C durante 3 días o más. Se observa el

aspecto del cultivo en medio líquido, la formación de sedimento y su aspecto (fino, grueso), la película superficial y la producción de gas. Se examina el cultivo en el mismo medio con 2% de agar para definir el tamaño de las colonias, la forma (contornos nítidos o irregulares, convexas o cóncavas), la superficie (mate o brillante) y la pigmentación (5).

Las características micromorfológicas se estudian sobre preparaciones microscópicas efectuadas en estado fresco. La aptitud para la filamentación se manifiesta en un microcultivo (ver capítulo 3) sobre agar harina de maíz (harina de maíz 30 g, agar 20 g, agua 1 litro (4)) tras una incubación de 3-5 días. Se observa si se trata de pseudomicelio o micelio verdadero, además la abundancia y ramificación. La formación de clamidoconidios (= clamidosporas) es característica de *Candida albicans*, *Metschnikowia* y ocasionalmente se puede ver en cultivos viejos de *Trichosporon* o *Cryptococcus*. Las balistosporas de *Sporobolomyces* u otros, al ser proyectadas al aire se acumulan sobre la tapa de la caja de Petri.

Para la identificación de las levaduras ascomicéticas es necesario poner en evidencia las ascas y las ascosporas. Al no tener todas las especies las mismas exigencias, se deben utilizar simultáneamente varios medios de esporulación y sembrarlos a partir de un cultivo en fase exponencial (5).

El método de identificación simplificado dado por Déak & Beuchat (4) permite la rápida y correcta identificación del 91% de las levaduras, e incluye todas las comunes en los alimentos.

Las pruebas de asimilación se llevan a cabo agregando los azúcares al medio base nitrogenado estéril (sulfato de amonio 5 g, fosfato monopotásico 5 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro) y los compuestos con nitrógeno al medio base carbonado (glucosa 10 g, fosfato monopotásico 1 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro).

La necesidad de vitaminas se demuestra volcando una gota de una suspensión de células en agua estéril sobre un caldo libre de vitaminas (glucosa 10 g, sulfato de amonio 5 g, fosfato monopotásico 1 g, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5 g, agar 20 g, agua 1 litro) y como testigo se emplea el mismo medio adicionado de 10 mL de extracto de levadura al 2% (4).

La fermentación se demuestra por el cambio de pH y la retención de gas en el pequeño tubo invertido colocado dentro del medio base (triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, agua 1 litro) al que se añadió 2,5 ml de solución etanólica de azul de bromotimol y 20 g de glucosa o sacarosa.

Para demostrar el crecimiento a baja actividad agua, alta acidez o la resistencia a la cicloheximida, se agrega al medio base estéril (triptona 5 g, extracto de levadura 5 g, glucosa 5 g, agua 1 litro), 160 g de cloruro de sodio o 600 g de glucosa o 10 mL de ácido acético glacial o 10 mL de una solución de cicloheximida al 1%. La hidrólisis de urea se observa por la alcalinización del medio de cultivo (extracto de levadura 0,1 g, fosfato monopotásico 1 g, fosfato disódico 1 g, urea 20 g, solución de rojo de fenol al 1% 1 mL, agua 100 mL) (4).

#### PRODUCCIÓN DE ASCOSPORAS

A partir de un cultivo de 24-36 hs en agar-malta-levadura sembrar abundante cantidad en la cara superior de un bloc de yeso (2 x 2 x 0,5 cm) colocado en una caja de Petri con agua estéril, también hacer estrías sobre el agar de Gorodkova y agar-papa-zanahoria. Incubar a temperatura ambiente entre 7 y 20 días.

Examinar periódicamente los preparados en fresco con azul-lactofenol, observar si hay producción de ascas, la forma y facilidad de ruptura, el número y la forma de las ascosporas y su posición en el asca.

*AGAR-MALTA-LEVADURA.* Extracto de malta 3 g, extracto de levadura 3 g, peptona 5 g, glucosa 10 g, agar 20 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

*AGAR-PAPA-ZANAHORIA.* Papa molida 20 g, zanahoria molida 20 g, agar 20 g, agua corriente 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

*AGAR DE GORODKOWA.* Glucosa 1 g, triptona 10 g, extracto de levadura 2 g, agar 20 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (6).

#### REFERENCIAS

1. Carlile MJ *et al.* 2001. *The Fungi*. 2ª ed. Academic Press, San Diego, p 70.
2. Kendrick B. 2000. *The Fifth Kingdom*. 3º ed. Focus Publishing, Newburyport, p 112.
3. Salle AJ. 1965. *Bacteriología*. Gustavo Gili, Barcelona, cap 5.

4. Déak T, Beuchat LR. 1996. Handbook of Food Spoilage Yeasts. CRC Press, Boca Ratón, cap 7.
5. Leveau JY, Baux M. 2000. Microbiología Industrial. Acribia, Zaragoza, cap 3.
6. Mueller GM *et al.* 2004. Biodiversity of Fungi. Elsevier, Amsterdam, p 595.