

COMUNICACIONES BOTANICAS DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL DE MONTEVIDEO

Número 11

1943

Volumen I

LA IDENTIDAD ENTRE *CANDIDA KRUSEI* (CASTELLANI) Y *MYCODERMA CEREVISIAE* DESMAZIÈRES

J. E. MACKINNON & R. C. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE

El estudio de las levaduras por los modernos métodos de STELLING-DEKKER (1) y de LODDER (2) nos ha permitido apreciar analogías muy grandes entre cultivos obtenidos de secreciones patológicas del hombre y otros procedentes de frutas, líquidos fermentados, etc.

Un caso interesante es el de la levadura llamada *Candida Krusei*. Hemos tenido ocasión de estudiar doce cepas de muy diversa procedencia y llegado a la conclusión de que no es posible establecer diferencias de carácter específico entre esas cepas.

PROCEDENCIA DE LAS CEPAS EXPERIMENTADAS

1. *Cepas de frutas*. — Estudiamos cuatro. Todas fueron recibidas de E. M. Mrak, de Berkeley, California. Fueron aisladas dos de ellas de uvas (números 818 y 820), una de dátiles (número 819) y otra de ciruelas (número 812).

2. *Cepas de líquidos fermentados*. — Dos fueron aisladas en Bolivia de la bebida indígena llamada "chicha", por F. Veintemillas, de La Paz, Bolivia, y enviadas a nuestro laboratorio para ser identificadas. Estas dos cepas figuran catalogadas en nuestra micoteca con los números 772 y 774. Junto con estas cepas fueron aisladas otras que identificamos como *Saccharomyces cerevisiae*.

Una tercera cepa fué aislada por nosotros del vino a término de fermentación (número 857).

3. *Cepas de origen humano*. — Una fué recibida de M. Langeron, de la Facultad de medicina de París, figurando en nuestra micoteca con el número 640.

Otra (número 474) fué recibida de S. Mazza, de la Misión de estudios de Patología regional argentina. Fué aislada de lesiones periungueales y fué denominada *Monilia inexpectata* por MAZZA, NIÑO & EGÜEZ, en 1930 (3).

Otra fué aislada por nosotros de la piel sana de un hombre (número 875) y otras dos de los esputos (números 836 y 886).

DESCRIPCION DE LOS CULTIVOS

En nuestros estudios hemos seguido, en general, los métodos y técnicas recomendados por STELLING-DEKKER (1), LODDER (2) y LANGERON & GUERRA (4), salvo excepciones que oportunamente indicaremos.

Dada la similitud entre las cepas estudiadas, expondremos sus características en conjunto.

1. — Caracteres macroscópicos.

Gelosa glucosada al 2% y peptonada al 1%. — Cultivos chatos con bordes ondulados, rodeados de una orla de filamentos. La superficie es al principio algo brillante, pero al cabo de dos a tres días es mate, de color blanco-crema, lisa o con sureos muy poco acentuados. La consistencia es cremosa. Se observa escasa filamentización hacia la profundidad. Algunas cepas no son tan mates como otras, poseyendo algún brillo. A la temperatura de 37° la falta de brillo se acentúa.

Mosto de cerveza gelosado. — La falta de brillo es más acentuada, así como la ondulación del borde y la filamentización periférica.

Agua peptonada al 1% y glucosada al 2%. — En 24 horas se produce un velo flexible y mate, liso al principio y luego de varios días puede presentar ligeros pliegues. El cultivo sube por las paredes del tubo de 4 a 7 mm. por encima de la superficie del medio. Al agitar el cultivo el velo cae en trozos. El sedimento es abundante. No se observa enturbiamiento.

Mosto de cerveza. — Las características del cultivo son las mismas que en agua peptonada-glucosada.

Medio con alcohol etílico. — Se utilizó el medio recomendado por LODDER (agua destilada 100 cc., sulfato de magnesio Ogr05, fosfato monopotásico Ogr 1, sulfato de amonio Ogr 1 y alcohol etílico 3cc.). El alcohol etílico se agregó siempre un momento antes de la siembra.

A 30° C se produjo siempre abundante desarrollo con formación de velo liso y mate. El cultivo trepó de 5 a 8 mm. por las paredes del tubo, encima del nivel del medio.

2. — Caracteres microscópicos.

Fueron estudiados en cultivos sobre láminas gelosadas con agar-agua de papa y con agar peptonado y glucosado.

Leves diferencias se aprecian entre las distintas cepas. El creci-

miento comienza bajo forma de levadura algo alargada. Estas formas miden al principio 3 a 5 μ de largo por 2 a 3 μ de ancho. Se observa, sin embargo, algunas formas redondas. En el borde del cultivo se forman los pseudomicelios cuyos segmentos miden hasta 50 μ de largo y a veces algo más aún. En la extremidad distal de cada segmento se forma poca cantidad de blastoesporos que tienen tendencia a alargarse. Si estos blastoesporos no son muy largos se observan verticilos irregulares de blastoesporos en la extremidad distal de cada segmento (figura 3); en cambio, si los blastoesporos son muy largos, formando pseudofilamentos, el cultivo toma un aspecto arboriforme (figuras 1 & 2).

En ninguna cepa observamos la formación de verdaderos filamentos ni de clamidosporos.

Los segmentos que constituyen los pseudofilamentos no presentan gran adhesión entre ellos.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Temperatura óptima. — Elevada, 30-37° C.

Fermentaciones. — Fueron estudiadas en tubos con agua peptonada al 1%, pH 7, agregando el azúcar en la proporción de 4%. Una vez sembrado, dejamos caer sobre la superficie del líquido unas gotas de una mezcla de parafina y vaselina líquida caliente, que al enfriarse forma un tapón que se eleva a la menor producción de gas. Como indicador empleamos el de ANDRADE en la proporción de medio por ciento.

Es positiva la fermentación con la glucosa. Negativa con la maltosa, la sacarosa, la galactosa y la lactosa. La fermentación de la glucosa es lenta y la producción de gases escasa.

Acción de los azúcares sobre el desarrollo. — Nunca logramos auxanogramas legibles, usando el medio aconsejado por LODDER, con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, o bien sin fuente de nitrógeno, como lo aconsejan LANGERON & GUERRA. La causa de este fracaso no la comprendemos. Ensayamos otros procedimientos para apreciar la influencia de los distintos azúcares sobre el crecimiento de *Cándida Krusei*; la siembra en el medio líquido de LAURENT (5) nos dió buenos resultados, pues en este medio *C. Krusei* produce velo grueso con la glucosa, tenue con la maltosa y la galactosa; no produce velo con la sacarosa, la lactosa y la rafinosa.

Auxanogramas con compuestos nitrogenados. — El método auxanográfico dió buen resultado cuando estudiamos la acción sobre el crecimiento de las fuentes de nitrógeno. Obtuvimos auxanogramas positivos con urea, sulfato de amonio, asparagina y peptona; negativo con nitrato de potasio.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL

Según nuestra experiencia, *C. Krusei* carece de virulencia para el conejo, el cobayo, la rata y el ratón.

FORMACIÓN DE ASCOS

LANGERON & GUERRA, en la página 53 de su monografía, afirman haber hallado ascos con ascosporos, semejantes a los de *Saccharomyces*, en una cepa denominada por MAZZA, NIÑO & EGÜEZ *Monilia inexpectata*. En 1934, TALICE & MACKINNON (6) colocaron esta cepa en el género *Mycocandida* Langeron & Talice. En la página 483, LANGERON & GUERRA afirman haber estudiado una nueva cepa de *M. inexpectata*, precedente de Talice y Mackinnon, que no producía ascos y tiene todas las características de *Candida Krusei*, según una anotación al pie de la página. LANGERON & GUERRA hacen, por lo tanto, referencias a dos cepas; pero en realidad no se trata más que de una, pues con el nombre de *Monilia inexpectata* hemos poseído en nuestro laboratorio una sola cepa que nos fué enviada por el doctor Mazza y, en consecuencia, LANGERON & GUERRA habrían observado ascos en *C. Krusei*.

Nosotros hemos realizado una cuidadosa búsqueda de ascos en la cepa en que LANGERON & GUERRA los hallaron, obteniendo resultado negativo. Podría suponerse que la observación de ascos de LANGERON & GUERRA fuera debida a una confusión de cultivos; pero, una observación posterior nuestra nos hace creer que no ha habido tal confusión. En efecto, hallamos un típico asco con cuatro ascosporos, semejantes a los de un *Saccharomyces*, en nuestra cepa 575 aislada de la piel sana. Esta cepa, es en todas sus características igual a las otras de la especie *C. Krusei*; es la única cepa, catalogada previamente en el género, en que hallamos ascos. Frente a esta nueva observación de ascosporos, en una cepa identificada a *C. Krusei*, creemos lógico pensar que esta especie puede a veces producirlos.

La investigación de ascos se realizó en los siguientes medios: en tubos de papa glicerinada y de zanahoria glicerinada, en medio de GORODKOWA y por el método del block de yeso, siendo éste último el que mejor resultado ha dado.

La técnica tintorial empleada para poner en evidencia los ascosporos fué la de KUFFERATH.

VARIACIONES

Candida Krusei es aparentemente una especie monomórfica. Sólo pequeñas diferencias individuales hemos comprobado. Algunas cepas producen cultivos algo brillantes. Unas producen un velo más grueso



Figura 1

Cepa 575, aislada de la piel sana de un hombre. Aspecto arboriforme.

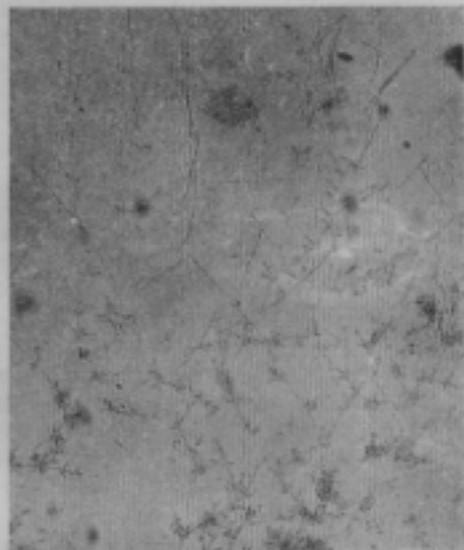


Figura 2

Cepa 774, aislada de la "chicha". Aspecto arboriforme.

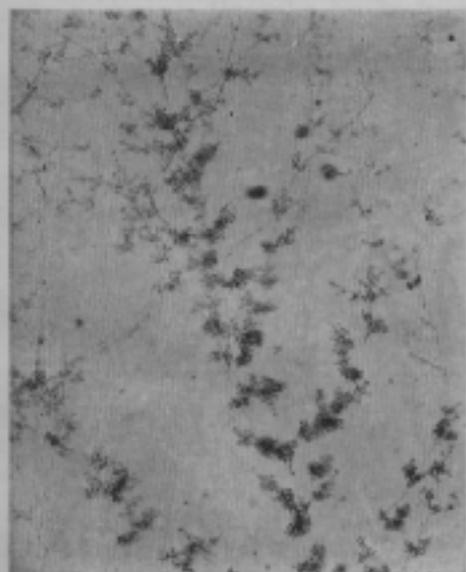


Figura 3

Cepa 836, aislada de los esputos de un hombre. Vestigios irregulares de blastosporas en la extremidad distal de los segmentos de los pseudofilamentos.



Figura 4

La misma cepa de la figura 3. Aspecto arboriforme.

que otras y hasta con algunos pliegues. LANGERON & GUERRA observaron una cepa cuyos cultivos eran algo irregulares, mamelonados.

Efectuamos experiencias de disociación en cultivos viejos, sin resultado.

HABITAT

Esta especie parece muy común en el medio ambiente. No es frecuente en el hombre. Nosotros la hallamos en dos ocasiones en los esputos; una vez asociada a *C. tropicalis* y otra fué obtenida de esputos en los que el examen directo no mostraba levaduras; en ambos casos se puede pensar que la levadura provenía de la boca de los enfermos, donde habría llegado con alimentos o bebidas. CASTELLANI (7) halló cepas de *C. Krusei* en los esputos, también asociadas a otras especies. La otra cepa la aislamos de la piel sana. BENHAM & HOPKINS la hallan en el intestino de 13% de las personas sanas y en la piel de 1%. NEGRONI (8) en 30% de las heces de 50 sujetos. KNIGHTON (9) refiere su hallazgo de varias cepas en la cavidad bucal.

En la naturaleza *C. Krusei* parece muy común y esto es probado en varias publicaciones. MRAK & Mc CLUNG (10) aislaron de uvas cepas del género *Candida*, que entran en el grupo 2 de DIDDENS & LODDER (grupo *Krusei*). Lo mismo lograron MRAK, PHAFF y VAUGHN (11) de dátiles. MRAK, PHAFF, VAUGHN & HANSEN (12) aislaron de higos 33 cepas de *Candida*, de las cuales 26 pertenecían a la especie *C. Krusei*. MRAK ha tenido la gentileza de cedernos cultivos de estas levaduras, habiendo nosotros clasificado cuatro de ellas como *C. Krusei*; procedían de uvas, dátiles y ciruelas.

VEINTEMILLAS nos envió de Bolivia cultivos de levaduras aisladas de la bebida denominada "chicha", producida por fermentación del maíz. Dos de los cultivos no difieren de las habituales cepas de *C. Krusei*. Nosotros también hemos aislado una vez *C. Krusei*, de mosto de uva en fermentación.

RESUMEN DE LOS CARACTERES Y PROPIEDADES DE *Candida Krusei*

C. Krusei se distingue de las otras especies del género por sus cultivos lisos y mates y por producir velo que trepa por las paredes del tubo. Produce pseudomicelio con facilidad, pero no verdadero micelio y clamidosporos. Fermenta solamente la glucosa y de manera leve. Utiliza bien la glucosa, menos la maltosa y la galactosa; no utiliza la lactosa, la sacarosa ni la rafinosa. Como fuentes de nitrógeno utiliza la urea, la asparagina, el sulfato de amonio y la peptonina; no utiliza el nitrato de potasio. Crece bien a 37° C. Carece de virulencia experimental. Es una especie frecuente en la naturaleza.

CONSIDERACIONES

La mayor parte de nuestras cepas proceden de otro origen que el hombre. Tres cepas fueron aisladas de líquidos fermentados, ya sea de la "chicha" o de mosto de uva casi al final de la fermentación. Estas tres cepas fueron aisladas junto con *Saccharomyces cerevisiae*. SORIANO (13) al estudiar la fermentación de la "chicha", aisló cepas de *Mycoderma*.

El género *Mycoderma*, en el sentido de LEBERLE, comprende especies con una morfología semejante a la de *C. Krusei*, pero no estarían dotadas de propiedades fermentativas. Sin embargo, algunas cepas según LASCHÈ (citado por GUILLIERMOND [14]), producirían pequeñas cantidades de alcohol. Nuestras cepas, tanto las de origen humano como las otras, fermentan la glucosa con lentitud, a veces recién luego de cinco y aún de nueve días, produciendo poco gas, levantando el tapón de parafina sólo 1 o 2 centímetros. Las propiedades fermentativas fueron también estudiadas en agua de levadura con tubo invertido, obteniendo los mismos resultados excepto con la cepa 836 (aislada de los esputos), que en estas condiciones no produjo gases. Si a esta experiencia le hubiéramos dado valor negativo no dudáramos en identificar la cepa 836 a *Mycoderma cerevisiae*. El estrecho acercamiento o identidad entre *Candida* y los *Mycoderma* parece evidente. *C. Krusei* sería clasificada como *M. cerevisiae* por un técnico en microbiología industrial, dado sus cultivos lisos y la producción de velo en medio con alcohol. STOVALL & BUBOLZ (15) afirmaron que *C. Krusei* es un *Mycoderma*, porque produce velo en los medios con azúcar.

El hallazgo de ascosporos por LANGERON & GUERRA en la cepa 474 y el nuestro similar en la cepa 575, nos conduciría a clasificar estos cultivos en las levaduras perfectas. Como GUILLIERMOND, creemos que los *Mycoderma* son formas imperfectas de especies del género *Pichia* Hansen. Dentro del género, entre las especies admitidas por STELLING-DEKKER, nuestras cepas se asemejan a *Pichia alcoholophila* Klöcker. STELLING-DEKKER no halló ascos en esta especie, lo cual revelaría que fácilmente perdería esta propiedad; esto mismo sucedería también en otras especies del género *Pichia*. Además, cuando estas levaduras producen ascos, lo hacen en poca cantidad.

Nuestras cepas se asemejan también a *Pichia membranaefaciens* Hansen y a *Pichia calliphorae* Klöcker, que STELLING-DEKKER considera una variedad de la primera. *P. alcoholophila* es además una especie termófila y forma un gran anillo sobre el vidrio como *C. Krusei*. STELLING-DEKKER no le atribuye capacidad fermentativa, pero KLÖCKER observa leve fermentación de la glucosa, como se ve en nuestras cepas. Parece, pues, probable que *Candida Krusei* sea una forma imperfecta de *Pichia alcoholophila*.

CONCLUSIONES.

No se observó diferencias apreciables entre los cultivos aislados de hombre, identificables a *Candida Krusei* (Castellani) y los cultivos aislados de bebidas fermentadas y de frutas dulces. Estas cepas no son diferenciables de *Mycoderma cerevisiae* Desmazières.

Creemos que la única duda que podría plantearse en la identidad entre las dos especies es que *C. Krusei* tiene una débil capacidad para fermentar la glucosa, lo que no estaría de acuerdo con la definición que del género *Mycoderma* proporciona LODDER. Sin embargo, esta objeción carecería de valor por dos razones: a) *C. Krusei* tiene una acción fermentativa muy débil, que a veces no se manifiesta más que cuando el medio de cultivo posee una concentración de glucosa alta (3-5%) y, además, una cepa produjo gases sólo bajo tapón de parafina y no por el procedimiento del tubo invertido; y b) *Mycoderma cerevisiae* podría producir una leve fermentación alcohólica, según LASCHÉ. Además, es frecuente que cuando se estudian cepas con débil acción fermentativa los autores se contradigan, por ejemplo, *Pichia alcoholophila* Klöcker, según su autor tiene una débil acción fermentativa sobre la glucosa, pero STELLING-DEKKER niega esa acción, a pesar de haber estudiado la cepa de KLÖCKER. Las levaduras del género *Pichia* son consideradas como las formas perfectas de *Mycoderma*.

El hallazgo de ascos en dos cepas identificables a *C. Krusei*, nos hace creer que esta especie y *Mycoderma cerevisiae* son probablemente formas imperfectas de *Pichia alcoholophila* Klöcker, dada su termofilia y la similitud de sus características.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) STELLING-DEKKER, N. M. — Die sporogenen Hefen. Amsterdam. 1931.
- (2) LODDER, J. — Die anasporogenen Hefen. Amsterdam. 1934.
- (3) MAZZA, S., NIÑO, F. L. & EGÜEZ, A. — Perionixis blastomicética por *Monilia* (n. sp.). *Quinta reun. Soc. arg. Pat. reg. Norte*: 284-288. 1930.
- (4) LANGERON, M. & GUERRA, P. — Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Ann. Paras. hum. et comp.*, 16:26-84, 162-179, 430-476, 481-525. 1938.
- (5) LAURENT, E. — Nutrition hydrocarbonée et formation de glycogène chez la levure de bière. *Ann. Inst. Pasteur*, 3:113-125. 1889.
- (6) TALICE, R. V. & MACKINNON, J. E. — Determinación de algunas cepas argentinas de hongos levuriformes. *Octava reun. Soc. arg. Pat. reg. Norte*: 160-167. 1934.
- (7) CASTELLANI, A. & CHALMERS, A. J. — *Manual of Tropical Medicine*. 2da. ed. Londres. 1913.

- (8) NEGRONI, P. & FISCHER, I. — Flora micológica (Eumycetes) de las materias fecales. *Rev. Inst. Bact.*, Buenos Aires, 9:305-328. 1940.
- (9) KNIGHTON, H. T. — A study of *Monilia* and other yeastlike organisms found in the oral cavity. *Jrl. Dent. Res.*, 18:103-125. 1939.
- (10) MRAK, E. M. & MC CLUNG, L. S. — Yeast occurring on grapes and in grape products in California. *Jrl. Bact.*, 40:395-407. 1940.
- (11) MRAK, E. M., PHAFF, H. J. & VAUGHN, R. H. — Yeast occurring on dates. *Jrl. Bact.*, 43:689-700. 1942.
- (12) MRAK, E. M., PHAFF, H. J., VAUGHN, R. H. & HANSEN, H. N. — Yeast occurring in souring figs. *Jrl. Bact.*, 44:441-450. 1942.
- (13) SORIANO, S. — Estudio microbiológico del proceso de la fermentación de la "chicha". *Rev. Inst. Bact.*, Buenos Aires, 8:231-321. 1938.
- (14) GUILLIERMOND, A. — The Yeasts. Transl. by Tanner. Nueva York. 1920.
- (15) STÓVALL, W. D. & BUBOLZ, A. — Identification of certain funguses pathogenic for man. *Am. Jrl. of Publ. Health*, 22:493-501. 1932.