

Aplicación de nuevas técnicas para el estudio fisiológico de los hongos levaduriformes

Por P. NEGRONI y C. A. N. DAGLIO

El estudio de los caracteres fisiológicos de los hongos levaduriformes es uno de los elementos más importantes que actualmente utilizamos para clasificar las especies tanto de las formas esporuladas (*Saccharomycetaceae*) como de las imperfectas.

Los trabajos de Ciferri y Redaelli ⁽¹⁾, Stelling-Dekker ⁽²⁾, Lodder, J. ⁽³⁾, Diddens y Lodder ⁽⁴⁾ y MacKinnon ⁽⁶⁾, han contribuido a uniformar los métodos de estudio facilitando la clasificación de este grupo de microorganismos.

Nos referimos en este trabajo al estudio de la propiedad de utilizar diferentes fuentes hidrocarbonadas y nitrogenadas que se efectúa mediante el método auxanográfico de Beijerinck ⁽³⁾ que consiste en el empleo de un medio sólido mineral con 0,5 % de sulfato de amonio cuando se investiga la acción de los hongos levaduriformes sobre las fuentes hidrocarbonadas y reemplazando el sulfato de amonio por 2 % de glucosa cuando se lleva a cabo el mismo estudio sobre las fuentes nitrogenadas. ⁽⁵⁾ Los correspondientes medios fundidos (repartidos en volumen de 20 ml. en tubos de 3 cm. de diámetro), son sembrados con una suspensión densa de un cultivo fresco del hongo en estudio, se vuelcan en cajas de Petri y una vez solidificados se los lleva a secar a la estufa a 37°C. durante 20 minutos. Se procede entonces a dividir con trazos de lápiz grueso, el fondo de la caja de Petri en sectores, se destapa la caja con las precauciones de asepsia propias de la técnica bacteriológica y se deposita con una espatulita de platino la fuente carbonada o nitrogenada en sustancia, en la base de cada sector. Cada vez que se cambia de sustancia se lava en agua destilada la espátula y se la flamea.

Cuando el hongo utiliza una determinada fuente de carbono o de nitrógeno se desarrolla intensamente en el sector donde ha sido depositada lo cual se traduce por una mancha blanquecina circular que abarca la zona de difusión de la sustancia correspondiente. Nosotros efectuamos dos lecturas, una al cabo de 48 horas y otra a los cuatro días de incubación a 28°C.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 21 de diciembre de 1948.

Como puede apreciarse por la sucinta descripción que antecede, se utilizan en este método sustancias no esterilizadas, lo cual origina con cierta frecuencia contaminaciones accidentales en la superficie del medio de cultivo y la consiguiente alteración de los resultados. Además, casi todos los autores ⁽⁷⁻⁸⁻⁹⁾ han comprobado que el auxanograma del nitrógeno da a menudo resultados discordantes. Estos hechos nos ha movido a introducir algunas variantes al método original de Beijerinck consistentes ante todo en utilizar soluciones de las fuentes hidrocarbonadas y nitrogenadas esterilizadas por filtración y luego en aplicar las técnicas de los cilindros de Oxford, de los discos de papel de filtro de Vincent y Vincent y de los hoyos de Fleming empleadas corrientemente para titular los antibióticos por su difusión, en los medios sólidos.

TÉCNICAS

Los hidratos de carbono utilizados fueron los siguientes: glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, galactosa y rafinosa, de los cuales se prepararon las correspondientes soluciones al 10 % en agua destilada y se filtraron por Seitz esterilizante EK.

Las fuentes de nitrógeno empleadas fueron las siguientes: peptona, asparagina, urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio, de las cuales se prepararon soluciones al 1 % en agua destilada, filtrándolas, como en la serie anteriormente mencionada, por filtro Seitz con placas EK.

El auxanograma del N y del C fué estudiado simultáneamente por los siguientes métodos: 1) original de Beijerinck que sirvió como término de comparación; 2) método de los anillos de Oxford; 3) impregnando con las soluciones expuestas discos de papel de filtro de 1 cm. de diámetro esterilizados previamente, y 4) depositando esas soluciones en los hoyos excavados con un sacabocados estéril de 0,5 cm. de diámetro en la parte media de cada sector marcado en el fondo de las cajas de Petri.

RESULTADOS

Como puede apreciarse en el cuadro adjunto en el estudio auxanográfico de las fuentes de carbono hemos obtenido en general los mejores resultados empleando el método de anillos de Oxford que fué también utilizado recientemente por Williams, T. I. (1948) para estudiar la acción de diferentes factores de crecimiento sobre el *Saccharomyces cerevisiae*. En muchos casos en los cuales el método de Beijerinck dió resultados dudosos el de anillos nos proporcionó en cambio resultados muy nítidos.



FIG. 1. — Estudio auxanográfico de las levaduras mediante el método de anillos de Oxford.

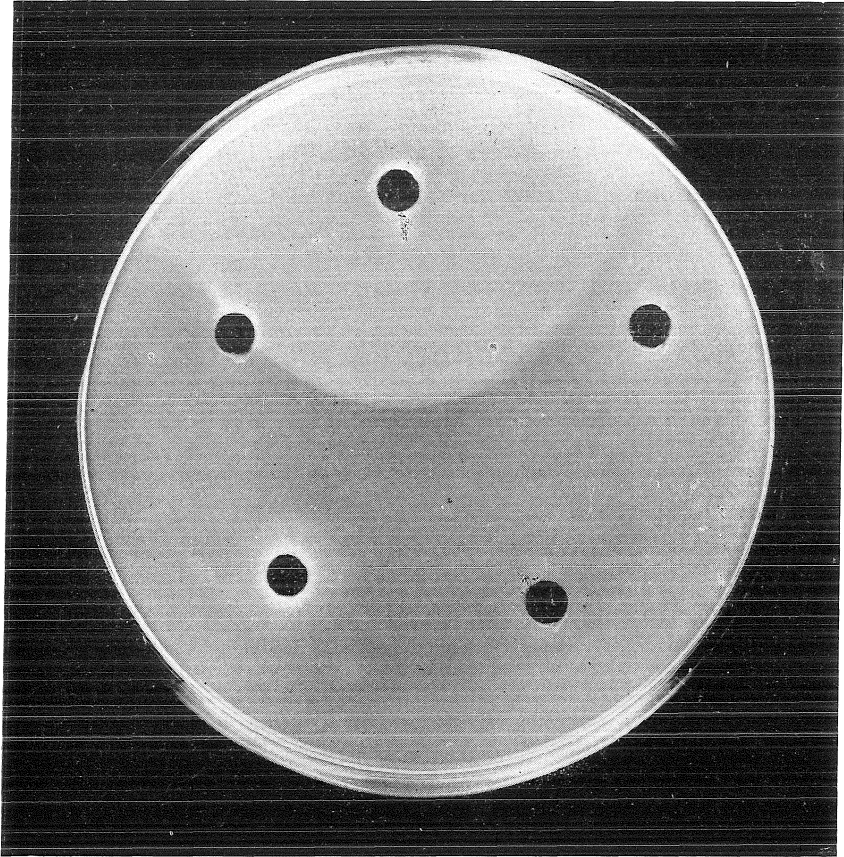


FIG. 2. — Estudio auxanográfico empleando el método de hoyos (agar cup method).

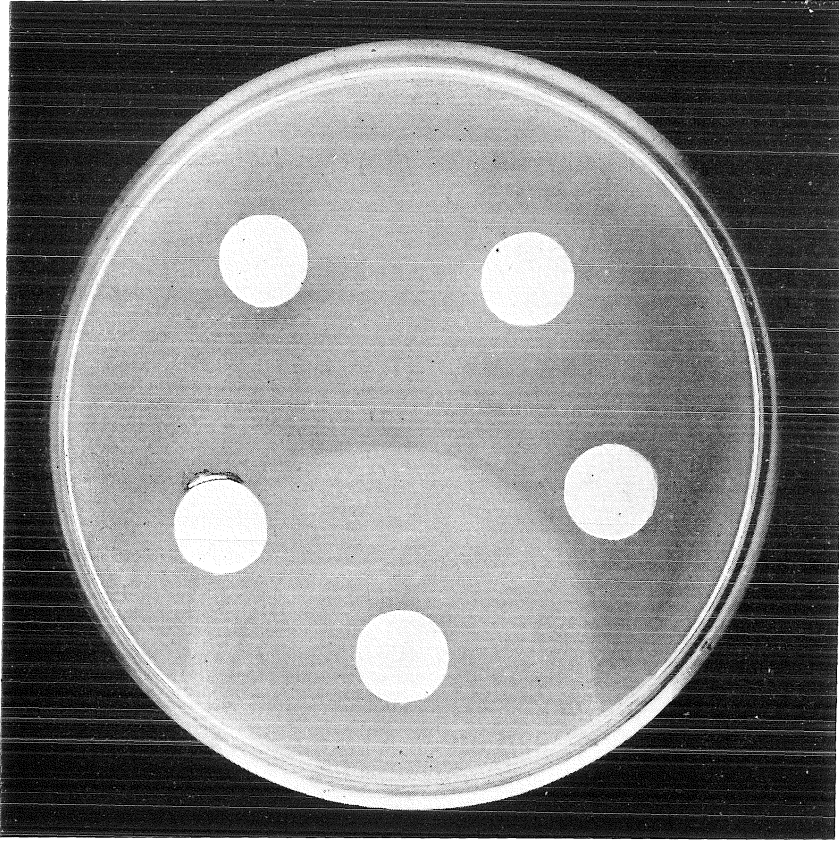


FIG. 3. — Método auxanográfico con discos de papel de filtro.

CULTIVO	AUXANOGRAMA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO						AUXANOGRAMA DEL NITRÓGENO				
	Gluc.	Galact.	Malt.	Lact.	Sac.	Raf.	Pept.	Asp.	Urea	Sulf.	Nitr.
<i>Candida albicans:</i>											
Beijerinck	+++	±	±	0	++	0	++	+	0	+	0
Anillos	++++	++++	++++	0	++++	0	++	+	0	0	0
Papeles	++	++	++	0	++	0	+++	+++	0	+++	0
Hoyos	++	++	++	0	++	0	++	+++	0	+++	0
<i>Candida sp. 546:</i>											
Beijerinck	+	±	±	0	+	0	++++	+++	0	+++	0
Anillos	+++	+++	+++	0	++	0	++	+++	0	0	0
Papeles	+	++	+	0	+	0	+	+++	0	++++	0
Hoyos	+	+++	++	0	++	0	++	++++	0	+++	0
<i>Candida sp. 599,6:</i>											
Beijerinck	+++	±	+	0	++	0	++	+	0	+	0
Anillos	++++	++++	++++	0	++++	0	+++	++	0	0	0
Papeles	+	+	+	0	+	0	++	++	0	++	0
Hoyos	++	++	++	0	++	0	+++	+++	0	+++	0
<i>Candida sp. 599,10:</i>											
Beijerinck	++	0	+	0	+	0	++	+	0	+	0
Anillos	++	+++	++	0	++	0	+	++	0	++	0
Papeles	?	++	?	0	+	0	+	?	0	+	0
Hoyos	+	++	+	0	+	0	+	?	0	?	0
<i>Candida sp. 599,11:</i>											
Beijerinck	++	+	++	0	++	0	++	+	0	+	0
Anillos	+	++	++	0	++	0	+	+	0	+	0
Papeles	+	++	++	0	++	0	+	?	0	+	0
Hoyos	+	++	++	0	++	0	+	?	0	?	0
<i>Candida sp. 599,7:</i>											
Beijerinck	++	+	+	0	++	0	++	?	?	+	0
Anillos	++	+++	++	0	++	0	++	+	+	+	0

Explicación de los signos: ++ intensidad del desarrollo; 0 ausencia de desarrollo; ? imposibilidad de efectuar las lecturas; (1) no se pudo leer a los 4 días.

CULTIVO	AUXANOGRAMA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO						AUXANOGRAMA DEL NITRÓGENO				
	Gluc.	Galact.	Malt.	Lact.	Sac.	Raf.	Pept.	Asp.	Urea	Sulf.	Nitr.
<i>Candida sp. 599,7:</i>											
Papeles	+	++	++	0	++	0	+	+	+	+	0
Hoyos	+	+	+	0	++	0	+	+	+	+	0
<i>Candida sp. 599,8:</i>											
Beijerinck	++	0	+	0	+	0	+	0	0	0	0
Anillos	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0
Papeles	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Hoyos	0	0	+	0	+	?	?	?	?	?	?
<i>Candida sp. 573:</i>											
Beijerinck	?	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0
Anillos	++	++	++	0	++	+	++	+	+	+	0
Papeles	+	++	++	0	+	?	?	?	?	?	?
Hoyos	?	?	?	?	?	?	+	?	+	+	?
<i>Candida sp. 574:</i>											
Beijerinck	0	?	+	0	+	0	+	+	+	+	0
Anillos	0	0	+	0	+	0	?	?	?	?	?
Papeles	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Hoyos	?	?	?	?	?	?	+	?	?	?	?
<i>Candida sp. 599,9:</i>											
Beijerinck	+	0	0	0	0	0	+++	+++	+++	+++	0
Anillos	++++	++++	0	0	0	0	+	+++	+++	+++	0
Papeles	+	+	0	0	0	0	?	+++	+++	+++	0
Hoyos	?	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0 (1)
<i>Candida sp. 599,8:</i>											
Beijerinck	++	0	+	0	+	0	+	?	?	?	?
Anillos	+	+	+	+	+	0	+	?	?	?	?
Papeles	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Hoyos	?	?	+	?	+	?	?	?	?	?	?

Explicación de los signos: + intensidad del desarrollo; 0 ausencia de desarrollo; ? imposibilidad de efectuar las lecturas; (1) no se pudo leer a los 4 días.

CULTIVO	AUXANOGRAMA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO						AUXANOGRAMA DEL NITRÓGENO				
	Gluc.	Galact.	Malb.	Lact.	Sac.	Raf.	Pept.	Asp.	Urea	Sulf.	Nitr.
<i>Schizosaccharomyces sp.</i> 1547:											
Beijerinck	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anillos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Papeles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hoyos	+	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :											
Beijerinck	?	?	?	?	?	?	++	+	0	+++	0
Anillos	+	+	+	0	+	0	++	+++	0	+++	0
Papeles	?	?	?	?	?	?	+	+	0	+++	0
Hoyos	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+++	0
<i>Torulopsis neoformans</i>											
Beijerinck	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
Anillos	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
Papeles	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
Hoyos	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
<i>Zygosaccharomyces sp.</i> :											
Beijerinck	?	?	?	?	?	?	++	0	0	0	0
Anillos	+	+	+	0	+	±	+	0	0	0	0
Papeles	?	?	?	?	?	?	+	0	0	0	0
Hoyos	+	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>Debaryomyces sp.</i> :											
Beijerinck	+	0	+	+	+	0	+	+	0	++	0
Anillos	++	++	++	++	++	++	+	++	0	+++	0
Papeles	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+++	0
Hoyos	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0

Explicación de los signos: + intensidad del desarrollo; 0 ausencia de desarrollo; ? imposibilidad de efectuar las lecturas; (1) no se pudo leer a los 4 días.

Respecto al mismo estudio efectuado con las fuentes nitrogenadas el método de anillos y particularmente el de hoyos se mostraron también superiores al clásico de Beijerinck con la ventaja de poder emplear soluciones esterilizadas.

SUMMARY

We have performed the auxanographic study of 16 yeasts by the classical Beijerinck's method and by employing the following techniques: 1) Oxford's cylinder method, 2) filter paper-dies of 1 cm. diameter and 3) agar cup method (cut out with a cork-borer of 0,5 cm. of diameter).

10 % sugar solutions and 1 % nitrogenous sources sterilized by filtration were poured in the corresponding sector of the Petri dish with mineral culture media. The best results were obtained with the Oxford's cylinder method.

RÉSUMÉ

Nous avons effectué l'étude auxanographique de 16 levures simultanément par la méthode classique de Beijerinck et par les techniques suivantes: 1) anneaux d'Oxford, 2) disques de papier-filtre de 1 cm. de diamètre, et 3) trous faits avec un emporte-pièce en déposant les diverses solutions sucrées au 10 % et azotées au 1 % stérilisées par filtration.

Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec la méthode des anneaux d'Oxford.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) REBAELLI, P. and CIFERRI, R.: *Zentralbl. f. Bakt.*, etc., 1929, 78, 40.
- (2) STELLING-DEKKER, N. M.: *Die sporogenen Hefen*. Uitgave van de Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam, 1931.
- (3) LODDER, J.: *Die anaskosporogenen Hefen*. N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij Amsterdam, 1934.
- (4) DIDDENS, H. A. and LODDER, J.: II Teil. *Die anaskosporogene Hefen*. N. V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij Amsterdam, 1942.
- (5) NEGRONI, P.: *Morfología y biología de los hongos*. *El Ateneo*. Buenos Aires, 1933.
- (6) MACKINNON, J. E.: *Zimología Médica*. Montevideo. Imprenta "El Siglo Ilustrado", 1946.
- (7) YING, S. A.: *J. Trop. Med. and Hyg.*, 1936, 39, 4.
- (8) MARTIN, D. S., CLAUDIUS, P. J., YAO, K. F. and LEE, L. E.: *J. Bact.*, 1937, 34, 99.
- (9) CROFT, C. C. and BLACK, L. A.: *J. Lab. and Clin. Med.*, 1936, 23, 1248.
- (10) KOLMER, J. A.: *Penicillin therapy*. D. Appleton. Century Co. N. York, L., 1945.
- (11) WILLIAMS, T. I.: *Nature, Lond.*, 1948, 161, 19.