

## Método para la obtención y observación de filamentos en las levaduras no esporuladas

Por S. SORIANO

En los recientes sistemas de clasificación de las levaduras de CIFERRI y REDAELLI<sup>1</sup> y de LANGERON y TALICE<sup>2</sup>, así también como en el expuesto en la excelente tesis de J. LODDER<sup>3</sup> sobre las levaduras no esporuladas, se comprueba la importancia asignada a la formación de un micelio o de un pseudomicelio filamentosos en la sistemática de ese grupo de microorganismos.

Así, en la clasificación de CIFERRI y REDAELLI, las dos sub-familias *Torulopsidaeae* y *Mycotoruleae* de la familia *Torulopsidaceae* se distinguen entre sí por la ausencia o presencia respectivamente de un micelio o de un pseudo-micelio filamentosos. En la de LANGERON y TALICE, sólo se toma en cuenta la ausencia o presencia de un pseudo-micelio, es decir de filamentos formados inicialmente por brotación, colocando en orden aparte (*Arthosporeae*) las formas que presentan un verdadero micelio generado por tabicamiento.

En la clasificación de LODDER se sigue un criterio semejante, en cuanto solo se considera como pertenecientes a las levaduras no esporuladas las formas que presentan o no un pseudo-micelio, separando de las mismas las que poseen un micelio verdadero.

De esta manera las sub-familias *Torulopsidaeae*<sup>4</sup> y *Mycotoruloidae* se distinguen por la ausencia o presencia de un pseudo-micelio bien formado y un « aparato esporífero ».

Los métodos preconizados para observar la formación de un verdadero micelio o de un pseudo-micelio filamentosos así como la presencia de un « aparato esporífero », son los descritos por TALICE<sup>5</sup>, LANGERON y TALICE<sup>6</sup> y RIVALIER y SEYDEL<sup>7</sup>.

El procedimiento aconsejado por TALICE consiste en cultivar las levaduras en agua de papas al 2%, observar en gota pendiente las características de su desarrollo en la primera siembra, y, en caso negativo, repetir este examen des-

<sup>1</sup> CIFERRI, R., and P. REDAELLI, 1929, « Studies on the *Torulopsidaceae* ». Ann. Mycologici 27 : 245-295.

CIFERRI, R., 1950. Arch. f. Protistenkunde, 71 : 405.

CIFERRI, R., und P. REDAELLI, 1956, Arch. f. Mikrobiologie, 6.

<sup>2</sup> LANGERON, M., et R. V. TALICE, 1952, « Nouvelles methodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes ». Ann. Parasit. 10 : 1-80.

<sup>3</sup> LODDER, J., 1954, Die Hefesammlung des « Centraalbureau voor Schimmelcultures » Beiträge zu einer monographie der Hefearten. II Teil: Die Anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte. Kon Akad. Wet. Amsterdam, Verhand. (Tweide Sectie), 52 : 1-256.

<sup>4</sup> LODDER (loc. cit.), hace notar con razón que siguiendo las reglas de la nomenclatura botánica corresponde la terminación *oideae* para una sub-familia, lo que no fué tenido en cuenta por CIFERRI y REDAELLI al establecer su sistemática.

<sup>5</sup> TALICE, R. V., 1950, Ann. Parasitologie 8 : 594.

<sup>6</sup> LANGERON, M., et R. TALICE, 1952 (loc. cit.).

<sup>7</sup> RIVALIER, E., et S. SEYDEL, 1952, « Nouveau procédé de culture sur lames gélosées appliqué à l'étude microscopique des champignons des teignes ». Ann. Parasitologie 10 : 444-452.

pués de una serie sucesiva de tres trasplantes en el mismo medio de cultivo. La observación puede hacerse también, lo cual es un método cómodo, en forma de cultivos de adhesión en cámara húmeda por el método de LINDNER, colocando en un cubreobjeto flameado un ansa de medio estéril, sembrado con una mínima cantidad de cultivo y extendiendo el material de una manera que cubra una superficie bastante extensa abarcando un círculo de 0,5 a 1 cm. de diámetro, es decir formando una capa de líquido de poco espesor y colocando el cubreobjeto así preparado sobre un portaobjeto excavado, de manera de constituir una cámara húmeda que se cierra con vaselina. En esta forma pueden hacerse observaciones repetidas en cualquier período de incubación del cultivo.

El método de LANGERON y TALICE consiste en observar el desarrollo que se forma en la parte superior de un tubo de agar estría solidificado en punción muy inclinada y con poco material, de manera que en la punta del pico de flauta formado, la capa de agar sea relativamente poco espesa y en consecuencia más transparente, lo cual facilita el examen microscópico que se hace directamente a través del vidrio, con pequeño aumento.

El método de RIVALIER y SEYDEL es más apropiado para una observación microscópica de gran aumento en los cultivos desarrollados en medio sólido. Para ello se sumerge rápidamente un portaobjeto en el agar licuado y entibiado a unos 60°C y se instala en una caja de Petri sobre dos aros de vidrio, con un poco de agua en el fondo, todo esterilizado de antemano. Se incuba y una vez que se observa con pequeño aumento el desarrollo a través de la tapa de la caja, se puede sacar la capa de agar con el cultivo y éste fijarse y colorearse, después de lo cual puede ser observado con los más fuertes aumentos incluso los objetivos de inmersión.

Un método que presenta todas las ventajas de los tres mencionados y ninguno de sus inconvenientes es el que se describirá más adelante, basado, como se verá, en el método de cultivo en cámara húmeda en medios sólidos, descritos por FORTNER desde 1928<sup>1</sup> \*.

GÓMEZ DE CISNEROS<sup>2</sup> aplicó el método de FORTNER para la diferenciación de las levaduras patógenas del hombre. Siguiendo la técnica empleada por este autor, recientemente NEGRONI<sup>3</sup> lo empleó también en el estudio de las formas R y S de *Mycotorula albicans*<sup>4</sup>.

La técnica empleada en el presente trabajo, se basa, como se ha dicho en el método de FORTNER, aunque difiere de la primitiva en algunos detalles.

1° Un portaobjeto de KOCH con una o tres excavaciones (16 mm. de diámetro cada una), bien desengrasado, es flameado rápidamente y dejado enfriar con la cara lisa vuelta hacia arriba y un extremo apoyado sobre un caño de pipeta PASTEUR esterilizado a la llama. Una vez enfriado,

<sup>1</sup> FORTNER, J., 1929. «Die Mikroskopie der Aeroben und Anaeroben Oberflächenkolonien auf hängendem Agar». Zentralbl. f. Bakt., I Abt., Orig., 115 : 96.

(\*) El autor de la presente comunicación visitó al Dr. FORTNER en su laboratorio del Instituto Roberto Koch, de Berlín, y a su vuelta al país tuvo el gusto de exponer su método y su técnica detallada en un cursillo dado en el Instituto Bacteriológico, a invitación del Director, Dr. A. SORDELLI.

<sup>2</sup> GÓMEZ DE CISNEROS, J. M., 1934. Archiv. f. Dermat. u. Syph. 171 : 99.

<sup>3</sup> NEGRONI, P., 1936, Rev. Inst. Bact. 7 : 393-409.

<sup>4</sup> Debo ambos antecedentes al Dr. NEGRONI, por lo que le estoy muy agradecido.

en el borde de la excavación se pinta un aro de vaselina con un pincelito y el portaobjeto se vuelve a apoyar sobre el caño de pipeta, en la posición que acaba de indicarse.

2° Un cubreobjeto común (18 X 18 mm.), bien desengrasado, tomado por un vértice con una pinza de CORNET, es flameado rápidamente y dejado enfriar con la superficie estéril vuelta hacia abajo. En seguida, y volviendo la superficie estéril hacia arriba con el mínimo de ángulo posible, verter sobre ella, por medio de una pipeta PASTEUR, algunas gotas de agar nutritivo, fundido a 60° C. El exceso de agar que se acumula en la parte más baja del cubre se elimina tocando con él, antes de cumplirse la solidificación, una superficie estéril, por ejemplo la de una cápsula de PETRI.

Ya solidificado el agar, se procede a recortar — bisturí plano u hoja de « Gillette », previamente flameados, — los bordes de la película formada y la separación de las cuatro lonjas (cada una de ellas resulta de un corte y un movimiento hacia fuera), debe dejar en la zona central del cubre un cuadrado de agar, que, después de quitarle los cuatro vértices del mismo modo, se reduce a un octógono, cuyo tamaño será tal que pueda quedar contenido cómodamente en la excavación del portaobjeto de KOCH, esto es sin tocar ni el borde ni el fondo de la misma.

3° El cubreobjeto así preparado se apoya, por el lado de la película, sobre la excavación de borde vaselinado del portaobjeto de KOCH (ver 1° de esta técnica), mientras con un hilo de platino, o una punta afinada y cerrada de una pipeta PASTEUR, se toma una mínima cantidad de material a sembrar y de inmediato se lo deposita en el centro del octógono de agar, para lo cual el cubre se ha levantado ligeramente. Hecho esto se cierra la cámara húmeda, apretando la parte del cubre que circunda al agar, sobre la superficie del portaobjeto recubierta por la vaselina. El preparado se incuba a una temperatura adecuada (por lo general entre 30° y 32° C.).

Todas las operaciones descritas deben ejecutarse con gran rapidez, principalmente para evitar la desecación del medio de cultivo. No es imprescindible el recorte de la película de agar, pero, en el caso de no efectuarse, el peligro de infectar el preparado es mucho mayor, pues entonces el medio de cultivo se pone forzosamente en contacto con la vaselina. De todas maneras siempre será necesario cortar por lo menos la parte de agar que solidifica en capa más espesa sobre el vértice más bajo del cubreobjeto, durante la formación de la película (ver 2° de esta técnica).

A diferencia de los 2 últimos autores nombrados, esta técnica se utiliza expresamente como un método especial para la determinación de la capacidad de formar un micelio o un pseudo-micelio filamentosos en los cultivos de levaduras no esporuladas, y para la formación de la micro-colonia-gigante. En efecto al verse un cierto hongo puede observarse el desarrollo del cultivo en forma circular, semejante a lo que sucede en la formación de las llamadas « colonias gigantes », por lo que (aunque parezca paradójico) podría designárseles con el nombre de « micro-colonia-gigantes ». A semejanza de las colonias gigantes, ésta también resulta característica para cada cultivo y puede usarse como un medio más simple y práctico para la caracterización de las especies.

La verdadera ventaja del método es que permite la observación microscópica intermitente o continuada en cualquier período del desarrollo, aun durante meses, sin molestar el crecimiento ulterior. En el borde de la micro-colonia-gigante, puede observarse cómodamente con cualquier aumento, aún con lentes de inmersión, la formación de agrupaciones celulares y pseudomicelios primitivos, verdaderos pseudo-micelios con células alargadas y filamentosas, y la de micelios tabicados, así también como la disposición, forma y número de los conidios que constituyen el « aparato esporífero ».

El cultivo en cámara húmeda sobre película de agar que se acaba de describir, tiene además la ventaja de prestarse muy bien para obtener reproducciones fotográficas de sus particulares características morfológicas en cualquier momento de su desarrollo y de poder seguirse, durante el mismo el desenvolvimiento

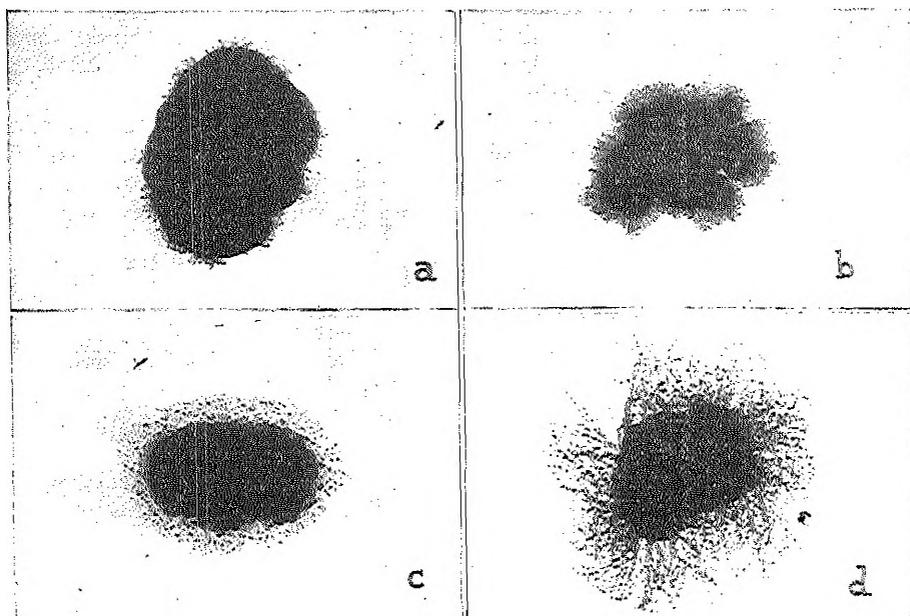


FIG. 1. — Micro-colonias-gigantes, obtenidas en cámaras húmeda, sobre película de agar, por el método de FORTNER. a). *Sacch. cerevisiae* raza *chicha*. b). Forma rugosa de la anterior- c). *Sacch. sp.*, levadura de infección. d). *Mycotorula albicans*, otra levadura de la infección de la «chicha».

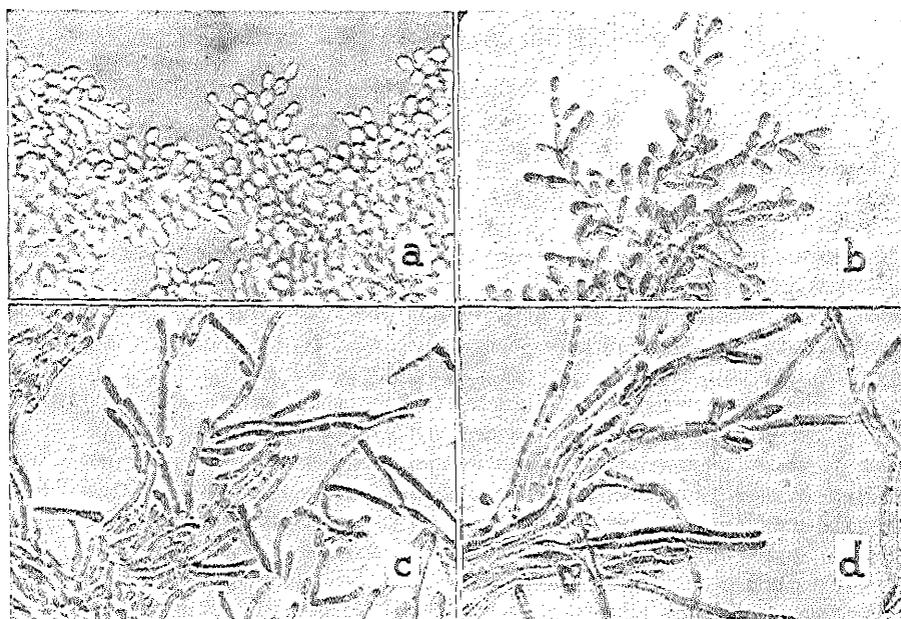


FIG. 2. — Bordes de las micro-colonias-gigantes, vistas con mayor aumento. a), b), c) y d): como en la figura anterior.

gradual de ciertos grupos de células, cuyo lugar en el preparado puede volver a encontrarse fácilmente debido a su fijeza en el medio sólido marcando simplemente en los « nonius » de la platina « charriot » la posición que ocupa cada lugar que interese volver a examinar.

Las figuras que se adjuntan al trabajo, muestran el aspecto de las microcolonias obtenidas y permiten, como se ve claramente, una determinación fácil y rápida de la capacidad de formar filamentos periféricos.

Las ventajas que ofrece el método descrito puede sintetizarse brevemente en las siguientes:

1º) Inmovilización del cultivo en un lugar fijo, lo cual permite la observación continuada, la reproducción gráfica y la localización de las distintas partes del mismo en cualquier momento de su desarrollo.

2º) Posibilidad de usar las lentes de mayor aumento, inclusive las de inmersión en las observaciones microscópicas.

3º) Observación del cultivo durante su crecimiento normal sin molestar su ulterior desarrollo.

4º) Posibilidad de aislar (con micromanipulador)<sup>1</sup> cualquier grupo de células o de transplantar el cultivo en cualquier momento de su desarrollo después de haber efectuado las observaciones.

5º) Formación de una micro-colonia gigante, de aspecto característico, que puede ser usado como un medio más de identificación específica de los cultivos.

<sup>1</sup> SORIANO, S., 1955. « Dispositivo sencillo para micromanipulaciones ». « Folia Biológica », (46-47-48) : 205-210.

### Citología del *Actinomyces israeli*

Por el Dr. PABLO NEGRONI

El estudio citológico del *Act. israeli* nos ha revelado la existencia de un sistema vacuolar y reservas de glucógeno comparable a los mismos constituyentes celulares de los *Eumycetes*.

No hemos podido observar en cambio en los elementos de este *Actinomyces* ni reservas grasas ni condrioma.

En los cultivos en gota pendiente hemos observado que las colonias vecinas lejos de inhibirse en su desarrollo tienden a confluir y los vínculos se establecen por medio de filamentos gruesos, poco flexuosos y sin ramificaciones que a veces recorren distancias relativamente largas cuando las colonias están separadas. Es precisamente en estos filamentos que los métodos de coloración nuclear han permitido apreciar la existencia de pequeños elementos vesiculosos, de distribución regular, provistos de un corpúsculo excéntrico fuertemente teñido en negro por la hematoxilina férrica, de una zona clara alrededor del mismo, limitada en ocasiones por una tenue membrana. La morfología de estos elementos recuerda pues la de los pequeños núcleos de las células de los *Eumycetes*. Con frecuencia se ve uno de estos elementos pegado al extremo del filamento y también hemos observado dos corpúsculos ligados por un puente cromático recordando las figuras de división nuclear directa. Los elementos coloreados por la hematoxilina férrica