

La cápsula de la *Mycotorula albicans* (Ch. Robin, 1853)

Por PABLO NEGRONI

(con una figura)

Estudiando las propiedades biológicas del hongo productor del muguete en los cultivos, encontré que en los medios líquidos aparecían sustancias hidrocarbonadas segregadas por este hongo. Sospechando que esta propiedad podría estar ligada a la existencia de una cápsula como ocurre en las bacterias, utilicé los procedimientos de coloración especiales para este objeto de uso corriente en bacteriología y comprobé que en efecto este hongo aparece rodeado de una cápsula tanto en los cultivos en medios líquidos como en los sólidos.

Los métodos de coloración empleados han sido el de la tinta china, el de Hiss y el de Huntoon, obteniendo con este último los mejores resultados y a su empleo se refieren las experiencias que expongo a continuación.

Aspecto de la cápsula. Esta se presenta como una película tenue, coloreada en rosa, rodeando al elemento celular que aparece uniformemente teñido en rojo. Las células muertas se colorean irregularmente y en su interior se observan los corpúsculos metacromáticos teñidos en rojo violáceo.

La cápsula reducida a una línea en los puntos de contacto con otras células, se desarrolla en las superficies libres, descomponiéndose en ocasiones (lavados con agua o soluciones de borato de soda) en una serie de hojuelas estratificadas. Otras veces se rompe quedando adheridos a los polos de las células, restos filamentosos desflecados de la cápsula. Este aspecto parece obedecer al estallido de la cápsula por su gran absorción de agua.

Influencia de la edad de los cultivos. La cápsula se observa más nítidamente en los cultivos jóvenes de 15 a 20 horas de incubación a 37° C.

En cultivos de 2 a 3 días aparece como un anillo intensamente teñido en rojo y finalmente no la he podido observar en cultivos viejos de 20 días a 1 mes.

Influencia del medio cultivo. La cápsula de este hongo se observa particularmente bien en los cultivos en medios conteniendo los hidratos de carbono que consume activamente, a saber: glucosa, maltosa y levulosa. He aquí el protocolo de mis experiencias:

1) Cultivos de 15 horas a 37 en agar-caldo con 2 % de los siguientes hidratos de carbono: glucosa₊₊₊, maltosa₊₊₊, levulosa₊₊₊, galactosa₊₊₊, sacarosa₊₊₊, lactosa₊₊, xilosa₊, almidón₊, inulina₊. Testigo: agar-caldo sin hidrato de carbono₊. Las cruces indican la intensidad de formación de la cápsula que coincide con la intensidad del desarrollo.

2) Cultivos en caldo de 15 horas a 37° con 2 % de los siguientes hidratos de carbono: glucosa₊₊₊, maltosa₊₊₊, levulosa₊₊₊, galactosa₊, sacarosa₊, lactosa₊, inulina₊, almidón₊, glicerina_±.

Aquí como en la experiencia anterior, las cruces indican la intensidad de formación de la cápsula y del desarrollo.

Para obtener buenos preparados de los cultivos en medios líquidos, es conveniente centrifugarlos y lavarlos una vez con agua destilada, haciendo los frotis con el sedimento obtenido por centrifugación.

Influencia del pH. del medio cultivo. Estas experiencias fueron hechas sembrando en mosto de cerveza cuyo pH. se hizo variar de 6,5 a 8,5, observando en todos los cultivos la formación de cápsula por la *M. albicans*. No fueron ensayados pH. inferiores a 6,5. En los medios cuyo pH. es superior a 8,5 el desarrollo es escaso o nulo.

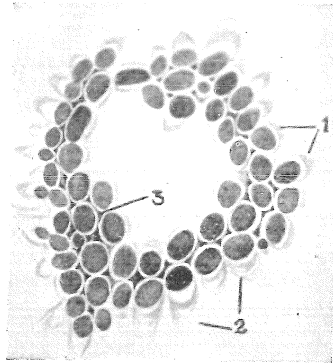
Acción del lavado con agua. Lavando seis veces con agua destilada cultivos jóvenes, los elementos celulares conservan todavía su cápsula. Los líquidos de cada lavado fueron retirados previa centrifugación, suspendiendo el sedimento nuevamente en agua, aspirando y soplando con pipeta unas 4 o 5 veces.

Lavados con soluciones de borato y bicarbonato de soda. Los preparados con material de cultivos jóvenes lavado una media docena de veces con una solución acuosa de borato de soda al 2 %, muestran todavía los elementos celulares con cápsula.

Lo mismo ocurre lavando con una solución acuosa al 2 % de bicarbonato de soda. Lavando tres veces las células con una solución al 10 % de esta última substancia, éstas conservan también sus cápsulas pero con las siguientes particularidades: se presentan más abultadas como embebidas por la solución acuosa, el espacio claro visible entre ésta y el cuerpo de la célula aumentado, como si la cápsula hubiera sufrido un comienzo de desprendimiento. En lugar de presentarse ésta como una película tenue y homogénea, aparece mechas veces

disociada en una serie de laminillas estratificadas. En el mismo preparado se observan cápsulas rotas como si hubieran estallado por una fuerte absorción de la solución alcalina, quedando adheridos a los polos de las células restos filamentosos desflecados de la misma. Estos fenómenos pero mucho menos marcados, se observan también en las células lavadas con agua.

Sembrando el material que ha sido lavado repetidas veces con las soluciones alcalinas mencionadas, se obtienen cultivos positivos, lo cual prueba que no mata las células.



Cápsula de la *Mycotorula albicans* coloreada por el método de Huntoon.

1. Aspecto normal. 2, desprendimiento del cuerpo de la célula y descomposición en hojuelas estratificadas por la acción de los lavados. 3, substancia intercelular fuertemente teñida.

El material de cultivo lavado con la solución de borato de soda al 2 % forma grumos y se suspende mal. Debo finalmente mencionar que antes de hacer los preparados con el material lavado con las soluciones alcalinas, fueron lavados una vez con agua destilada para arrastrar el exceso de álcali que impide la obtención de buenas coloraciones.

Lavados con soluciones de hidrato de sodio. Estas experiencias fueron hechas suspendiendo simultáneamente en las soluciones indicadas más abajo, el material de un cultivo de 48 horas de incubación a 37° en agar-glucosado. Con cada una de las soluciones se efectuaron tres lavados consecutivos y un cuarto lavado con agua destilada para eliminar el exceso de álcali y obtener suspensiones homogéneas de las células.

1) *La solución al 0,1 % de hidrato de sodio.* No disuelve la cápsula ni altera la morfología de los elementos celulares que permanecen vivos, porque las siembras hechas con el sedimento del último lavado, dan cultivos positivos.

2) *Solución al 0,33 %*. Después de los lavados con esta solución, la inmensa mayoría de las células aparecen uniformemente teñidas por el método de Huntoon, sin gránulos metacromáticos en su interior, con restos de cápsula en forma de anillo y en ocasiones con cápsula de aspecto normal. La substancia intercelular se tiñe intensamente especialmente en los ángulos diedros que forman las células por presión recíproca. Esta no es sino la substancia de la cápsula que por falta de espacio no puede adquirir su aspecto normal. La coloración uniforme de las células me hizo presumir que estuvieran vivas, cosa que fué comprobada con los cultivos positivos obtenidos sembrando el sedimento al final de los lavados.

3) *Solución al 0,5 %*. La gran mayoría de las células se presentan débilmente coloreadas y con gránulos metacromáticos en su interior teñidos en rojo-violáceo. Las restantes aparecen como en los casos precedentes uniformemente teñidas sin gránulos metacromáticos, pero con substancia intercelular y cápsula en forma de anillo.

Los cultivos sembrando el último sedimento fueron positivos.

4) *Solución al 1 % de hidrato de sodio*. Después de los lavados con esta solución las células se presentan pálidas, con gránulos metacromáticos en su interior dando la impresión de tratarse de células muertas. Sus cultivos son en efecto negativos. La cápsula no existe y solo se observa substancia intercelular débilmente coloreada.

5) *Con la solución al 2 %* se obtienen idénticos resultados que son la precedente.

Acción de los lavados alcalinos. Las soluciones alcalinas, borato, bicarbonato e hidrato de sodio, extraen más fácilmente que el agua destilada la substancia de la cápsula, la cual se deposita en la cara interna del tubo que aparece como empañado. En efecto haciendo preparados coloreados por el método de Huntoon con el material obtenido paseando el asa por las paredes del tubo que contiene el material lavado, previa centrifugación, se observa una substancia amorfa teñida en rosa y la ausencia de elementos celulares. En la experiencia hecha simultáneamente con material del mismo cultivo lavado con agua, no se obtiene este fenómeno.

En el material lavado con la solución de borato de soda al 2 % se forma además una película como de 3 a 4 mm. por encima del sedimento celular. Retirándola con una pipeta afilada, haciendo frotis y coloreándolos por el método de Huntoon, se observa también una substancia amorfa rosada.

Acción del formol. Suspendiendo material de un cultivo de 15 horas a 37° en una solución de formol al 0,5 % en agua, dejándolo en contacto 24 horas y lavando finalmente dos veces con agua destilada,

se observa en los preparados hechos con este material que las células conservan sus cápsulas.

Acción del alcohol-acetato de sodio. Tratando una suspensión de un cultivo de 15 h. a 37° en agua por cinco veces su volumen de alcohol-acetato (alcohol de 96° conteniendo 13 por mil de acetato de sodio) se forma un precipitado que al día siguiente se suspende y lava una vez en agua destilada. Los preparados hechos con este material muestran las células con sus cápsulas.

1) *Acción de la ebullición con agua destilada.* Haciendo hervir durante 10 minutos una suspensión en agua de un cultivo de 15 horas de *M. albicans*, las células conservan después de esta operación, restos de cápsula en forma de anillo y de substancia intercelular.

2) *Con una solución acuosa al 1 % de hidrato de sodio.* Colocándose en las mismas condiciones de la experiencia anterior, pero suspendiendo las células en una solución de hidrato de sodio al 1 % y sometién-dolas a una ebullición de 10 minutos de duración, se observa que las células han perdido sus cápsulas y solo quedan estrechas bandas de substancia intercelular débilmente teñidas. Con este procedimiento se extrae pues la inmensa mayoría de la substancia de la cápsula.

Acción de la agitación. Agitando un cultivo de 15 horas a 37 C. en caldo agar glucosado, colocado en un frasquito con perlas de vidrio, en un agitador mecánico de unas 150 sacudidas por minuto, las células conservan después de 2 horas de agitación, restos de cápsula en forma de anillo y de substancia intercelular. Se observa también que aproximadamente un 20 % de los elementos celulares han estallado, presentando una pequeña rotura en forma de cuña de base externa, están vacías y no se colorean por el método de Huntoon.

RESUMEN

1) Se describe por primera vez la existencia de cápsula en el hongo del muquete, bien visible en cultivos jóvenes de 15 hs. a 37° en medios con los siguientes hidratos de carbono: glucosa, maltosa y levulosa y empleando el método de coloración de Huntoon.

2) La cápsula de la *M. albicans* persiste después de repetidos lavados con agua, con soluciones de borato y bicarbonato de soda, ebullición en agua y dos horas de agitación con perlas de vidrio. Resiste igualmente a la acción de formol y del alcohol-acetato de sodio.

3) Las soluciones de hidrato de sodio al 1 y 2 % extraen casi completamente la substancia de la cápsula, especialmente en caliente.

4) La cápsula se forma en medios de cultivo con *pH.* variable de 6,5 a 8,5 y su existencia en este hongo, plantea los mismos problemas que los del estudio de las bacterias capsuladas en cuya solución estoy actualmente empeñado, guiado por las útiles sugerencias del Dr. Sordelli a quién estoy sumamente agradecido.

RESUME

1) On décrit par la première fois l'existence de capsule dans les cultures du champignon du muguet, particulièrement visible après 15 heures d'incubation à 37° dans les milieux avec les hydrates de carbone suivants: glucose, maltose et levulose, en employant la méthode de coloration de Huntoon.

2) Cette capsule persiste après lavages répétés dans l'eau, avec de solutions de borate, et bicarbonate de soude, ébullition dans l'eau et deux heures d'agitation avec de perles en verre. Elle résiste également à l'action du formol et de l'alcool-acetate de soude.

3) Les solutions d'hydrate de soude à 1 et 2 % spécialement à chaud, enlèvent presque complètement la substance de la capsule.

4) La capsule se forme dans les milieux de culture au *pH*. variant de 6,5 à 8,5 et sa présence dans ce champignon pose les mêmes problèmes que dans l'étude des bactéries question de laquelle je m'occupe maintenant, guidé par les utiles suggestions du Dr. Sordelli à qui je suis reconnaissant.

SUMMARY

1) In this work is described for the first time the capsule of the thrush fungus, which is especially apparent in young cultures of 15 hours at 37° C. containing the following carbohydrates: glucose, maltose and levulose and employing Huntoon staining method.

2) *M. albicans* capsule persists after repeated washings with water, borate and sodium bicarbonate solutions, boiling in water and 2 hours shaking with glass pearls. It also withstands the action of 0,5 % formol solution and alcohol-acetate.

3) 1-2 % sodium hydroxide solutions remove nearly all the capsule's substance, especially after boiling.

4) This fungus' capsule is formed in culture media which *pH* range from 6,5 to 8,5 and its existence puts forward the same problems as those met studying the capsulate bacteria in the solution of which I am now engaged with the assistance of Dr. Sordelli to whom I want to express here my sincere thanks.

BIBLIOGRAFIA

HUNTOON, F. M. A simple method for staining the capsule of bacteria. *J. Bact.*, II, 241-243, 1917.