

# ESTUDIO DE UNA MODIFICACION DEL MEDIO DE FOWELL PARA LA ESPORULACION DE LEVADURAS

Por

NORBERTO J. PALLERONI (1)

RAÚL A. GÓMEZ (2)

## INTRODUCCION

La esporulación de las levaduras ha sido estudiada por numerosos autores, a pesar de lo cual, es aún hoy uno de los procesos peor conocidos de la fisiología de esos organismos. Las observaciones que se encuentran en la bibliografía muchas veces son vagas y contradictorias, y urge investigar el problema en forma sistemática tomando en consideración los distintos factores en función del metabolismo general de esos microbios.

De los numerosos medios de esporulación propuestos hasta hoy para *Saccharomyces*, el que quizá reúne las mayores ventajas es el de Fowell (1). Este medio provoca la formación de un número más elevado de ascos de cuatro esporas que otros medios de esporulación; además, constituye por su composición sencilla, una base excelente para intentar el estudio del mecanismo íntimo de la esporulación.

El objeto del presente trabajo es el de estudiar la influencia del agregado de agua de levaduras autolizadas al medio de Fowell. Maneval (2) y Lindegren y Hamilton (3) han encontrado que el autolizado de levaduras puede estimular la esporulación. Kirsop (4) también halló que los extractos de levaduras favorecen la esporulación, e hizo la interesante observación de que la intensidad de la esporulación está ligada a la concentración de células en el medio de esporulación. En este trabajo se ha observado un aumento en la proporción de ascos por agregado de agua de levaduras al medio de Fowell y los resultados explican en cierto modo las observaciones relativas a la influencia de la densidad de células en el medio de esporulación.

## MATERIALES UTILIZADOS Y EXPERIENCIAS EFECTUADAS

Las cepas de levaduras utilizadas en el trabajo provienen

(1) Profesor titular de Microbiología en la Facultad de Ciencias Agrarias.

(2) Investigador del Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Ciencias Agrarias.

de aislamientos directos efectuados a partir de mostos de uva y de manzana en fermentación. Las cepas 1, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 16, 19, 20, 24, 25, y 31 han sido aisladas de mostos de uva. Todas ellas corresponden a la especie *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Las cepas 1616, 1625 y 1640 provienen de mostos de manzana. 1616 y 1640 pertenecen a *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, y 1625 es una especie no identificada del mismo género. Los números mencionados en esta lista son los de nuestra colección de levaduras.

Para el cultivo de las cepas se utilizó el agar de agua de levaduras autolizadas, preparada de acuerdo al método de Orla-Jensen (5), con 2 por ciento de glucosa. Con 500 g de levadura prensada se ha preparado 2,5 litros de medio, el cual contiene aproximadamente 0,15 por ciento de nitrógeno total, determinado por el método de Kjeldahl. Luego de una incubación de 24 horas en este medio, las células fueron transplantadas a los medios de esporulación.

Los medios de esporulación estudiados fueron:

- 1) medio de Fowell;
- 2) medio de Fowell con 5 por ciento de agua de levaduras autolizadas, y
- 3) medio de Fowell con 10 por ciento de agua de levaduras autolizadas.

En la descripción que va más adelante, estos medios serán denominados "F", "5" y "10", respectivamente.

El trasplante a estos medios fué efectuado con ansa de cultivos, y se trató de llevar al medio de esporulación respectivo, cantidades aproximadamente iguales de la pasta microbiana en cada grupo de experiencias efectuadas. Los tubos de medio de esporulación fueron llevados a estufa a 28°C, y luego de 4 días se efectuó el recuento de las células esporuladas. Esta operación se realizó de la siguiente manera: se recogieron las células de toda la superficie del agar con ayuda del ansa, se homogeneizó el conjunto, y se hizo una suspensión en agua. Se llevó una gotita de la suspensión a una cámara cuenta-glóbulos Thoma, y contó el número total de células (entre 300 y 600 células en todos los casos) y el número de ascos de una, dos, tres y cuatro esporas. Finalmente, se determinó el porcentaje de cada tipo de asco en la suspensión.

## RESULTADOS OBTENIDOS

Por siembra de una pequeña cantidad de células en los medios de esporulación mencionados más arriba, se obtuvieron los resultados consignados en el cuadro 1.

CUADRO 1

CEPA	MEDIO	Porcentajes de ascos de:			
		1 espora	2 esporas	3 esporas	4 esporas
1	F	0	1,5	3,5	1,5
1	5	0	11	10	1,5
1	10	0	9	8	1,5
3	F	0	13	8,5	18
3	5	0	41	26	9
3	10	0	42	26	7,5
4	F	0	17	6,5	4
4	5	0	25	16	5,5
4	10	0	24	25	4,5
5	F	0,5	23	20	6,5
5	5	0	67	30	2
5	10	0	63	24	1
7	F	0	6	2,5	1
7	5	0	8,5	4	2
7	10	0	11	2	0,5
8	F	0,5	21	11	6
8	5	0,5	45	20	2,5
8	10	0,5	43	23	3
11	F	0	0	2	1,5
11	5	0	0	0,5	0,5
11	10	0	0	0	0
13	F	0	24	3	1,5
13	5	0	53	11	2,5
13	10	0	78	9	1
14	F	0	0,5	0,0	0
14	5	4	4	0,0	0
14	10	0,5	7	0,5	0
16	F	0,5	23	3	1,5
16	5	0	29	6,5	2,5
16	10	0	46	7	0,5
19	F	0	14	11	7
19	5	0	32	26	7,5
19	10	0	37	25	5
20	F	0	10	2,5	0,5
20	5	0	15	5,5	3,5
20	10	0	21	6,5	2,5
24	F	0	22	7,5	1,5
24	5	0	75	7,5	0,5
24	10	1	77	8	0,5
25	F	0,5	2	2,5	1
25	5	0	4,5	3	1,5
25	10	0	7	3,5	0,5
31	F	0,5	10	4	1
31	5	0	12	23	9
31	10	0	23	32	9
1616	F	0,5	0	0,5	0
1616	5	0	2	0,5	0
1616	10	0	6	1	0,5
1625	F	1	2,5	0,5	0
1625	5	0	0	0	0
1625	10	0	0	0	0
1640	F	0	6	2,5	3
1640	5	22	40	12	4
1640	10	1,5	44	23	7

En general se ha notado que los porcentajes de esporulación pueden sufrir variaciones considerables en las distintas repeticiones. Los resultados del cuadro 1 corresponden a una de las series de experiencias que puede tomarse como un buen promedio de todas las observaciones realizadas. No obstante las variaciones en los porcentajes entre una experiencia y otra, en todos los casos se ha notado la misma tendencia de cada una de las cepas en respuesta al agregado de agua de levaduras al medio de esporulación. La respuesta de las distintas cepas a esta modificación del medio de Fowell puede resumirse de la siguiente manera:

- 1) Hay un aumento en todos los tipos de ascos: cepas 20, 31 y 1640;
- 2) Hay un aumento en el número de ascos de menos de cuatro esporas y no hay variaciones apreciables en el número de estos últimos: cepas 1, 4, 7, 13, 14, 19, 24, 25 y 1616;
- 3) Hay un aumento en la proporción de ascos de menos de cuatro esporas y una disminución en el número de estos últimos: cepas 3, 5, 8 y 16;
- 4) Hay una disminución en la esporulación: cepas 11 y 1625.

Los resultados muestran que si bien la mayoría de las cepas reaccionan produciendo un número mayor de ascos de pocas esporas en medio de Fowell adicionado de agua de levaduras, con relación al medio de Fowell original, otras cepas reaccionan de manera distinta, lo cual indica que el mecanismo de la esporulación es complejo, y las distintas cepas tienen requerimientos diferentes. Dado que pocas cepas (20, 31 y 1640) acusan un leve aumento en el número de ascos de cuatro esporas, que son los que reciben preferente atención en los trabajos de genética de levaduras, el agregado de agua de levaduras al medio de Fowell difícilmente puede recomendarse como una modificación de utilidad para los laboratorios que se dedican a esas actividades. En algunos casos, el número total de células esporuladas aumenta notablemente (cepas 3, 5, 8, 13, 16, 19, 24, 31, 1640). En la cepa 5 se llega a obtener una esporulación de casi 100 por ciento de las células agregando al medio de Fowell 5 por ciento de agua de levaduras autolizadas. Estos resultados pueden ser de interés si se desea estudiar la composición o el metabolismo de las esporas. En los casos especiales en que se desee aprovechar estas ventajas del nuevo medio de esporulación, creemos conveniente usar la variante con 5 por ciento de agua de levaduras, especialmente cuando se realizan trabajos de genética, ya que agregando mayor cantidad de agua de levaduras se corre el peligro de que las esporas germinen luego de cierto tiempo, y que ocurran re-

combinaciones de caracteres en los híbridos obtenidos. El medio que se propone para estos casos estaría constituido por: agua de levaduras autolizadas al 5 por ciento, conteniendo 0,66 por ciento de acetato de sodio trihidrato, pH 6,5, con 1,5 a 2,0 por ciento de agar.

Hemos comprobado que el agregado de extracto de levaduras de la casa Baltimore Biological Laboratory (Baltimore, Maryland) en proporción del 0,02 por ciento da aproximadamente los mismos resultados. Las determinaciones de nitrógeno de este extracto por el método de Kjeldahl han dado un promedio de 5,5 por ciento de nitrógeno total.

Los resultados del cuadro 1 podrían constituir una explicación de la observación de Kirsop (4) acerca de la influencia de la densidad de células en el medio de esporulación, sobre el porcentaje de ascos obtenidos. Cuando la densidad de células es elevada, los productos que se liberan al medio por lisis de algunas células, podrían alcanzar en el medio una concentración apropiada para estimular la esporulación del resto de las células. En un grupo de experiencias tomamos las cepas 1, 20, 25, y 31, e hicimos siembras en Fowell tratando de llevar muy pocas células en un caso, y en otro, una cantidad considerable de células. En cada caso la siembra se hizo por duplicado, y los resultados del cuadro 2 representan un promedio de ambas determinaciones.

#### CUADRO 2

Influencia de la densidad de células en el medio de Fowell sobre la esporulación

CEPAS	SIEMBRA LEVE			SIEMBRA DENSA		
	% ascos 2 esporas	% ascos 3 esporas	% ascos 4 esporas	% ascos 2 esporas	% ascos 3 esporas	% ascos 4 esporas
1	4,0	1,5	1,5	14	6,5	2,5
20	1	1	1	8,5	4,5	3
25	0,5	0,5	0,5	5	5	2
31	0,5	3,5	0,5	14	16	9

Según puede verse, el resultado de las experiencias indica que el aumento de la densidad de siembra en el medio de Fowell da un resultado parecido al que provoca el agregado de agua de levaduras al medio. Con las cepas 1 y 25 se ha notado además, un aumento en el número de ascos de 4 esporas, lo cual puede

indicar que las células que se lisan podrían incorporar al medio algunos factores que se destruyen al preparar el medio de agua de levaduras autolizadas. Los datos permiten aconsejar que la técnica de siembra en el Fowell se practique por trasplante de un número considerable de células a ese medio para obtener los mejores resultados

## RESUMEN

Se describe la influencia del agregado de agua de levaduras autolizadas al medio de Fowell, sobre la esporulación de levaduras del género *Saccharomyces*. Los resultados indican, en general, un aumento del número de ascos en casi todos los casos. No obstante, la respuesta de las distintas cepas a esta modificación del Fowell es distinta, lo cual indica que esas cepas tienen requerimientos diferentes para la producción de esporas.

Algunas cepas han sido ensayadas mediante siembras leves y densas en el medio de Fowell, y en líneas generales puede decirse que un aumento de la densidad de células en ese medio da resultados parecidos al agregado de agua de levaduras, probablemente porque los productos excretados por las células que se lisan alcanzan una concentración que favorece la esporulación del resto de las células.

Los resultados permiten aconsejar el uso de inóculos densos sobre el medio de Fowell para obtener los mejores resultados en la esporulación.

## SUMMARY

In the present paper we describe the influence of the addition of autolyzed yeast to Fowell's medium on the sporulation of different strains of the genus *Saccharomyces*. The data show in most of the cases an increase in the proportion of asci, in relation to the results obtained with Fowell's medium. However, there are some differences in the behavior of the various strains tested, a fact which points to differences in the requirements of these strains for maximum sporulation.

In one of the experiments, the density of cells on Fowell's agar has been varied between wide limits, and in the cases where a large inoculum was employed, there was an increase in the number of asci. The results were in general similar to those obtained by adding autolyzed yeast to Fowell's medium on which a light inoculum had been transferred.

The similarity between the results obtained by transferring a heavy inoculum on Fowell's medium, and the use of a light

inoculum on Fowell's medium to which autolyzed yeast had been added, points to the fact that the increase in cell concentration may cause the incorporation to the medium of certain substances essential for maximum sporulation.

From the practical point of view, the use of heavy inocula on Fowell's agar can be recommended in order to obtain maximum sporulation.

#### B I B L I O G R A F I A

- 1 FOWELL, R. R., Nature, 170, 578, 1952.
- 2 MANEVAL, W. E., Botan. Gaz., 78, 122, 1924.
- 3 LINDEGREN, C. C., y HAMILTON, E., Botan. Gaz., 105, 316, 1944.
- 4 KIRSOP, B. H., "Studies of Sporulation in the Genus Saccharomyces", Tesis, Universidad de Londres, London, 1956.
- 5 Orla-Jensen, S., The lactic acid bacteria, p. 84 Andr. Fred. Host a Son., Kobenhaven, 1949.

## NOTAS BIBLIOGRAFICAS

CERCOS, AUGUSTO P., *Los antibióticos y sus aplicaciones agropecuarias*, 475 pág., con ilustraciones, Editorial Salvat, Buenos Aires, 1957.

Este libro representa un encomiable esfuerzo tendiente a llenar el vacío que presentaba la literatura científica en obras de conjunto sobre las aplicaciones de los antibióticos a la agricultura y la ganadería.

Cercos divide su libro en dos partes fundamentales. La primera trata en general el problema de la antibiosis, los organismos productores de antibióticos, la obtención y el modo de acción de los antibióticos. La segunda parte se refiere específicamente al tema cuyo título lleva el libro, y trata de las aplicaciones de los antibióticos tanto en su acción inhibidora del desarrollo de los microbios patógenos de plantas y de animales, como también por su influencia directa o indirecta en el crecimiento de los organismos superiores.

La obra representa una valiosa fuente de referencia ya que la parte bibliográfica reúne unas 1.400 citas de la literatura científica con indicación en la mayoría de los casos, de los títulos de los trabajos respectivos.

Aunque el autor expresa en general muy claramente los conceptos científicos, debe lamentarse la transcripción, al final de la primera parte, de un trabajo del Ing. Favret con ideas bastante confusas acerca del fenómeno de la adaptación. Fuera de éste u otros detalles de menor importancia, creemos que este libro consigue convertirse en una contribución muy valiosa como obra de consulta para el investigador.

La obra está abundantemente ilustrada con dibujos y fotografías, estas últimas de nitidez aceptable. La impresión es clara y prácticamente exenta de errores tipográficos.

NORBERTO J. PALLERONI