

REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Tomo 2

Mendoza, 1950

Nº 1

“Año del Libertador General San Martín”

UN NUEVO MICROMETODO PARA LA REALIZACION DE PRUEBAS MICROBIANAS DE FERMENTACION (1)

por

NORBERTO J. PALLERONI (2)

I. ANTECEDENTES Y OBJETO DEL TRABAJO

La capacidad de fermentar determinados hidratos de carbono, alcoholes y glucósidos, se cuenta entre las principales características fisiológicas que permiten, junto a los caracteres morfológicos y de cultivo, llegar a la ubicación sistemática de los micro-organismos.

El *Manual de Métodos*, editado por el Comité de Técnica Bacteriológica de la Sociedad de Bacteriólogos Americanos, en su fascículo V (1947), dedicado a las pruebas de rutina para los datos exigidos en la Planilla Bacteriológica, resume los métodos a emplear en lo que se refiere al uso de las sustancias fermentescibles, el medio de cultivo basal, y la demostración del ataque por parte del microbio que se siembra. La fermentación puede ser demostrada por una parcial o total desaparición de la sustancia fermentescible, o por el reconocimiento de los productos de la fermentación, sean éstos ácidos orgánicos, alcoholes cetonas, etc., o mezclas de estas sustancias con gases (generalmente anhídrido carbónico, hidrógeno, y a veces, metano). En la generalidad de los casos, sin embargo, basta con la demostración del aumento de acidez o la producción de gases, o de ambas cosas a la vez, que pueden estudiarse conjuntamente en medios líquidos, por el agregado de indicadores en concentraciones apropiadas y con tubitos invertidos para la captación del gas producido. En lugar de estos tubos, puede agregarse al medio

(1) Trabajo realizado en el laboratorio de la cátedra de Microbiología Industrial y Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

(2) Ing. Agr. Profesor Extarordinario de Microbiología Agraria e Industrial de la Facultad de Ciencias Agrarias.

con indicador, agar en proporción de 0.25 %, en cuyo caso, las burbujas del gas que se produce quedan retenidas en el seno del medio de cultivo.

Por lo general, se agrega el 1 % de la sustancia fermentescible al medio basal, aun cuando esa proporción puede reducirse en el caso de tratarse de un compuesto muy caro. En la práctica, un método económico consiste en distribuir el medio de cultivo en tubos pequeños (1 cm. de diámetro por 12 cm. de largo), en cuyo caso puede utilizarse cantidades de 1 cc. (Soriano, 1938).

Guilliermond (1912), preconiza, para el estudio de las características fermentativas de las levaduras, una modificación del método de Lindner (1909), consistente en sembrar el microorganismo en el agua de levaduras que llena la excavación de un portaobjetos modelo de Koch, agregar una pequeña porción del azúcar, y tapar con cubreobjetos flameado, para bordear finalmente con vaselina. Cuando hay producción de burbujas de gas, que pueden llegar a desplazar el cubreobjetos de su lugar, se controla al microscopio antes de dar por positiva la prueba, ya que pueden desarrollar los gérmenes contaminantes que trae la sustancia fermentescible agregada, que no se esteriliza previamente. Jörgensen (1948) describe un método muy parecido al de Lindner, e igualmente económico, en el cual se utiliza, en lugar del portaobjetos excavado, un porta común, sobre una de cuyas caras se fija, con vaselina sólida, un anillo de vidrio; luego de verter el agua de levaduras, se siembra el germen y se agrega unos pocos centigramos del azúcar, se tapa con un cubreobjetos flameado y bordea con vaselina. Estos dos últimos métodos, muy similares entre sí, se cuentan entre los más cómodos y económicos.

Citaremos también, el método que utiliza los tubos de Smith (1890), o método de Einhorn (1895), y, finalmente, el método que describe Kluyver (1920) y que utiliza el aparato ideado por este autor y van Iterson, y el que describe ROBERTS (1950), empleado en el laboratorio de Carlsberg por WINGE, que consiste en un tubo en U, en cuyas ramas se fracciona la suspensión del germen en el medio de cultivo, por el agregado de mercurio estéril. Se cierra una de las ramas, eliminando el aire por inclinación del tubo, y se incuba, sosteniendo los tubos en soportes especiales.

En la obra de Stelling-Dekker (1931), se hace una crítica de los métodos de Lindner, de Einhorn y el cuantitativo de Kluyver, considerándose a este último como "método patrón", por reunir las condiciones óptimas, especialmente cuando se considera su aplicación a análisis cuantitativos.

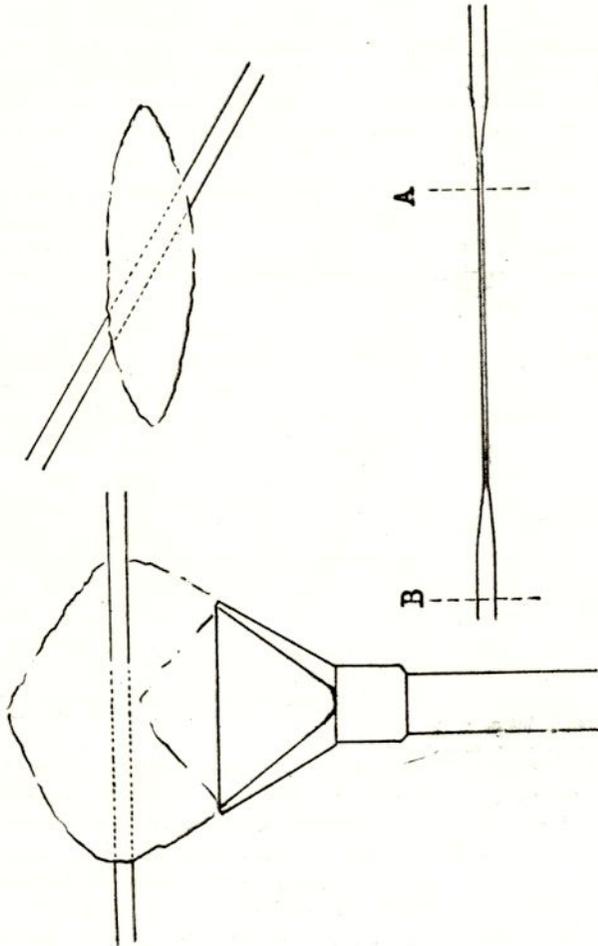


Figura 1

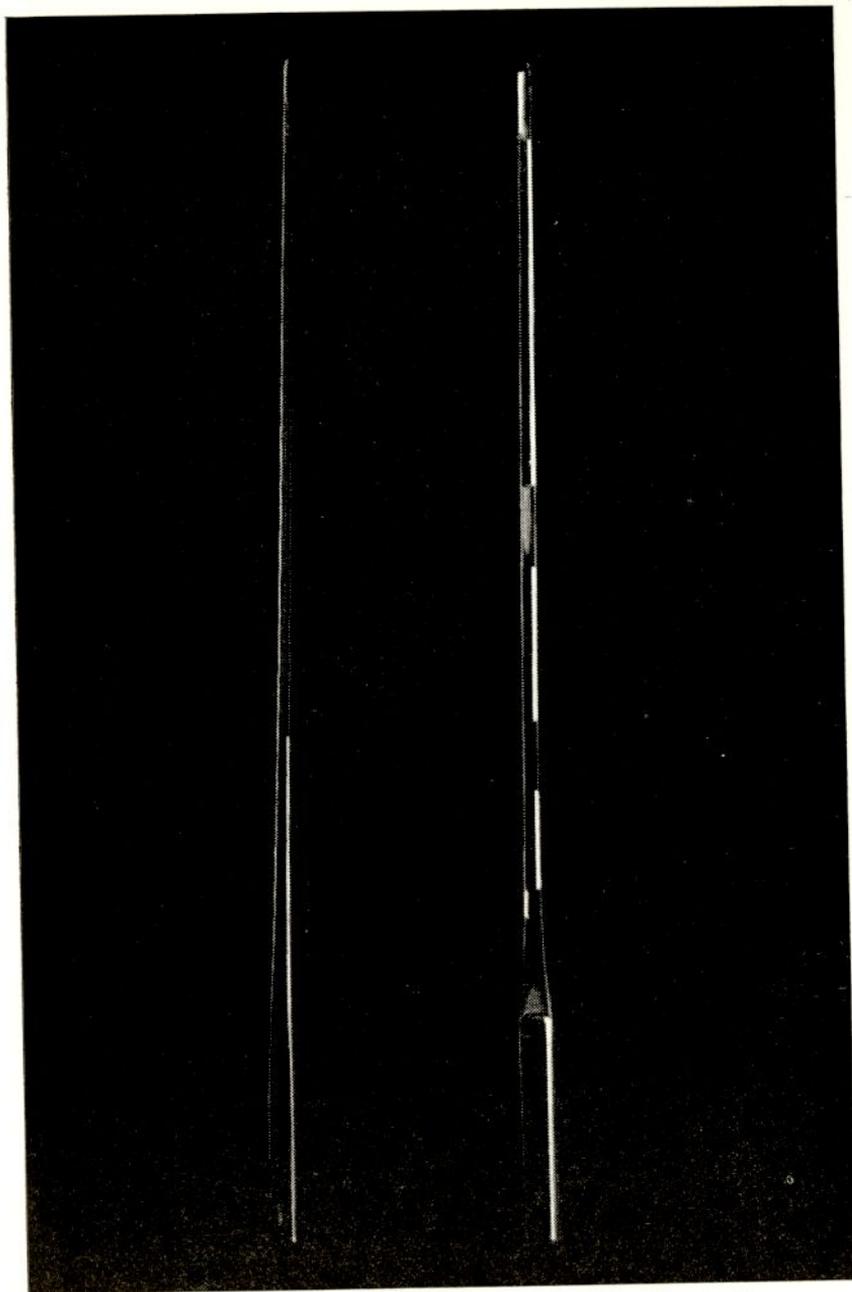
El método que describimos a continuación, lo hemos ideado para satisfacer la necesidad de realizar pruebas rápidas y en número grande, con el objeto de determinar las características de fermentación de numerosas cepas de levaduras, provenientes de algunos estudios genéticos que estamos realizando en la Cátedra de Microbiología Agrícola e Industrial. Se utilizan, para su realización, capilares de vidrio, fácilmente obtenibles a partir de pipetas Pasteur, y ofrece a la vez las ventajas de ser considerablemente más económico que los que hemos descrito, corrientemente utilizados en las prácticas microbiológicas, de resultados rápidos, de fácil ejecución, y de una eficiencia similar a los mejores métodos conocidos.

II. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

a) *Preparación de las pipetas capilares*

El método objeto de la presente comunicación, se efectúa utilizando como recipientes de cultivo, tubos capilares que se obtienen estirando a la llama trozos de pipetas Pasteur de diámetro apropiado. Las numerosas pruebas realizadas para la determinación de las dimensiones más convenientes, nos han conducido a establecer las siguientes normas para la confección de las pipetas capilares: Se hacen pipetas tipo Pasteur de doble punta, de un diámetro un poco mayor que las comunes, a partir de caños de vidrio de unos 7 mm. de diámetro interno y $\frac{1}{2}$ mm. de espesor de paredes. La pipeta Pasteur puede tener un diámetro interno de 2 a 2,5 mm.; abriendo sus extremos, se estira de nuevo a la llama del Bunsen, calentando una zona de 1 cm. o poco más, de largo. Resulta muy conveniente utilizar una mariposa de unos 2 cm. de ranura fijada al mechero, para obtener una llama en forma de abanico. Introduciendo en esa llama un trozo de pipeta Pasteur, con una oblicuidad apropiada respecto del plano medio del abanico formado por la llama, se puede calentar a voluntad una zona de tal longitud que permita obtener, al ser estirada, un capilar de 5 a 6 cm. de largo (ver figura 1). Con la ayuda de una pinza aplicada en A, se quiebra el capilar, y rayando en B con una limeta, se corta fácilmente por la parte ancha, quedando al final una pipeta con una zona capilar de 4 a 5 cm. de longitud. Es conveniente que el diámetro interno de la pipeta en esa zona no sea inferior a $\frac{1}{2}$ mm.

En poco tiempo, es posible adquirir una práctica suficiente como para hacer, rápidamente, un número considerable de pipetitas, que pueden ser conservadas en cajas de Petri esterilizadas.



Izquierda: Aspecto que presenta el capilar antes de que se inicie la fermentación.

Derecha: Aspecto del capilar después de la fermentación.

El diámetro interior, relativamente grande, del capilar, permite un flameado rápido de la punta antes de ser utilizada, sin peligro de que se cierre; además, los resultados son más fácilmente observables, por la perfecta visibilidad de la columna líquida.

b) *Realización de las experiencias de fermentación*

En la excavación de un portaobjetos modelo de Koch, flameado y apoyado sobre la mesa horizontalmente, se vierte una o dos gotas de vaselina líquida esterilizada previamente al autoclave, y se cubre rápidamente con una cubeta pequeña de vidrio que, a modo de campana, impedirá las contaminaciones de los gérmenes del aire.

Sobre la cara inferior de un portaobjetos común, limpio, flameado y enfriado, se deposita una gota del medio de cultivo con el azúcar correspondiente —disuelto en la proporción y de la forma que indicamos más adelante—, mediante un ansa grande (de unos 4 mm. de diámetro), y allí se suspende una porción del desarrollo del germen en un medio de cultivo solidificable, hasta que el medio tome un aspecto lechoso, teniendo cuidado de que la densidad de siembra sea relativamente grande.

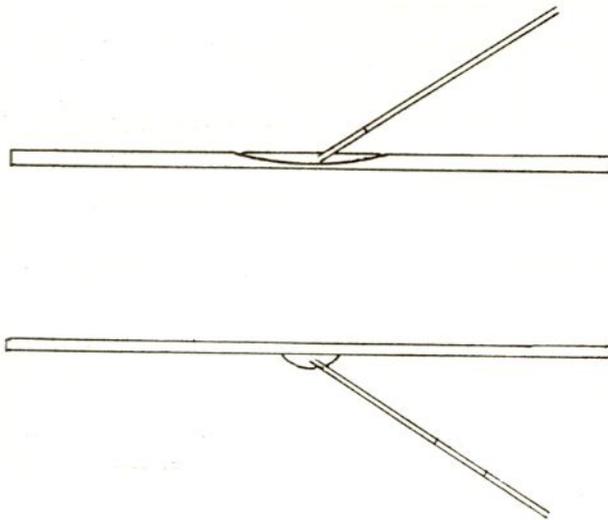


Figura 2

Tomando ahora la pipetita por su extremo ensanchado, y flameando el otro extremo rápidamente, se introduce la punta capilar en la vaselina líquida, alzando lo suficientemente la campana que cubre el portaobjetos modelo de Koch, y la vaselina ascenderá por capilaridad. Se retira al pipeta con rapidez cuando ha alcanzado a llenarse el volumen contenido en unos 5 mm. de longitud, y se introduce de inmediato en la gota con la suspensión, que entra rápidamente (ver fig. 2). Por lo general, la cantidad máxima de líquido contenida en un ansa de

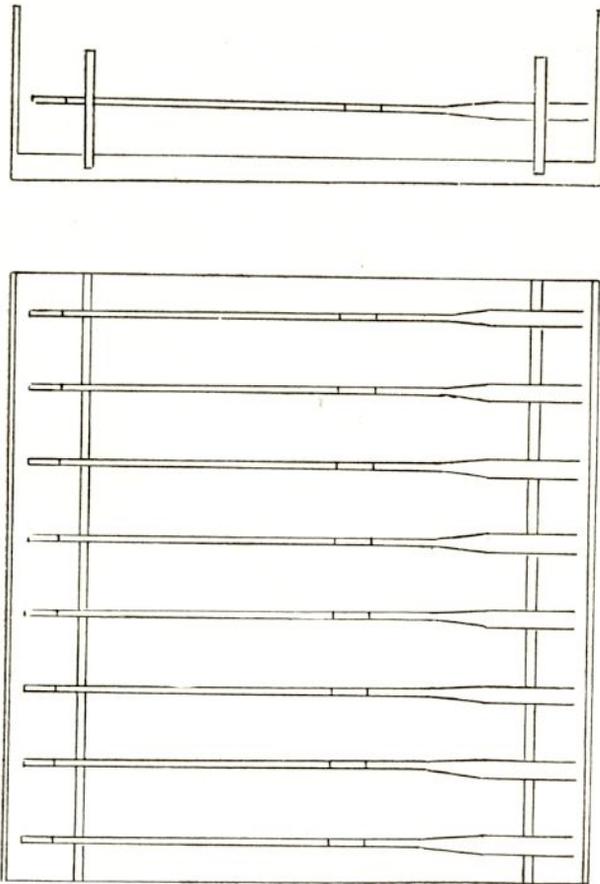


Figura 3

las dimensiones indicadas (vale decir, la cantidad retenida por el ansa cuando se la hace salir horizontalmente del medio de cultivo líquido), excede aún en una pequeña porción el volumen de la zona capilar de la pipetita. Una vez completada la

cantidad conveniente, se cierra el extremo capilar con una pequeña cantidad de vaselina sólida, tomada con un hilo de platino y fundida al calor de una llama pequeña.

Las operaciones indicadas requieren, en conjunto, muy pocos segundos de tiempo, y puede adquirirse, con alguna práctica, un rápido dominio de su ejecución.

Las pipetas ya sembradas pueden depositarse horizontalmente en pequeñas gradillas construídas a propósito, de acuerdo al esquema que indica la figura 3, o de otra forma cualquiera que permita apilar varios soportes y ocupar el mínimo de espacio en la estufa de cultivos.

Al cabo de un cierto tiempo de incubación, variable con el organismo que se considera, y con la sustancia cuya fermentación se estudia, la formación de gases se pone claramente de manifiesto en la ruptura de la columna líquida por una o varias burbujas a lo largo del capilar. La fotografía de la lámina I muestra claramente el aspecto de un capilar en esas condiciones (el de la derecha), por comparación con otro en el que aun no ha ocurrido la fermentación. Si al cabo de un cierto tiempo no ha habido formación de gas, puede evacuarse el contenido del capilar, adosándolo a un tubo de goma con boquilla (el mismo que se utiliza con combinación con los micromanipuladores en los laboratorios de microbiología), mezclando el líquido fermentado con una gotita de indicador depositada mediante un ansa chica en la superficie de un portaobjeto limpio. Puede aún cubrirse la mezcla con un cubre, y reconocer al microscopio la ausencia de contaminantes, con lo cual el procedimiento completa así su utilidad como micrométodo de fácil y rápida ejecución.

III. EXPERIENCIAS REALIZADAS

Hemos tenido oportunidad de comparar la eficacia de este procedimiento con el método clásico de siembra en tubitos con medio de cultivo basal al agar blando y con indicador, al cual se agregaron los azúcares en proporción del 1%, y hemos comprobado una coincidencia absoluta en todos los casos experimentales, que consistieron en la determinación de las características fermentativas de una serie de cepas de levaduras de la colección de la Cátedra.

Las cepas ensayadas fueron las siguientes:

- Nº 3: Levadura elíptica aislada de mosto de uva *Folle Blanche*, en la Facultad de Ciencias Agrarias, el 3/3/50.
- Nº 16: Levadura elíptica aislada de un vino en el que ha ocurrido la refermentación cuando tenía 16° de alcohol. Aislada el 9/3/50.

- N° 23: Levadura elíptica proveniente de una muestra de una bodega particular. La muestra contenía un elevado porcentaje de anhídrido sulfuroso. Aislada el 13|3|50.
- N° 24: *Schizosaccharomyces sp.*, de la misma muestra anterior.
- N° 36: Levadura elíptica de un mosto en fermentación, de una bodega particular. Aislada el 13|3|50.
- N° 189: Híbrido obtenido en la Fac. de C. Agrarias entre las cepas Nros. 16 y 23, en junio de 1950.
- N° 194: Híbrido proveniente del apareamiento de otros dos haploides de las mismas cepas 16 y 23. Junio 1950.
- N° 333: Cepa recibida del Instituto de Investigaciones Económicas y Tecnológicas, del Ministerio de Economía, Obras Públicas y Riego, en cuya colección figura bajo la denominación de *Zygosaccharomyces sp.*

De los medios de cultivo basales, hemos utilizado de preferencia la modificación de Soriano (1938) a los de Kulp y Rettger, y Hunt y Rettger, y el agua de levaduras preparada de acuerdo a la fórmula N° 13 que da Jørgensen (1948). Este último medio permite resultados más netos y rápidos que el medio de caseína digerida de los autores mencionados en primer término. Para la preparación del agua de levaduras nos hemos visto en dificultades, ya que la levadura prensada que adquirimos en el comercio, expandida con diferentes nombres comerciales, y que utilizamos corrientemente para preparar el agua de levaduras autolisadas, contiene siempre porciones de almidón que la hacen inutilizable como material para un medio de cultivo basal desprovisto de hidratos de carbono. Ante tal circunstancia, hemos recurrido a obtener por cultivo con aereación forzada, una cierta cantidad de levadura, que fué centrifugada y lavada repetidas veces, a fin de eliminar todo resto de sustancias fermentescibles provenientes del medio de cultivo utilizado.

El comportamiento fermentativo de las cepas mencionadas fué estudiado frente a la glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa y galactosa, en las proporciones siguientes: 1, 2, 5, 10, 15 y 20%. A fin de eliminar la probable influencia del cloroformo sobre la actividad de algunas enzimas sensibles al mismo, como la maltasa (1) —única razón a la que pudimos atribuir algu-

(1) Cuando el método corriente se practica agregando al medio de cultivo los azúcares en solución acuosa sobre cloroformo, tal peligro no existe por el calentamiento a que se somete la mezcla, como medio de evitar el desarrollo de los contaminantes que puedan haberse introducido.

nos resultados negativos en la fermentación de maltosa por las cepas mencionadas, en las primeras pruebas realizadas con el agregado directo de un ansa chica de la solución de azúcar al 10% esterilizada sobre cloroformo, a un ansa del medio basal— agregamos a los medios basales estériles los azúcares esterilizados por filtración a través de bujía Chamberland y calentamos la mezcla en baño maría a 100° durante 10 minutos.

También probamos distintas concentraciones de siembra, controladas groseramente por la mayor o menor opalescencia producida por la suspensión de los gérmenes.

Las experiencias realizadas nos conducen a establecer que, para las levaduras, las condiciones que permiten resultados más rápidos y seguros son las siguientes: agua de levaduras, como medio basal, con el azúcar disuelto en proporción del 5%, y una densidad de siembra relativamente grande.

En todos los casos en que las cepas eran capaces de fermentar glucosa y sacarosa, utilizando nuestro método los resultados positivos pudieron ser leídos en períodos de tiempo que oscilan alrededor de una hora. Los resultados negativos acusados por los testigos, y por las pruebas con azúcares que las cepas mencionadas eran incapaces de fermentar por ningún método, nos ha permitido excluir la posibilidad de la fermentación de los azúcares resultantes de la hidrólisis de las sustancias de reserva de las células sembradas, según la objeción que, al método original de *Lindner* hace *Stelling-Dekker* (1931).

Con respecto a la maltosa, hemos comprobado que, en algunos casos, el tiempo al cabo del cual se manifiesta la formación de gas es aproximadamente el mismo que con el método corriente, aun cuando siempre el fenómeno aparece antes en el capilar. Algunas cepas fermentaron mejor este azúcar cuando la siembra era menos densa que en el caso de otras, pero a poco tiempo, los resultados se equilibraron en todos los casos.

Finalmente, determinamos, en forma aproximada, la ventaja que significa este procedimiento, desde el punto de vista económico, con relación al método del medio al agar blando en tubos chicos, y al de *Linder*, modificado por *Guilliermond*, que resultan los mejores entre los más generalizados en las prácticas bacteriológicas.

	Método con medio semi-sólido en tubitos	Método de <i>Lindner</i> , modif. por <i>Guilliermond</i>	Método propuesto
Cantidad mínima de medio de cultivo	1 cc.	0.15 cc	0.0065 cc.
Cantidad mínima de azúcar	0.01 g.	0.0030 g.	0.0003 g.

(Los datos para el método de *Lindner* y el capilar resultan de un promedio de varias determinaciones).

Las cifras del cuadro permiten deducir que, mientras con el método corriente, por cada gramo de azúcar se puede realizar 100 pruebas, con el de *Lindner* modificado por *Guilliermond* es posible efectuar unas 300, y con el capilar, aproximadamente 3.000, lo cual para el caso particular de algunas sustancias fermentescibles sumamente costosas, representa una economía nada despreciable.

IV. CONCLUSIONES Y RESUMEN

Se describe un método rápido, sencillo y económico para la realización de pruebas microbianas de fermentación de hidratos de carbono, alcoholes y glucósidos. Para su ejecución se utilizan pipetitas capilares de 4 a 5 cm. de largo y $\frac{1}{2}$ mm. de diámetro interno.

Mediante su aplicación, no sólo resulta posible reconocer la formación de gases por ruptura de la columna líquida en el interior del capilar, sino también el aumento de la acidez, poniendo en contacto el líquido fermentado con una gotita de indicador. Los resultados pueden ser leídos muchas veces al cabo de períodos de tiempo considerablemente menores que los que requieren los métodos clásicos.

El método descrito permite reducir el gasto de sustancia fermentescible en las concentraciones ensayadas en las experiencias que se han realizado, a cantidades 10 veces menores que las que requiere el micrométodo de *Lindner*, y 30 veces menores que el método del medio al agar blando en tubitos.

En las experiencias realizadas con levaduras, a fin de determinar la eficacia del método, comparándolo con los cono-

cidos, pudieron establecerse las siguientes condiciones para la realización de las pruebas: soluciones al 5 % de los distintos azúcares en agua de levaduras, preparada con levadura prensada libre de almidón. Los azúcares se agregan luego de haber sido esterilizados por filtración, en soluciones concentradas.

V. BIBLIOGRAFIA

EINHORN, M., 1885. *Virchows's Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und klin. Medicin*, Bd. 102, p. 263 (cit. por Stelling-Dekker, 1931).

GUILLIERMOND, A., 1912. *Les levures*, París.

JÖRGENSEN, A., 1948. *Micro-organisms and fermentation*, London.

KLUVER, A. J., 1914, *Biochemische Suikerbepalingen*, Delft (cit. por Stelling-Dekker, 1931).

LINDNER, P., 1909. *Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsweiben*, 6te. Aufl., Berlín (citado por Guilliermond, 1912).

ROBERTS C., 1950. *Methods in yeast genetics*. Meth. in Medical Research, 3: 37-50.

SMITH, Th., 1890. *Centr. f. Bakt.*, Bd. 7, (Cit. por Stelling-Dekker, 1931).

Society of American Bacteriologists, Committee on bacteriological technic, 1947. *Manual of methods for pure culture study of bacteria*, fasc. V., Geneva, N. York.

SORIANO, S., 1938. *Estudio microbiológico del proceso de fermentación de la "chicha"*, Rev. del Inst. Bacteriológico, Vol. VIII, Nº 3; 231-321.

STELLING-DEKKER, N. M., 1931. *Die Sporogenen Hefen*, Holanda.