

ASIMILACION DE FUENTES DE CARBONO EN CEPAS DE SACCHAROMYCES: RESULTADOS COMPARATIVOS CON TRES METODOS

L.A. QUEIROZ

Departamento de Micología do Centro de Ciências Biológicas (CCB)
da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);
Av. Prof. Artur de Sá s/n, Recife, 50.000, Brasil.

N.O. VILLAGARCIA

Van den Bergh, Lever y Asociados;
Manuel Estevez 1120, Avellaneda 1870,
Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

Los métodos API, MINITEK y BEIJERINCK fueron usados en los ensayos de asimilación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa de 8 cepas de *Saccharomyces*, a fin de verificar y analizar la reproductibilidad e implicaciones de los resultados obtenidos con esos métodos. Los resultados de asimilación de glucosa fueron idénticos con los tres métodos, habiendo variado los demás. La mayor variación fue registrada en el método API y menor en MINITEK; en BEIJERINCK hubo mayor constancia en los resultados.

INTRODUCCION

En el estudio e identificación de levaduras se adoptan como criterios taxonómicos, el tipo de reproducción, la morfología y características fisiológicas; entre estas últimas, los ensayos de asimilación, tienen considerable importancia especialmente para las levaduras con baja o nula capacidad de fermentar carbohidratos (24, 25).

En referencia a estos criterios taxonómicos, se han publicado trabajos con el objeto de facilitar el estudio e identificación de las levaduras (2, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 15, 19, 23).

Estudios sobre la composición de las bases del DNA (28, 29), composición de pared (37, 38), quimiota xonomía (18), propiedades antigénicas (11, 22), determinación de oxidasa, nitrito y nitrito reductasas (16, 17), así como el análisis de los ácidos grasos celulares (20), han aumentado los conocimientos sobre levaduras, ofreciendo al mismo tiempo, nuevos criterios para la identificación.

Los métodos clásicos, auxonográfico de BEIJERINCK (8, 9), con medio basal sólido y el de WICKERHAM (39 - 40), con medio basal líquido, son usados en los ensayos de asimilación aplicados al estudio e identificación de las levaduras; el método auxonográfico de BEIJERINCK (8, 9), fue adaptado por LODDER en 1934 y aplicado por primera vez al estudio de levaduras anascosporadas no fermentadoras y posteriormente por DIDDENS y LODDER

SUMMARY

[Carbohydrate assimilation in *Saccharomyces* strains: Comparative results with three methods.]

The API, MINITEK and BEIJERINCK methods were adopted for the tests of assimilation of glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose of 8 strains of *Saccharomyces* to check on and analyze the reproductivity and implications of the results obtained by these methods. The results of the assimilation of glucose were constant with the three methods but those relate to other carbohydrates varied. The rate of variation was greater in the API method and smaller with the MINITEK method; the results achieved with the BEIJERINCK method were constant.

en 1942 a los géneros *Candida*, *Brettanomyces* y *Trichosporon* (25). En estos ensayos, la glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, fructuosa, manosa y etanol, fueron empleados inicialmente como fuentes de carbono; posteriormente WICKERHAM y BURTON en 1948, seleccionaron 30 entre 70 compuestos de carbono, incluidos entre hexosas, pentosas, alcoholes, ácidos y sales (24).

Las informaciones sobre aeración, tensión de CO₂, composición y pH del medio basal, uso de cromatografía (24), modificaciones en los métodos clásicos, sobre todo referentes al inóculo, distribución de fuentes de carbono y empleo de indicadores, así como las evaluaciones de los resultados surgidos de las modificaciones (7, 21, 26, 30, 32, 35, 36), han posibilitado una mejor realización en los ensayos de asimilación.

Basados en los sistemas clásicos de identificación de levaduras, existen sistemas modernos elaborados industrialmente y comercializados para el estudio e identificación de levaduras, pudiendo mencionar API (1), MINITEK (6), MYCOTUBE-BCB-MICOSLIDE LIQUOID (34), RANDOLPH MULTITEST MYCOLOGY PLATE (31); varios trabajos ofrecen una evaluación del uso e importancia de algunos de esos sistemas creados en su mayoría para hacer más rápida la identificación de levaduras, sobre todo de interés médico (10, 27, 31, 33).

Este trabajo tuvo como objetivos, verificar, comparar y analizar los resultados de los ensayos de asimilación de carbohidratos realizados con los

sistemas API (1), MINITEK (6) y BEIJERINCK (8) aplicados a especies del género *Saccharomyces*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas de Levaduras: Fueron seleccionadas 8 cepas de *Saccharomyces*, dos de cada una de las especies *S. cerevisiae*, *S. italicus*, *S. oleaginosus* y *S. bayanus*, todas catalogadas y conservadas en la Micoteca del Departamento de Micología, CCB de la UFPE. En la selección de las cepas fueron adoptados los criterios: a) cepas lactosa negativa (una de las características del género *Saccharomyces*) y maltosa positiva; b) entre estas cepas, correspondientes al esquema de asimilación de la galactosa y sacarosa, contenido en la Tabla 1; c) cepas de buen desarrollo cultural en los medios simples (sin antibiótico y sin extracto de levadura) agar-Sabouraud y agar-malta, a temperatura ambiente (T.A.) que osciló entre 25° C y 29° C, en un período de 24 a 72 horas.

Fuentes de Carbono: fueron usados los carbohidratos glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa y lactosa.

Ensayos de asimilación: fueron adoptados los métodos API (1), MINITEK (6) y BEIJERINCK (8), usando cultivos con 48 horas de desarrollo a T.A.; los ensayos fueron realizados 5 veces con todas las muestras. Las tiras (API) y placa (MINITEK y BEIJERINCK) fueron dejadas a T.A.; la lectura de los resultados se realizó a las 48 horas para el método API y a las 72 horas para los demás métodos.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I, la reproductibilidad de los resultados fue mayor en los ensayos aplicados con el método de BEIJERINCK (8), disminuyendo con MINITEK (6) y API (1). La glucosa considerada patrón positivo, fue invariablemente asimilada por

todas las cepas con los tres métodos, ocurriendo lo mismo con maltosa en API (1) y BEIJERINCK (8). Con excepción de un resultado sacarosa positivo en una cepa de *S. oleaginosus* 1820, los demás resultados obtenidos con el método de BEIJERINCK (8), correspondieron al espectro de asimilación característico de las respectivas especies probadas. Comparando con los resultados obtenidos por ese método, se observa que a través del sistema API (1) variaron los de galactosa en 1 cepa, sacarosa en 4 y lactosa en 5 cepas; los cero (0) positivo, ocurrieron en 4 cepas lactosa positiva. Con el método MINITEK (6), se evidenció una variación en los resultados de la galactosa, 3 de sacarosa y 2 de maltosa.

En el sistema API (1) la cúpula correspondiente a cero (0) está exenta de fuente de carbono y de cualquier inhibidor, sirviendo por lo tanto como testigo negativo en los ensayos de asimilación; los resultados registrados como positivos, indican solamente una proliferación de las células de levaduras, como consecuencia de la utilización del endógeno (acumulado durante la fase exponencial de crecimiento celular) en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, teniendo en cuenta que los inóculos fueron preparados a partir de cultivos jóvenes con 48 horas de desarrollo. Aplicando este mismo razonamiento a los resultados positivos en la lactosa en API (1), (siendo negativos en MINITEK (6) y BEIJERINCK (9)), deben ser considerados como "falsos positivos".

La distribución previa de las fuentes de carbono contenidas en las cúpulas, así como la forma de evidenciar la asimilación a través de la opacidad del medio contenido en éstas, aumentan el margen de duda respecto a algunos resultados positivos obtenidos con API (1); no ocurre lo mismo con los resultados por MINITEK (6) y BEIJERINCK (8), en los cuales las fuentes de carbono son distribuidas en la superficie del medio contenido en las placas y los resultados "positivos" de asimilación, son evidenciados a través de un denso "halo" de crecimiento alrededor del punto de depositación de la fuente de carbono.

Los resultados indican que el método de BEIJERINCK (8), ofreció mayor reproductibilidad y margen de seguridad para la realización de los ensayos de utilización de fuentes de carbono.

TABLA 1

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE ASIMILACION DE CARBOHIDRATOS OBTENIDOS A T.A. POR LOS METODOS API EN 48 HORAS, MINITEK Y BEIJERINCK A LAS 72 HORAS

CEPAS DE SACCHAROMYCES	METODOS															
	API					MINITEK					BEIJERINCK					
	FUENTES DE CARBONO					FUENTES DE CARBONO					FUENTES DE CARBONO					
	G'	GAL	S	M	L	O''	G'	GAL	S	M	L	G'	GAL	S	M	L
S. CEREVISIAE 1303	+	*	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S. CEREVISIAE 1460	+	+	*	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S. ITALICUS 512	+	+	+	+	-	-	+	*	*	*	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	*	*	*	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S. ITALICUS 1338	+	+	*	+	-	-	+	+	*	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	*	+	-	-	+	+	*	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	*	+	+	*	+	+	*	+	-	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	*	+	+	*	+	-	+	+	+	+	-
S. OLEAGINOSUS 1807	+	+	-	+	-	-	+	+	-	*	-	+	+	-	+	-
	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
S. OLEAGINOSUS 1820	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
S. BAYANUS 208	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	+	*	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	+	*	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
S. BAYANUS 1288	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-

G = GLUCOSA S = SACAROSA L = LACTOSA ' = PATRON POSITIVO
 GAL = GALACTOSA M = MALTOSA O = CERO " = PATRON NEGATIVO
 * = RESULTADOS NO ESPERADOS

REFERENCIAS

1. Appareils et Procédés d'identification. API20C. API SYSTEM S.A. La Balme Le Grottes-38290 Montalien Vercien. France.
2. Artagaveytia-Allende, R.C. (1961) Tablas para facilitar la identificación de las levaduras. Centro de Cooperación Científica de la UNESCO para la América Latina.
3. ---- (1965). El género *Candida*: algunos comentarios sobre su estado actual. *Mycopathol. Mycol. App.*, 25 : 237-93.
4. Barnett, J.A. (1971). Selection of tests for identifying yeasts. *Nat. New Biol.* 232 (18).
5. ---- & Pankhurst, R.J. (1974). A new key to the yeasts. A key for identifying yeasts based on physiological tests only. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, 273 p.
6. Becton, Dickinson & Company. Sistema miniaturizado de diferenciación de microorganismos. MINITEK. Identificación de levaduras Becton, Dickinson & Company, S.A., Buenos Aires.
7. Beech, F.W., Carr, J.G. & Codner, R.C. (1955). A multi-point inoculator for plating bacteria or yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 13 : 408-10.
8. Beijerinck, M.W. (1970). Criteria and methods used in classification. In LODDER, J., ed. *The Yeasts. A Taxonomic study.* Amsterdam, p. 83.
9. ---- (1889). L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques. *Sci. Exac. et Nat.*, 23 : 367-72.
10. Bowman, P.J. & Ahearn, D.G. (1976). Evaluation of commercial systems for the identification of clinical yeasts isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 4 : 49-53.
11. Campbell, J. (1970). Antigenic properties of yeast of various genera. *J. Appl. Bact.*, 34 : 237-42
12. ---- (1971) Numerical taxonomy of various genera of yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 67 : 223-31.
13. ---- (1972) Numerical analysis of the genera *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. *J. Gen. Microbiol.*, 73 : 279-301.
14. ---- (1973) Numerical Analysis of *Hansenula*, *Pichia* and Related yeast genera. *J. Gen. Microbiol.*, 77 : 427-41.
15. Dolan, C.T. (1971) A practical approach to identification of yeast like organisms. *Amer. J. Clin. Path.*, 55 : 580 - 90.
16. Fiol, J.B. (1975). A critical study of the taxonomic value of some test of assimilation used for the classification of the sporogenous yeasts. *Mycopathologia*, 57 : 79 - 88.
17. ---- & Billon-Grand, G. (1978). Etude de quelques enzymes intracellaires dans les genres *Dekkera* et *Brettanomyces*; conséquences systematiques. *Mycopathologia*, 64 : 183 - 6
18. Gorin, P.A.J. & Spencer, J.F.T. (1970). Proton magnetic resonance spectroscopy-an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. *Ad. App. Microbiol.*, 13 : 25 - 89.
19. Gower, J.C. & Barnett, J.A. (1971). Selecting tests in diagnostic keys with unknown responses. *Nature*, 232 (13).
20. Gunasekaran, M. & Hughes, W.T. (1980). Gás-liquid chromatography: a rapid method for identification of different species of *Candida*. *Mycologia*, 72:505-11.
21. Huppert, M.; Jarper, G.; Sun, S.H. & Delanerdle, V. (1975). Rapid methods for identification of yeasts. *J. Clin. Microbiol.*, 2 : 21-34.
22. Jones, G.R. & Stewart-Tull, D.E.S. (1975). Antigenic analysis of yeasts cell-walls. *Sabouraudia*, 13:94-109.
23. ---- (1975) A comparison of analytical methods for the numerical taxonomy of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 89: 175-81.
24. Lodder, J. (ed.) (1970). *The yeasts. A taxonomic study*, 2 ed. Amsterdam, 1385 p.
25. Lodder & Kreger-Van Rij (1952). *The yeasts. A Taxonomic study.* Amsterdam, North Holland, 713 p.
26. Mickelsen, P.A.; McCarthy, L.R. & Propst, M.A. (1977). Further modifications of the auxanographic method for identification of yeasts. *J. Clin. Microbiol.*, 5 : 297-301.
27. Miller, R.E. Jr. & Ling-Phie, L. (1976). Evaluation of a multitest microtechnique for yeast identification. *Amer. J. Med. Tech.*, 42 : 238 - 42.
28. Nakase, T. & Komagata, K. (1968) Taxonomic significant of base composition of yeast DNA. *J. Gen Appl. Microbiol.*, 14 : 345 - 57.
29. ---- (1971). DNA base composition of some species of yeasts and yeast-like fungi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17: 363-69.
30. Negroni, P. & Daglid, C.A.N. (1949). Aplicación de nuevas técnicas para el estudio fisiológico de los hongos levaduriformes. *An. de la Soc. Cient. Argent.*, 4 : 271-78
31. Quadri, S.M.H. (1978) Evaluation of a commercial multi-test system for identification of yeasts. *Amer. J. Med. Technol.*, 44 : 368-72.
32. ---- & Nichols, C.W. (1978). Tube carbohydrate assimilation method for the rapid identification of clinical significant yeasts. *M. Microbiol. Immunol.*, 65 : 19-27.
33. Quast, R. (1978). Vereinfachte fermentations-und assimilations-tests zur identifizierung von helffen. *Mykosen*, 21 : 81-6.

35. Weijman, A.C.M. (1976) Cell wall composition of taxonomy of *Cephaloscyus fragrans* and some Ophiostomataceae *Antonie van Leeuwenhoek* 42 : 315-324.
36. Von Arx, J.A., Rodríguez de Miranda, L.; Smith M.T. & Yarrow, D. (1977) *Studies in mycology* No. 14. The Genera of Yeasts and the yeast like fungi. Baarn: Centraalburcaan voor Schimmelcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
37. Tsuchiya, T.; Fukasawa, Y.; Taguchi, M.; Nakase, T.; Shinoda, T. (1974) Serological aspects of yeasts classification. *Mycopath et Mycol. Appl.* 53: 77-92.
38. Taguchi, M.; Tsukiji, M.; Tsuchiya, T. (1979) Rapid identification of yeasts by serological methods. A combined serological and biological method. *Sabouraud* 17: 185-191.
39. Wickerham, L. J. (1942) Taxonomy of yeast. *Journal Bacteriology* 46: 501.
40. Wickerham, L. J. (1951) Taxonomy of yeast. United States Department of Agriculture Technical Bulletin No. 1029, 56 p.