

BALANCE NITROGENADO DEL
"ASPERGILLUS NIGER"
EN MEDIOS RAULIN

Por AMELIA PÉREZ VÁZQUEZ

Beca de los Laboratorios Fernández y Canivell en el
Certamen Científico de 1944

En el trabajo actual, que con el título de "Balance nitrogenado del *Aspergillus niger* en medios Raulin", tengo el honor de presentar a la Real Academia de Farmacia, séame permitido, como preámbulo, el manifestar mi agradecimiento a tan docta Corporación, que me otorgó la alta distinción de adjudicarme el Premio Fernández y Canivell, que me ha permitido realizar la presente Memoria en el curso 1943-1944.

Al mismo tiempo, rindo mis más sinceras gracias a los doctores M. Comenge y A. Santos Ruiz, los cuales, con su maestría bien probada, me dirigieron los estudios a que este trabajo se refiere, orientándome y enseñándome el valor e importancia de la técnica y perseverancia, como virtud máxima en la investigación; que como alumna de estos insignes maestros nunca deberé olvidar, sino procurar imitar a todos los que fueron y son mis maestros, cuyo recuerdo en este momento es el mejor aprecio que puedo hacer para valorizar mi modesta investigación; e igualmente agradezco a los Sres. Fernández y Canivell su filantropía para pensionar estos trabajos.

Balance nitrogenado del Aspergillus niger en medio Raulin

Los trabajos de M. Raulin (1), discípulo de Pasteur, demuestran que los esporos del *Aspergillus niger*, sembrados en un

medio artificial de composición mineral determinada, y en circunstancias convenientes, influyen decisivamente en su desarrollo, de tal manera que los cultivos obtenidos dan 1/24 más de su valor en comparación con los obtenidos en medios naturales.

Tomando como base este trabajo clásico, repetimos nosotros las experiencias, con objeto de ver la influencia que tienen los distintos medios sintéticos en la variación de los diferentes proteidos componentes del *Aspergillus niger*.

La técnica empleada es el balance nitrogenado, objeto y fin de nuestro trabajo de investigación.

Para completar aún más y aquilatar en lo posible el trabajo, nos ha parecido conveniente, además de verificar el balance nitrogenado, determinar las variaciones que sufren otros elementos de este hongo, cuales son: nitrógeno total, grasa, celulosa, glucosa, humedad y cenizas.

El *Aspergillus* fué cultivado en medios de composición química diferente, comprobando las variaciones metabólicas de lípidos, prótidos y glúcidos.

Descripción del Aspergillus y modo de cultivarlo

I. A) En el estudio de los diferentes hongos, desde el punto de vista de sus propiedades químicobiológicas y las aplicaciones terapéuticas de ellos derivadas, es el *Aspergillus niger* un pequeño eslabón en esta cadena de la moderna investigación farmacológica.

El *Aspergillus niger* (del latín *aspergillus* = hisopo), por su forma peculiar de presentarse forma capas de color chocolate, portador de conidios de 8 μ de longitud, con una gruesa pared; la cabezuela es redondeada, de un diámetro de unas 75 μ , con esterigmatos ramificados de 20 a 100 μ de largo, de color pardo. Los conidios son redondeados y su color va del pardo al negro; de superficie plana o rugosa, de 3 a 5 μ de diámetro. Los conidios germinan *in situ* y crecen hasta la temperatura de 40°.

No solamente hacemos la descripción específica del *Aspergillus niger*, sino que creemos oportuno reseñar otras variedades de la misma especie. Así, tenemos el *Aspergillus grotioli*, encontrado en una oncomicosis, formando cultivos negros.

El *Aspergillus J. Causellini*, igualmente hallado en una enfermedad de las viñas, está en una posición intermedia entre el género *Aspergillus* y el *Sterigmatocistis*; se le encuentra frecuentemente en los animales. Y, por último, el *Aspergillus Fontoynti*, hallado en una micosis gomosa (2).

Nuestra investigación está encaminada al *Aspergillus niger*, y para su cultivo hemos seguido la técnica que describe P. Schützenberger (3), basada en las experiencias de M. Raulin (1). Se

empieza por preparar un medio de cultivo artificial, de composición mineral determinada, que influye de tal manera en el desarrollo, que se obtiene un rendimiento mayor, en comparación con los obtenidos en medios naturales.

Este medio está formado por elementos químicos definidos, propios para su desarrollo, que constituye el clásico medio Raulin.

El concurso simultáneo de todos los elementos que integran estos medios de cultivo es necesario, ya que la falta de uno de ellos hace que el peso del cultivo sea mucho menor, y, por tanto, altera la posibilidad de controlar datos.

Cada uno de estos cuerpos ejerce una influencia propia sobre el crecimiento del hongo. Así, el nitrógeno es asimilado bajo la forma de nitrato amónico, sódico o potásico, mientras que al estado de nitrito hemos observado que no solamente no lo asimila, sino que ejerce una acción inhibitoria.

Berthélot (4) demostró, con resultados positivos, que la fijación del nitrógeno atmosférico por el *Aspergillus niger* lo realiza por sí solo, a diferencia de otros hongos, como los del género *Phoma*, que lo fijan por simbiosis.

Raulin (5) observa que por la presencia de ciertos iones, como el cinc y el manganeso, se estimula la actividad del hongo, hecho confirmado por Bertrand (6).

En cambio, la presencia de metales pesados modifica profundamente el desarrollo de los conidios del *Aspergillus niger*. Según Burowsky (7), el sodio no puede reemplazar totalmente al potasio en el desarrollo completo del *Aspergillus*. Gustarfson (8) ha demostrado que la respiración del *Aspergillus niger* va en aumento en una solución de cloruro cálcico; pero cuando la concentración es superior al 25 por 100, decrece notablemente.

Raulin (5) descubre que una parte de nitrato de plata en 1.600.000 partes de agua, impide la germinación de esporas del *Aspergillus niger*. Más modernamente se han realizado numerosas experiencias, con muy diversos elementos, comprobando la necesidad de muchos de ellos, y cuya descripción omitimos por no hacer excesivamente extensa esta parte de nuestra modesta aportación.

B) Los medios de cultivo empleados por nosotros fueron estos tres siguientes: el de Raulin (5), el de Starck (9) y el de Czapeck Dox, modificado por G. Turley (10), cuya composición química exponemos a continuación.

Medio Raulin.—Agua, 1.500 gramos; azúcar cande, 70 gramos; ácido tártrico, 4 gramos; nitrato amónico, 4 gramos; fosfato amónico, 0,60 gramos; carbonato de potasa, 0,60 gramos; carbonato de magnesio, 0,40 gramos; sulfato amónico, 0,25 gramos; sulfato de cinc, 0,07 gramos; sulfato de hierro, 0,07 gramos, y silicato potásico, 0,07 gramos.

Medio Starck.—Sacarosa, 15 gramos; nitrato amónico, 0,2 gramos; fosfato ácido de potasio, 0,1 gramo; agua destilada, hasta 100 c. c., acidificado con ácido clorhídrico hasta un pH 1,8 y temperatura de 33°.

Medio Czapeck-Dox (modificado por G. Turley).—Nitrato sódico, 3 gramos; fosfato ácido de potasio, 1 gramo; cloruro potásico, 0,5 gramos; sulfato magnésico, 0,5 gramos; sulfato férrico, 0,01 gramo; glucosa, 40 gramos, y agua, hasta 1 litro. Finalmente, se adiciona una pequeña cantidad de extracto de levadura de cerveza.

Para sembrar en cualquiera de estos medios, seguimos la técnica recomendada por Raulin (5), que consiste en extender sobre la superficie del líquido un pincel impregnado de esporos de *Aspergillus*, los cuales conseguimos dejando al aire libre un trozo de limón, y al cabo de unos ocho días se cubrió completamente de esporos, fácilmente reconocibles por la capa gris que recubre el limón; a los tres días de la siembra se forma en la superficie del líquido una membrana de color blanco, que al cuarto toma un color azulado; y finalmente, hacia el séptimo, se va oscureciendo hasta quedarse convertida en una membrana consistente, de superficie uniformemente oscura.

Tomada una muestra, y examinada al microscopio, pudimos comprobar que la siembra hecha de este modo no daba un cultivo puro, pues estaba mezclado con hongos pertenecientes a otros géneros.

La técnica de Raulin resulta defectuosa, y, por tanto, nos dirigimos a la Sección de Fermentaciones del Instituto Cajal, cuyo jefe, el profesor D. J. Marcilla, nos concedió amablemente cultivos puros de *Aspergillus niger*, raza núm. 3, con los que hicimos nuevas siembras, y de esta manera pudimos conseguir cultivos puros para nuestro trabajo.

Los cultivos que he reseñado, con raza número 3, son los obtenidos en la mencionada Sección del Instituto Cajal, después de una selección, siguiendo una técnica análoga a la de Bernhauer, que selecciona hongos, que crecen sobre rodajas de limón estéril, en agua, cuyo pH se lleva a 1,6-1,8 mediante adición de ácido sulfúrico, medio normal, y sembrando en medio Starck, de análogo pH (9).

C) *Métodos analíticos.*—Los métodos analíticos empleados por nosotros para la experimentación de nuestro trabajo, los describimos a continuación.

Balance nitrogenado.—Adoptamos el método propuesto por los profesores M. Comenge y A. Santos Ruiz, y que es el que se sigue en el Instituto Cajal, cuyo fundamento se basa en la distinta solubilidad de las fracciones protídicas en diferentes disolventes. El cultivo lo trituramos con arena de mar, lavada y desecada, con el fin de dislacerarlo bien; se trata con agua, se centrifuga, y el líquido se va reuniendo en un matraz de 100 c. c. hasta completarlo; en

este líquido se determina el nitrógeno por el método de Kjeldahl, cuya técnica la describiremos en el apartado "Nitrógeno total"; en esta primera fracción se encuentran las *albúminas* y *nucleínas*.

La parte insoluble en agua se trata por solución de cloruro sódico al 20 por 100, se centrifuga y se lava tres veces con unos 100 c. c., a los cuales se les practica el Kjeldahl; en esta segunda fracción se hallan las *globulinas*.

El residuo se trata por alcohol de 70°, hasta agotamiento por centrifugación, y se hace también el Kjeldahl; pero en esta fracción, para evitar inflamaciones del alcohol, es conveniente, antes de practicar el Kjeldahl, destilar previamente para reducir el volumen, y luego se continúa el ataque con el ácido sulfúrico. En esta tercera fracción se encuentran las *prolaminas*.

Y, por último, con el residuo insoluble en los tres disolventes anteriores, se practica el Kjeldahl y nos dará el nitrógeno correspondiente a las *glutelinas*.

II. *Determinación del nitrógeno total.*—Se sigue el método de Kjeldahl, cuya marcha es la siguiente: Una determinada cantidad de cultivo se trata con ácido sulfúrico concentrado, por medio del cual las sustancias orgánicas se oxidan, transformando el nitrógeno existente en amoníaco, que, combinándose con el sulfúrico, forma el sulfato amónico; es necesario operar con matraces Kjeldahl, porque son resistentes, y colocar en la boca del matraz un embudito para evitar proyecciones. En nuestro problema pusimos una cantidad exacta del cultivo y agregamos 25 c. c. de ácido sulfúrico concentrado, y como catalizador, una pequeña cantidad de ácido selenioso en polvo; se calienta suavemente primero, y luego, a los quince minutos aproximadamente, se eleva la temperatura para que el ataque sea completo; se conoce este final, porque primeramente se forma una masa carbonosa y luego se va aclarando hasta que por último queda un líquido completamente claro; entonces se deja enfriar y con precaución se diluye en unos 300 c. c. de agua y se pasa a un matraz junto con las aguas de lavado; este matraz se aclara con un refrigerante. En el matraz, que contiene el líquido atacado, se agrega sosa al 30 por 100 hasta neutralización completa, poniendo de indicador la fenoltaleína, y para regular la ebullición se pone un poco de polvo de cinc. Por la acción del hidróxido sódico el amoníaco del sulfato amónico formado queda en libertad, el cual se destila y es recogido en un matraz que tiene exactamente 20 c. c. de ácido sulfúrico N/14, con indicador metilnaranja; en el momento en que acercando un papel tornasol al extremo libre del refrigerante nos indique reacción neutra, es señal de que ha pasado todo el amoníaco existente, y entonces se valora el exceso de ácido sulfúrico N/14 con sosa también N/14 y la diferencia nos da en miligramos el nitrógeno que tenía la cantidad de cultivo que pusimos; sólo resta hallar el tanto por ciento.

III. *Determinación de los hidratos de carbono.*—Se sigue la técnica de Liebermann y Lintner, que es como sigue: 3 grs. de sustancia seca se colocan en un matraz de 500 c. c. provisto de refrigerante de reflejo con 200 c. c. de agua y 16 c. c. de ácido clorhídrico de densidad 1,12 s e mantiene en ebullición al baño maría durante tres horas; al cabo de este tiempo se deja enfriar, se neutraliza con sosa, se defeca con subacetato de plomo eliminando el exceso de plomo con solución saturada de sulfato sódico; se filtra completando el volumen a 250 c. c.; de éstos se toman 25 c. c., que sirven para dosificar el azúcar por reducción. Nosotros seguimos la técnica de M. Bertrand, para la que estos 25 c. c. se mezclan con iguales cantidades de líquido Fehling A y B, se calienta durante diez minutos y se deposita un precipitado de oxidulo de cobre, el cual se recoge en un crisolito de Gooch; después de lavado con agua caliente se le trata por el líquido Bertrand, que contiene sulfato férrico que pasa a ferroso, y éste se valora con permanganato potásico, valorado de manera que 1 c. c. de éste equivale a 6,36 miligramos de cobre; los resultados están expresados en glucosa.

IV. *Determinación de la celulosa.*—Hemos seguido la técnica de Radu Vladescu (11) de la siguiente manera: 1 gr. de materia seca se coloca en un matraz de unos 100 c. c. con 20 c. c. de ácido nítrico de densidad 1,130 y se hace pasar una corriente de vapor durante cinco minutos, al cabo de los cuales se deja enfriar, se filtra, recogiendo la celulosa sobre un filtro tarado se lava con unos 150 c. c. de agua destilada, después con una mezcla de alcohol y éter a partes iguales, para desengrasar, se deseca en la estufa y se pesa. Celulosa y filtro se incineran y descontando el peso de las cenizas obtenidas del peso anterior, tendremos la celulosa correspondiente al gramo que pusimos.

V. Para la *determinación de la humedad y cenizas* hemos seguido el método clásico por desecación e incineración, respectivamente, hasta peso constante.

C) RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN EL MEDIO DE CULTIVO EMPLEADO
BALANCE NITROGENADO

	Raulin	Starck	Czapeck-Dox	
Fracción I	0,054 %	0,065 %	0,037 %	Fracción soluble en agua. (¿Albúminas y nucleínas?)
Fracción II	0,040 %	0,050 %	0,069 %	Fracción soluble en NaCl. (¿Globulinas?)
Fracción III	0,046 %	0,065 %	0,043 %	Fracción en alcohol, 70%. (¿Prolaminas?)
Fracción IV	0,163 %	0,176 %	0,231 %	Fracción residual. (¿Glutelinas?)

NITROGENO TOTAL DEL "ASPERGILLUS NIGER", SEGUN LOS MEDIOS

Medio Raulin	Medio Starck	Medio Czapeck-Dox
0,313 %	0,372 %	0,368 %

HIDRATOS DE CARBONO DEL "ASPERGILLUS NIGER", SEGUN LOS MEDIOS

Medio Raulin	Medio Starck	Medio Czapeck-Dox
2,09 %	2,40 %	3,1 %

CELULOSA DEL CULTIVO "ASPERGILLUS NIGER", SEGUN LOS MEDIOS

Medio Raulin	Medio Starck	Medio Czapeck-Dox
5,3 %	8,7 %	6,8 %

GRASA DEL "ASPERGILLUS NIGER", SEGUN LOS MEDIOS CULTIVADOS

Medio Raulin	Medio Starck	Medio Czapeck-Dox
0,766 %	0,845 %	0,677 %

HUMEDAD DEL CULTIVO "ASPERGILLUS NIGER", SEGUN LOS MEDIOS

Medio Raulin	Medio Starck	Medio Czapeck-Dox
84 %	80,3 %	82,3 %

CENIZAS DEL CULTIVO "ASPERGILLUS NIGER", SEGUN LOS MEDIOS

Medio Raulin	Medio Starck	Medio Czapeck-Dox
8,40 %	9,04 %	10,4 %

D) *Comentario-resumen.*—La fracción albúminas y nucleínas en el medio Czapeck-Dox da un valor mínimo de 0,037 por 100; el valor máximo lo obtenemos en el medio Starck 0,065, y el valor medio lo da el Raulin. La fracción globulinas nos da una progresión ascendente desde 0,040 en Raulin, 0,050 en Stark y el máximo de 0,069 en Czapeck-Dox. La fracción prolaminas da un mínimo de 0,043 en el Czapeck-Dox, un máximo en Starck de 0,065 y una media el de Raulin 0,046 por 100. Las glutelinas, de manera análoga a las globulinas, nos dan una curva ascendente; es decir, siguen una progresión paralela en los medios Raulin y Czapeck-Dox, con valores crecientes del primero al último de estos medios de cultivo.

En los datos del nitrógeno total coinciden con que el de Starck alcanza el máximo de 0,372 por 100, un valor medio en el Czapeck-Dox y un mínimo el de Raulin de 0,313 por 100.

En los hidratos de carbono expresados en glucosa el medio Czapeck-Dox dió el valor más alto, 3,1 por 100; el de Raulin, 2,09, y el más bajo, 2,40, en medio Stark.

El valor más alto en grasa lo dió el medio Starck, 0,845 por 100; Raulin, un término medio, y el más bajo, 0,677, el Czapeck-Dox. En humedad alcanza el máximo Raulin, el medio Czapeck-Dox y el más bajo, 80 por 100, Starck.

Y, por último, en celulosa, los datos suministran el valor más alto para el medio Starck, y el más bajo para el de Raulin.

Aunque los medios elegidos por nosotros tienen su composición un tanto distinta, comprobemos por los resultados que la formación de los elementos estudiados guardan una relación semejante. Únicamente en el medio Czapeck-Dox vemos que tanto en lo que se refiere a los productos proteídicos solubles en el alcohol, que forman la IV fracción del balance nitrogenado, y la cantidad de hidratos de carbono, no guardan dicha relación y son bastante o más ricos en éstos; lo que nos lleva a pensar que el extracto de levadura de cerveza (aunque está en pequeña cantidad) interfiere en la composición y conduce a la variación observada.

CONCLUSIONES

Después de las experiencias practicadas puede afirmarse que:

- 1.ª La individualidad del *Aspergillus niger* se conserva intacta.
- 2.ª La composición del *Aspergillus* sufre ligeras variaciones para adaptarse al medio de cultivo.
- 3.ª Para la interpretación de las fluctuaciones deberá tenerse en cuenta la composición química del medio empleado.

4.ª Los valores de las diferentes sustancias no son correlativos en cuanto al medio de cultivo, sino que cada medio es apto para una determinada sustancia a investigar.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Raulin.—*Am. Acad. Sc. Nat.* (5). 2, 224, 1869.
- (2) Haudbuch der Patholog. Mikrorg. W. Kolle und Wasserman.
- (3) P. Schützenberger.—*Les fermentations.* 1879.
- (4) Raulin.—*Compt. Rendu Acad. Sc. Paris*, 56, 229, 1870.
- (5) Bertrand.—*Compt. Rendu Acad. Sc. Paris*, 154, 381. 2.ª, 1912.
- (6) Burowsky.—*Centralb. Bakt. Abteil.* 2, 36, 54, 66, 1915.
- (7) Gustafson.—*Journal Gener. Physiol.* 2, 17, 24, 1919.
- (8) Marcilla.—*Trabaj. Inst. Cajal Investig.* XXXII, 269, 1940.
- (9) *Revista Ibys.* 19. Diciembre 1943.
- (10) Bernhauser.—*Biochemie. Zeitschr.* 172, 1926.
- (11) Radu Vladescu.—*Extrait Ann. ferment.* V. 546, 549, 1940.