

Estudios sobre la penicilina

VI. Obtención de una buena película del *Penicillium notatum* en los medios líquidos.

por Pablo Negróni

A fines del año 1943 hicimos en este Instituto nuestra primera comunicación sobre la obtención de la penicilina cruda en la cual analizamos algunos de los factores físicos y químicos que influyen en su producción (1). En esas primeras experiencias comprobamos que la adición de papel de filtro al caldo tenía una influencia favorable sobre el desarrollo, la esporulación y producción de penicilina por el *P. notatum*. En trabajos posteriores (2 a 5) estudiamos la influencia de las fuentes carbonadas y nitrogenadas de nutrición, así como la selección de cepas genéticamente bien dotadas para la actividad penicilinógena.

Posteriormente, empleando el medio líquido a base de "cornsteep" propuesto por el Dr. Modern y sus colaboradores (6), hemos tenido dificultad en obtener una capa miceliana bien desarrollada, que al cabo de una semana cubriera toda la superficie libre del medio (método en superficie). En este trabajo exponemos el resultado de nuestras experiencias conducentes a mejorar el desarrollo y la producción de penicilina.

Observaciones

El medio básico utilizado fué el siguiente: "cornsteep" siruposo 60 ml., caseína hidrolizada 10 ml., lactosa 20 grs., agua corriente c.s.p. 1.000 ml., pH 5. Disolver la lactosa en unos 200 ml. de agua, por calentamiento y hacer hervir unos minutos el hidrolizado de caseína, antes de utilizarlo, para disolver completamente el precipitado que presenta. Repartir y esterilizar a 115° durante 15 minutos.

Los frascos sembrados con una suspensión de esporos presentan ya a las 24 hs. de incubación a 24° C. una serie de puntitos o manchitas blancas que, forman un anillo en todo el contorno de la superficie libre del medio líquido de cultivo, allí donde éste forma un ángulo diedro con las paredes del recipiente. Con frecuencia aparecen, más tarde, series de islotes en la superficie del medio, primero blanquecinos y luego amarillentos y verdosos, salientes, como achicharrados. En este estado permanece el desarrollo hasta la recolección de la penicilina cruda.

Coincidiendo con este desarrollo, relativamente pobre, notamos un descenso del título de la penicilina cruda, título que, sobrepasaba, raramente, 30 unidades Oxford por ml. (hecho también observado por el Dr. F. Modern).

La evolución de los cultivos del *Penicillium notatum* parecía indicarnos que este hongo necesitaba un soporte para formar la película. Esta sospecha estaba abonada por los siguientes hechos de observación: 1) Germinación precoz de los esporos y aparición del desarrollo en el ángulo diedro formado por la superficie del medio de cultivo y la pared del recipiente; 2) formación de una bandeleta continua, como de dos centímetros o más de diámetro en esa zona y aparición tardía de islotes, sin formar película, en la superficie libre del líquido.

Nuestra idea fué, pues, ofrecerle un soporte artificial para la germinación de los esporos y la formación de una película en toda la extensión de la superficie del medio líquido de cultivo con la esperanza de obtener, así, un mayor rendimiento de penicilina cruda.

1a. *Serie de experiencias*: Vertimos en frascos de Povinsky con 500 ml. de medio un par de ml. de *parafina fusible* a 55° C antes de esterilizarlo y, apenas retirado del autoclave, colocamos los frascos horizontalmente para que la parafina formara en la superficie una fina película que sirviera de soporte para la germinación de los esporos del *P. notatum*.

Resultados: No obtuvimos los resultados buscados, puesto que el desarrollo presentó, aproximadamente, los mismos caracteres que en los frascos testigos sin la adición de parafina y el título de la penicilina formada fué, también, equivalente.

2a. *Serie de experiencias*: Utilizamos *viruta fina de madera* de pino blanco, previamente lavada y hervida en agua corriente, cortada en fragmentos de 3 × 2 cms., agregada a los frascos en cantidad suficiente para cubrir casi todo el fondo de los mismos.

La utilización de la viruta de madera tiene una antecedente en la bibliografía sobre este tema en el trabajo de C. E. Clifton (7), pero este autor la utilizó con un dispositivo semejante al empleado en la fabricación del vinagre por el procedimiento rápido, que nosotros también propusimos antes de que llegara a nuestras manos el mencionado trabajo.

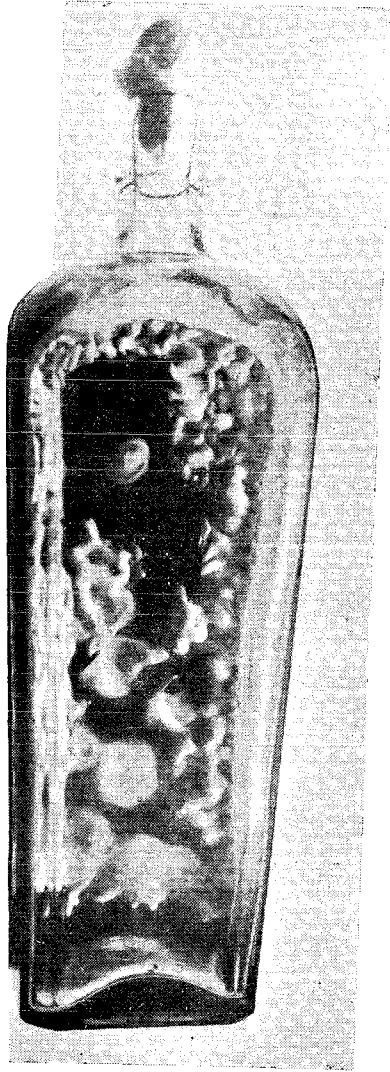


Fig. 1. — Desarrollo del *Penicillium notatum* en las condiciones habituales.



Fig. 2. — Formación de una película continua mediante la adición de algodón.

Resultados: El desarrollo del hongo es más rápido y exuberante en los frascos conteniendo el medio básico adoptado con viruta que en los frascos testigos sin este último elemento, obteniéndose ya a los 5 días de incubación a 24° la formación de una buena película esporulada. El título de la penicilina cruda mejoró también manifiestamente, obteniéndose 35 unidades Oxford (valor aproximado por carecer de penicilina patrón) en contraposición al título de 20 unidades de los frascos testigos.

Estas experiencias fueron repetidas varias veces para cerciorarnos de la constancia de sus resultados.

Cuando estábamos en estos estudios tuvimos oportunidad de leer una serie de trabajos sobre la obtención de *estreptotricina* y *actinomicina* productos antibióticos formados por ciertas especies de *Actinomyces*. Estas sustancias se originan, igualmente, en los cultivos de gran superficie en forma semejante a los del *P. notatum* para la producción de penicilina, y para ello es de importancia la obtención de una buena película. Este problema fué solucionado por los autores que mencionamos a continuación, agregando al medio líquido de cultivo, algodón, agar o talco.

E. J. Bottger y H. J. Conn (8) obtuvieron el desarrollo rápido de los *Actinomyces* del suelo en los medios líquidos de cultivo adicionados de una cantidad tal de algodón que se impregnara de todo el medio utilizado. Estos investigadores ensayaron además, pero sin resultados, el bloque de yeso, las perlas de vidrio y la arena, impregnados también del medio de cultivo.

S. A. Waksman (9) obtuvo la formación de una excelente película de *Act. lavendulae* mediante la adición de 0,25 % de agar a los medios líquidos, habiendo obtenido igualmente buenos resultados con el algodón y mediocres con el agregado de papel "peat" y de paja.

H. B. Woodruff y Foster (10) emplearon, también, el agar en la proporción ya mencionada y el algodón; obteniendo, además, la formación de una buena película mediante un nuevo dispositivo: vertiendo en la superficie de frascos de Erlenmeyer con 250 ml. de medio líquido de cultivo, 10 mg. de talco estéril.

Inspirados en estos trabajos efectuamos la tercera y cuarta serie de nuestras experiencias utilizando el talco y el agar con los resultados que más adelante consignamos.

3a. *Serie de experiencias:* 500 ml. del medio básico de cultivo espolvoreado con 20 mg. de talco estéril. No ha mejorado los resultados del desarrollo ni de la producción de penicilina comparándolos con los obtenidos en los frascos testigos, sin talco.

4a. *Serie de experiencias:* Medio básico agregado de 0,25 %, 0,10 % y 0,05 % de agar, disponiendo, siempre, dos frascos testigos sin agar.

Resultados: Ya al cabo de 48 hs. en los frascos conteniendo 0,25 % de agar se obtiene la formación de una buena película que comienza a esporular. En los frascos conteniendo menor proporción

de agar la formación de la película es algo más tardía, pero igualmente buena y continua; sin embargo no mejora el rendimiento en penicilina.

5a. *Serie de experiencias*: Medio básico adicionado de algodón hidrófilo en cantidad suficiente para absorber gran parte del medio líquido.

Resultados: Se obtiene la formación de una buena película esporulada al cabo de 5 días de incubación a 24°C. y el título alcanza a 35 unidades Oxford al cabo de 8 días, en contraposición a 20 unidades en los frascos testigos.

DISCUSIÓN

La obtención de una capa miceliana continua mediante la adición de viruta de madera o de algodón, puede deberse a una acción mecánica, de soporte, para la germinación de los esporos del *P. notatum*. Sin embargo su acción podría ser más compleja dado que Schopfer y Rytz (11) sostuvieron que, por lo menos el algodón, debe contener sustancias que mejoran el crecimiento de los microorganismos.

Igualmente compleja sería la acción del agar: como soporte para la germinación de los esporos, modificando la viscosidad y tensión superficial del medio líquido de cultivo y aumentando los fenómenos de oxidación. Schopfer también obtuvo la formación de una buena película de *Aspergillus niger* agregando una débil proporción de agar al medio líquido de cultivo. Recientemente Holtman (12) agregando al medio líquido de Czapek-Dox modificado 2 % de aceite de maíz obtuvo también una buena formación de película de *P. notatum* y un mayor rendimiento en penicilina.

Resumen: Empleando un medio líquido a base de "cornsteep" y de caseína hidrolizada, la cepa *P. notatum* que utilizamos para la obtención de penicilina cruda, no forma una película continua sino islotes en la superficie libre del mismo y el título de penicilina es relativamente bajo, unas 20 unidades Oxford por ml.

La adición de viruta de madera o de algodón hidrófilo, permiten obtener la formación de una película continua y un título mayor de penicilina.

La adición de 0,10 gr. % de agar favorece más aun la formación de la película, pero no mejora el título de penicilina. Finalmente, ensayamos sin resultados la adición de parafina y de talco al medio básico de cultivo.

SUMMARY

We have employed a liquid medium with cornsteep water and hydrolysed caseine for penicillin production and we have observed that on this medium *P. notatum* forms a discontinuous pellicle and a low titer of penicillin (20 O. u. per ml.).

Adding wood shavings or cotton we have obtained good pellicles and higher titers of penicillin.

The addition of 0,10 % of agar favors still more the formation of the pellicle, but remains without influence on the production of penicillin.

Finally we have tested, without results, the addition of paraffine and of talc.

IV. RESUMEN

En employant un milieu liquide à base d'eau de macération de maïs (conrsteep water) et de caseine hydrolysée nous avons remarqué que le *P. notatum* ne forme pas une pellicule continue mais d'îlots à la surface du milieu et le titre de pénicilline obtenu est assez faible (20 unités Oxford par ml.).

L'addition de copeau de bois ou de coton permettent la formation d'une pellicule continue et un titre plus élevé de pénicilline.

L'addition de 0,10 % d'agar favorise encore plus la formation de la couche mycélienne, mais il n'a aucune influence sur la production de pénicilline.

Finalement nous avons essayé sans resultats l'addition de paraffine et de talc.

BIBLIOGRAFÍA

1. NEGRONI, P. — Estudios sobre la penicilina. I) Influencia de ciertos factores físicos y químicos sobre su producción. La Prensa Méd. Arg., **31**, 1944, 2 de febrero.
2. NEGRONI, P. y FISCHER. — I) Estudios sobre la penicilina. II) Influencia de la fuente carbonada de nutrición, **31**, 1944, 21 de junio.
3. NEGRONI, P. y FISCHER. — I) Estudios sobre la penicilina. III) Influencia de la fuente de nutrición nitrogenada. La Prensa Méd. Arg., **31**, 1944, 21 de junio.
4. NEGRONI, P. y FISCHER. — I) Estudios sobre la penicilina IV) Sobre la obtención de cepas de *P. notatum* con buena actividad penicilínogena y su relación con la constitución genérica. La Prensa Méd. Arg., **31**, 1944, p. 1938.
5. NEGRONI, P. y FISCHER. — I) Estudios sobre la penicilina. V) Influencia de la acción enzimática sobre la producción de penicilina. La Prensa Méd. Arg., **31**, 1944, p. 1944.
6. MODERN, F. ILLA, R. y ARZENO, M. — Algunos medios de cultivo para la preparación de penicilina. Rev. Soc. Arg. Biol., **20**, 1944, 100.
7. CLIFFON, C. E. — Penicillin production on large scale. Science, **98**, 1943, 69. Ref.: Abstracts on penicillin etc. Nat. Res. Council of Canada. 1945, p. 30 n: 72.
8. BOTTGER, E. J. and CONN, H. J. — A medium for the rapid cultivation of soil Actinomycetes. J. Bact., **44**, 1942, 137.
9. WAKSMAN, S. A. — Production and activity of Streptothricin. J. Bact. **46**, 1943, 299.
10. WOODRUFF, H. B. and FOSTER, J. W. — Microbiological aspects of Streptothricin. Arch. of Bioch., **2**, 1943, 301.
11. SCHEFFER, W. H. — Plants and vitamins. Walt ham Mass., U. S. A., 1943, pp. 21, 26 y 235.
12. HOLTMAN, D. F. — Increasing penicillin yields with corn oil. J. Bact., **49**, 1945, 313.