

Acción inhibidora "in vitro" de un *Penicillium Chrysogenum* sobre diversos *Mycobacterium*

por Hugo Bonfiglioli y Carlos Acuña

En un frasco que contenía caldo glicerinado al 5 %, sembrado con *Mycobacterium tuberculosis*, para la preparación de tuberculina, observamos el desarrollo, en la superficie, de un hongo filamentoso. Nos llamó la atención que el velo del *Mycobacterium*, que había empezado a desarrollar normalmente, detenía su crecimiento a un par de centímetros del hongo y después de pocos días caía al fondo sin haber alcanzado su completo desarrollo.

Sospechando que el hongo tuviera alguna acción sobre el *Mycobacterium*, decidimos aislarlo para estudiar sus propiedades.

Lo cultivamos en medio de Czapek, demostrando tratarse de un *Penicillium chrysogenum*, especie muy vecina del *Penicillium notatum*, diagnóstico confirmado por el Dr. Negroni.

Con una suspensión del hongo obtenida de un tubo con medio de Czapek sembrado una semana antes, sembramos 10 frascos que contenían 300 ml. de caldo glicerinado al 5 %, con una profundidad de 1,5 a 2 cm.

Cinco de los frascos fueron incubados a 37°C. y los otros cinco a 22-24°C. A los 8 días en todos los frascos la superficie del medio se presentaba cubierta por un velo de color verde, con algunas zonas blancas.

A los 16 días de incubación, filtramos el contenido de los frascos por papilla de papel de filtro y luego por bujía Berkefeld, manteniendo separados los cultivados a 37°C. y los desarrollados a 24°C.

Efectuamos controles de esterilidad y los filtrados se conservaron en heladera a 5°C. Denominamos a los dos productos: "*Filtrado estufa*" y "*Filtrado ambiente*", respectivamente. Ambos filtrados tenían un pH de 6,8 a 7,0. Con ellos efectuamos las experiencias que pasamos a describir.

ACCIÓN INHIBIDORA "IN VITRO" SOBRE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Experiencia N° 1. — Acción inhibidora sobre *Mycobacterium tuberculosis* humano, virulento, cepa D.T.

En frascos de Erlenmeyer de 300 ml. de capacidad, colocamos 100 ml. de medio de cultivo líquido estéril y agregamos cantidades variables del filtrado, cuyas propiedades deseábamos estudiar, en concentraciones de 0,5 a 7 %. Todas las experiencias fueron efectuadas por duplicado, con controles sin filtrado para cada serie.

Cada balón fué sembrado con un trozo de velo de *Mycobacterium tuberculosis* humano virulento, cepa D.T., partiendo de un cultivo de 14 días en agua de papas glicerizada, colocando en cada frasco la misma cantidad de material.

Se incubaron todos los frascos a 37°C. durante 6 semanas, efectuándose una lectura semanal. Todos los controles desarrollaron exuberantemente en 15 días.

Resultado de la acción sobre *Mycobacterium tuberculosis*, cepa D.T.:

Medio de cultivo: caldo glicerizado al 5 %.

Inhibición total con filtrado ambiente al 2 %.

Inhibición parcial con filtrado estufa al 6 %.

Medio de cultivo: Dorset:

Inhibición total con filtrado ambiente al 2 %.

Inhibición total con filtrado estufa al 5 %.

Medio de cultivo: Sauton:

Inhibición total con filtrado ambiente al 3 %.

Inhibición muy discreta con filtrado estufa al 7 %.

Medio de cultivo: agua de papas glicerizada al 5 %.

Inhibición total con filtrado ambiente al 2 %.

Inhibición total con filtrado estufa al 5 %.

De acuerdo a esta experiencia consideramos que el filtrado obtenido cultivando el *Penicillium chrysogenum* en caldo glicerizado al 5 %, durante 16 días, e incubado a 24°C. y a 37°C., tiene una evidente acción inhibidora sobre el desarrollo del *Mycobacterium tuberculosis* humano virulento, cepa D.T.

Teniendo en cuenta que el filtrado obtenido a 24°C. revela una acción muy superior al obtenido a 37°C., en las siguientes experiencias sólo empleamos el primero de ellos.

Experiencia N° 2. — Acción inhibidora "in vitro", sobre bacilo B.C.G.

Esta experiencia fué efectuada usando "filtrado ambiente", conservado durante 3 meses en heladera. La técnica seguida fué idéntica a la de la experiencia anterior, empleando solamente 3 medios de cultivo y concentraciones de filtrado desde el 1 %, hasta el 5 %.

Usamos una cepa de bacilo B.C.G., facilitada por el Sr. Oyarzábal.

Los resultados conseguidos son los siguientes:

Medio de cultivo: caldo glicerinado al 5 %.

Inhibición total con filtrado ambiente al 4 %.

Medio de cultivo: Dorset:

Inhibición total con filtrado ambiente al 2 %.

Medio de cultivo: Agua de papas glicerinada al 5 %:

Inhibición total con filtrado ambiente al 3 %

Experiencia N^o 3. — Acción inhibidora "in vitro", sobre *Mycobacterium tuberculosis* humano, virulento, cepa P.N.

Esta experiencia fué efectuada con filtrado ambiente, mantenido durante 3 meses en heladera. La técnica empleada fué la misma que en la experiencia anterior.

Resultados obtenidos:

Medio de cultivo: caldo glicerinado al 5 %:

Inhibición total con filtrado ambiente al 4 %.

Medio de cultivo: Dorset:

Inhibición total con filtrado ambiente al 2 %.

Medio de cultivo: Agua de papas glicerinada al 5 %.

Inhibición total con filtrado ambiente al 4 %.

Experiencia N^o 4. — Acción inhibidora "in vitro" sobre *Mycobacterium tuberculosis*, humano, virulento, aislado en la Sección, (cepa 1).

Empleamos filtrado ambiente mantenido durante 3 meses en la heladera.

Resultados obtenidos:

Medio de cultivo: caldo glicerinado al 5 %:

Inhibición parcial con filtrado ambiente al 5 %

Medio de cultivo: Dorset:

Inhibición total con filtrado ambiente al 2 %.

Medio de cultivo: agua de papas glicerinada al 5 %:

Inhibición total con filtrado ambiente al 4 %.

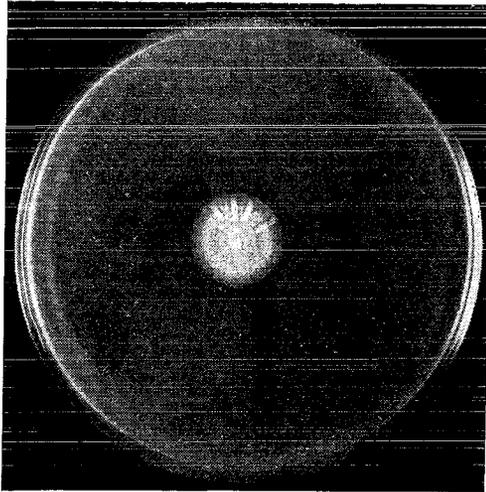
Experiencia N^o 5. — Acción inhibidora "in vitro", sobre *Mycobacterium avium*, cepa 1, de la colección de la Sección.

Empleamos filtrado conservado durante 3 meses en la heladera.

Resultados obtenidos:

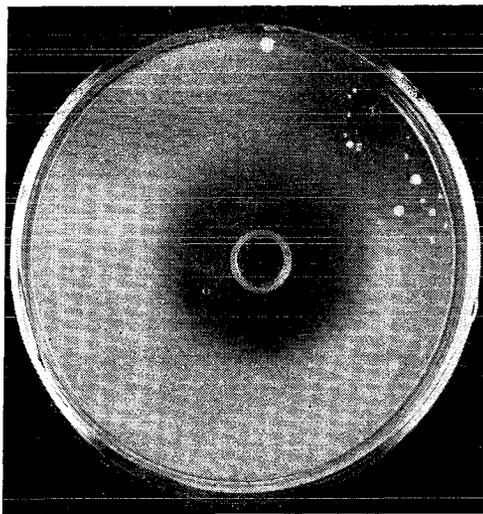
Medio de cultivo: caldo glicerinado al 5 %:

No hay inhibición con filtrado ambiente hasta el 5 %.



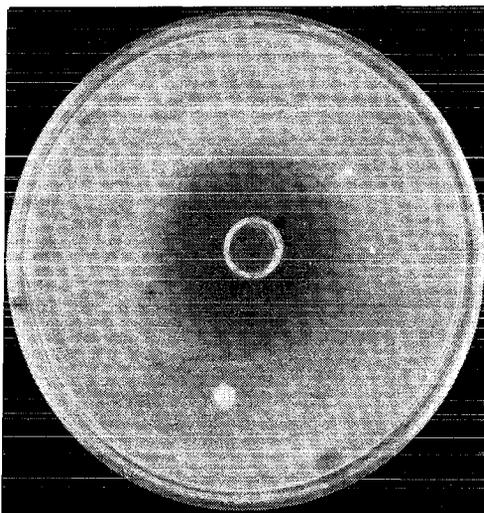
Fotografía N° 1
Suspensión de Myco. phlei y Hongo
(*Penicillium*)

Incubado a T. ambiente.



Fotografía N° 2
Suspensión de Myco. phlei + extracto obte-
nido a T. ambiente y no calentado. Zona de
inhibición de 3,5 cm de D.

Incubado a 37°C.



Fotografía N° 3
Suspensión de *Myco. phlei* + extracto obtenido a T. ambiente y calentado 30' a 50°-52°C.
Zona de inhibición de 3 cm. de D.

Incubado a 37°C.

Medio de cultivo: Dorset:

No hay inhibición con filtrado ambiente hasta el 5 %.

Medio de cultivo: agua de papas glicerinada al 5 %.

No hay inhibición con filtrado ambiente hasta el 5 %.

De acuerdo a estas 5 experiencias es evidente que el filtrado obtenido de un cultivo en caldo glicerinado al 5 %, mantenido durante 16 días a 24°C. de una cepa de *Penicillium chrysogenum* aislado por nosotros, tiene una acción inhibitoria a baja concentración sobre el desarrollo "in vitro", de las 3 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* humano, virulentos, ensayados, y sobre el B.C.G., careciendo de acción sobre una cepa de *Mycobacterium avium*, hasta una concentración del 5 %.

ACCIÓN INHIBIDORA "IN VITRO" SOBRE MYCOBACTERIUM SAPRÓFITOS

Debido a la facilidad y rapidez con que desarrollan la mayor parte de los *Mycobacterium* saprófitos, en agar glicerinado al 5 %, efectuamos diversas experiencias con el fin de investigar la acción del *Penicillium* o del filtrado ambiente, sobre diversas cepas de *Mycobacterium* saprófitos.

Preparamos suspensiones en agua destilada de *Mycobacterium* cultivados durante una semana a 37°C en papa glicerinada. Las suspensiones fueron agitadas en un frasco con perlas de acero para homogeneizarlas.

Preparamos una serie de cajas de Petri con agar glicerinado al 5 % en el cual habíamos mezclado previamente 0,5 ml. de la suspensión acuosa del *Mycobacterium* que deseábamos estudiar, manteniéndola a 45°C. De esta manera obtuvimos una suspensión lo más homogénea posible.

Experiencia N° 6. — Acción inhibitoria sobre *Mycobacterium phlei*.

a) Siembra en agar glicerinado al 5 %, de acuerdo a la técnica enunciada. Al mismo tiempo se sembró el *Penicillium* en la parte media del agar, como para la obtención de colonia gigante y se incubó a 24°C.

A los 6 días se observa abundante desarrollo del *Mycobacterium*, menos en una zona de 1 cm. alrededor del hongo, en que la inhibición es completa.

El *Penicillium* desarrolla bajo forma de cultivo blanco veloso, con escasa fructificación. (Fotografía N° 1).

b) Siembra en agar glicerinado al 5 % con la técnica anterior. El filtrado fué colocado, en cantidad de 2 ml. en un cilindro cer-

tral de vidrio, en la parte media del medio de cultivo. Incubación a 37°C.

A los 4 días se observa abundante desarrollo del *Mycobacterium*, menos en una zona de 3,5 cm. de diámetro, donde la inhibición es total. (Fotografía N° 2).

c) Siembra en agar glicerinado como las anteriores. En el cilindro central colocamos 2 ml. del filtrado, calentado previamente durante 30 minutos a 50-52°C., en ampolla de vidrio cerrada a la llama y a baño de maría.

Este ensayo fué efectuado al mismo tiempo que el anterior y a los 4 días se observa abundante desarrollo del *Mycobacterium* con una zona de inhibición de 3 cm. de diámetro. (Fotografía N° 3).

d) Efectuamos un ensayo comparando en la misma caja de Petri la acción del filtrado ambiente y de la penicilina bruta, preparada por el Instituto Bacteriológico "Malbrán", incubando a 37°C. El filtrado produce inhibición, mientras la penicilina no inhibe. (Fotografía N° 4).

Experiencia N° 7. — Acción inhibidora "in vitro" sobre *Mycobacterium* sp. 51.

Con la misma técnica anteriormente descrita ensayamos una cepa de *Mycobacterium* sp. N° 51, de la colección del Dr. Cetrán golo. Se incubó a 37°C.

A los 4 días se observa una zona de inhibición de 4 cm. de diámetro. (Fotografía N° 5).

En otro ensayo efectuado hemos comparado la acción de nuestro filtrado y de la penicilina bruta del Instituto Bacteriológico sobre la misma cepa. Se observa la acción inhibidora de nuestro filtrado y la acción nula de la penicilina. (Fotografía N° 6).

De acuerdo a estas experiencias es evidente que el filtrado obtenido cultivando el *Penicillium chrysogenum* en caldo glicerinado al 5 %, a 24°C. durante 16 días, revela una acción inhibidora "in vitro", sobre las dos cepas de *Mycobacterium* saprófitos ensayados.

Además se demuestra que la temperatura de 52-55°C., mantenida durante 30 minutos, mantiene inalterada esa propiedad.

Experiencia N° 8. — Acción "in vitro" sobre diversos gérmenes.

Efectuamos diversas experiencias con el fin de estudiar la acción del filtrado sobre diversos gérmenes: *Staphylococcus aureus* cepa 209, *Eberthella tiphy*, Bacilo coli fecal y *Shigella dysenteriae*.

Las siembras fueron efectuadas en cajas de Petri con agar caldo, colocando el filtrado en el cilindro central. Incubación a 37°C. durante 48 horas. Solamente se observa una zona de inhibición en los cultivos de *Staphylococcus aureus*.

Otro ensayo efectuado empleando el filtrado calentado 30 minutos a 52-55°C. revela una zona de inhibición evidente, aunque algo menor que con el filtrado no calentado.

De acuerdo a estas experiencias podemos afirmar que el filtrado obtenido cultivando el *Penicillium chrysogenum* en caldo glicerinado al 5 %, durante 16 días a 24°C. inhibe, hasta después de calentado durante 30 minutos a 52-55°C. el desarrollo de una cepa de *Staphylococcus aureus*, mientras no tiene acción sobre *Eberthella tiphy*, *Coli fecal* y *Shighella dysenteriae*.

Experiencia N° 9. — Acción bactericida sobre Mycobacterium.

Con el fin de investigar la acción bactericida del filtrado sobre diversos *Mycobacterium*, efectuamos la siguiente serie de experiencias.

En 10 ml. de filtrado se suspenden 0,05 gr. de un cultivo de 20 días en papa glicerinada al 5 %, de *Mycobacterium tuberculosis* humano virulento, cepa D.T. Se mantiene la suspensión en un tubo a temperatura del laboratorio, y cada 24 horas, durante 5 días consecutivos, se siembran cuatro tubos de medio de Lowenstein con 0,5 ml. cada uno de la suspensión, lavando previamente los bacilos dos veces con agua destilada estéril, para eliminar todo el antibiótico. Se efectúan al mismo tiempo controles reemplazando el filtrado por agua destilada.

Experiencias similares se efectuaron ensayando la acción del filtrado sobre el *Mycobacterium phlei* y el *Mycobacterium* sp. cepa 51.

En todos los ensayos efectuados con las tres cepas, los tubos sembrados mostraron abundante desarrollo de los *Mycobacterium*, hasta después de haber estado los bacilos en contacto con el filtrado durante 5 días, no observándose diferencia alguna con los tubos controles. La observación fué prolongada durante 1 mes, manteniéndose los tubos a 37°C.

Además los bacilos no mostraron ninguna alteración en sus caracteres morfológicos microscópicos ni en sus propiedades tintoriales.

La cepa virulenta D.T. conservó su acción patógena para el cobayo.

En consecuencia, de acuerdo a esta serie de experiencias, podemos afirmar que el filtrado obtenido cultivando el *Penicillium chrysogenum* en caldo glicerinado al 5 % durante 16 días a 24°C. carece de acción bactericida sobre los *Mycobacterium* ensayados.

CONCLUSIONES GENERALES

Hemos aislado una cepa de *Penicillium chrysogenum*, que, cultivado a 24°C. durante 16 días, en caldo glicerinado al 5 %, produce una substancia filtrable por bujía Berkefeld y que tiene acción inhibidora "in vitro", a baja concentración. Sobre 3 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* humanos virulentos, sobre el bacilo B.C.G. y sobre dos cepas de *Mycobacterium* saprófitos.

El producto carece de acción sobre una cepa de *Mycobacterium avium* ensayada, por lo menos hasta la concentración de 5 %.

Demostramos además que carece de acción bactericida sobre los mismos *Mycobacterium*.

El producto conserva gran parte de su actividad después de calentado durante 30 minutos a 52-55°C.

También manifiesta actividad inhibidora contra el *Staphylococcus aureus* cepa 209, hasta después de calentamiento previo, durante 30 minutos a 52-55°C.

El filtrado carece de acción inhibidora sobre las cepas de Bacilo Coli fecal, *Eberthella tiphy* y *Shighella disenteriae* ensayadas.