

Estudios sobre la Penicilina

I. Influencia de algunos factores físicos y químicos

Por PABLO NEGRONI

No voy a trazar la historia, ni relatar las propiedades de la penicilina, por considerar que éstas han sido ya suficientemente difundidas por las revistas científicas inglesas y norteamericanas y por la prensa.

Voy a exponer en este trabajo el resultado de mis experiencias sobre ciertos factores físicos y químicos que influyen en la producción de este metabolito, como lo llaman ciertos autores.

Es sabido que la penicilina inhibe el desarrollo de las bacterias gram positivas en particular y el *Staphylococcus aureus* es el germen «standard», digamos, para probar la actividad de este producto «in vitro».

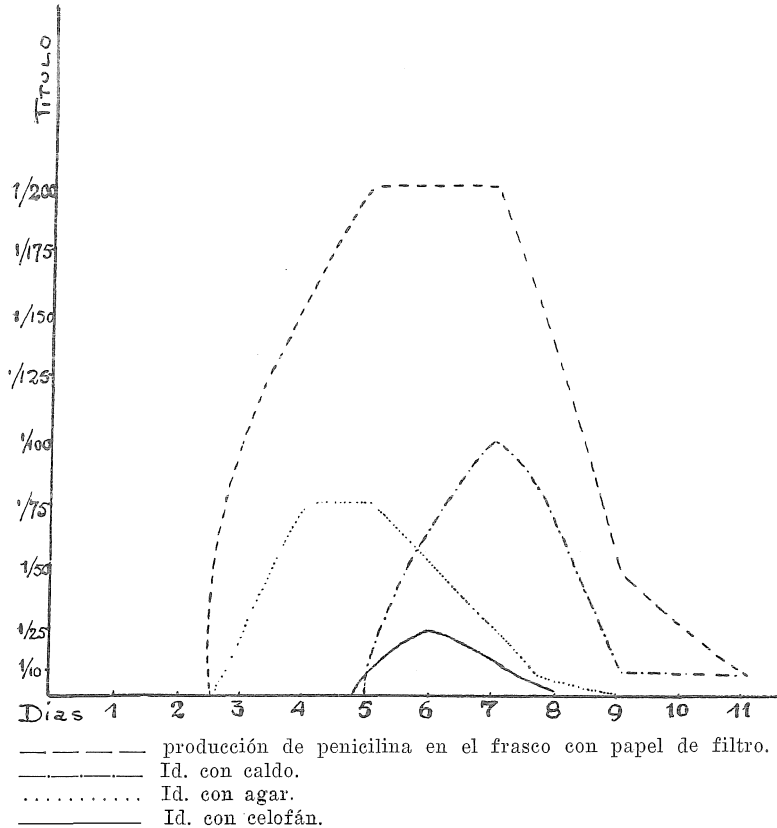
Fleming en 1929 ⁽¹⁾ obtuvo su formación en caldo simple, notando que, a la temperatura óptima de crecimiento del *Penicillium notatum*, la cantidad acumulada se elevaba bruscamente hacia el 3er. día y alcanzaba su máximo más lentamente hacia el 6º día. Este investigador observó también que la glucosa retardaba o inhibía la formación de penicilina.

Otra observación, efectuada por diferentes autores, es la siguiente: un fragmento de la capa miceliana del hongo bien desarrollado, en un medio sólido y depositado en la superficie de otro, previamente sembrado con una suspensión de una cepa de estafilococo sensible, inhibe su desarrollo en una zona de varios milímetros de diámetro. Esta substancia inhibidora se produce, en cambio, irregularmente y a veces no se produce en los medios líquidos.

Por una curiosa coincidencia, muchas de las condiciones físico-químicas que rigen la máxima producción de la toxina α -hemolítica y de la enterotoxina del *Staphylococcus aureus*, son las que proporcionan, también, el máximo de cosecha de la penicilina.

Gladstone 1938 ⁽²⁾, en su medio de composición definida a base de ácidos aminados, estableció que la concentración de glucosa M/80, equivalente a 0,25 %, es la óptima para la producción de α -hemolisina. Que su título se eleva rápidamente en los tres primeros días y más lentamente hacia el 6º, para caer luego gradualmente después del 9º día. Parker en 1925 ⁽³⁾ había observado también que el máximo de hemolisina se obtenía hacia el 6º-8º día.

Burnet (1930)⁽⁴⁾, estableció que el máximo de producción de toxina por el estafilococo se obtenía en medios con 1% de agar y que el aumento de la presión osmótica por la adición de sales, reduce proporcionalmente su cosecha.



Los estudios de McClean (1937)⁽⁵⁾, sobre la toxina estafilocócica han marcado realmente una etapa decisiva, al demostrar la influencia que tienen ciertos factores físicos o físicoquímicos. Este investigador esterilizó un frasco de boca ancha conteniendo cierta cantidad de caldo y una bolsa de celofán sujeta a un tubo que salía al exterior a través del tapón de algodón. Por el tubo vertió en la bolsa de celofán solución salina estéril y, después de dejar dializar durante un día, sembró el estafilococo en el caldo y en la solución salina que se había enriquecido con ciertas sustancias del caldo; obteniendo una mayor producción de toxina en esta última solución. Sus conclusiones fueron las siguientes: 1) Debe existir en el caldo alguna sustancia que permite el desarrollo del estafilococo, pero inhibe la producción de su toxina o bien 2) el caldo total permite al estafilococo producir una enzima que destruye a la toxina.

MacClean se inspiró a su vez en las experiencias de Pope (1932) sobre la producción de toxina por el *Corynebacterium diphtheria*, quien dializó una infusión de carne por celofán contra una solución de ácido acético al 5 %, agregando luego a esta solución 2 % de proteosa peptona y, sembrándola con el bacilo diftérico, obtuvo un título de toxina casi tan elevado como en el medio total.

MacClean reveló que el kieselgur, el kaolín y el papel de filtro actúan igualmente como adsorbentes de esa substancia inhibidora durante la incubación del estafilococo. Es muy probable que el agar actúe por el mismo mecanismo.

Según Mercier, P. (1939)⁽⁶⁾, las cepas toxígenas de estafilococo forman un velo seco y discontinuo en las primeras 24 horas.

Ramon, G. (1939)⁽⁷⁾, observó que la adición de tapioca, harina de trigo o de centeno al caldo Martin, aumentaban la producción de toxina por el bacilo diftérico.

Jordan y Burrows⁽⁸⁾ demostraron que la enterotoxina estafilocócica, es marcadamente inestable en una solución N/100 de OHNa y que se la puede extraer del medio de cultivo con solventes orgánicos.

Finalmente, Favorite y Hammon (1941)⁽⁹⁾, obtuvieron el máximo de producción de enterotoxina y de α -hemolisina sembrando en amplia superficie en un medio especial a base de ácidos aminados.

En vista de los hechos que acabamos de exponer, me propuse investigar la influencia de las substancias adsorbentes, de la glucosa y de una tensión de 20 % de CO₂ sobre la producción de penicilina.

El hongo empleado es la cepa de *Penicillium notatum* utilizada por Fleming y que he recibido del Ministerio de Agricultura de Washington por gentileza del Dr. Ch. Thom.

1ª SERIE DE EXPERIENCIAS. — Sembré 4 frascos de ginebra conteniendo unos cien ml de medio sólido de Parker, con una suspensión de esporos en agua destilada, de un cultivo de 15 días del *P. notatum* en el medio de agar-Czapek. Al día siguiente agregamos a dos frascos 1 % de glucosa y 3 % de hidrolizado de levadura. Después de 5 días de incubación, a 25° más o menos, vertimos en dos frascos (uno con el agregado de glucosa y de levadura hidrolizada y el otro sin él) 100 ml de medio líquido de Parker y en los otros dos restantes, igual volumen de agua destilada estéril. Desprendimos el agar y la capa miceliana y colocamos los frascos en el agitador mecánico, con suave rotación, durante 20 minutos. Se extrajo un día a 25° y, después de filtrar por la lana de vidrio, se probó la acción inhibidora sobre un cultivo sensible de estafilococo.

El máximo efecto inhibitor lo observamos en el cultivo en el medio de Parker sin glucosa ni hidrolizado de levadura y extraído con agua destilada.

2ª SERIE DE EXPERIENCIAS. — Tomamos 4 frascos de ginebra conteniendo 150 ml de caldo simple c/u. El frasco n° 1 permaneció tal cual. Al n° 2, le introdujimos una capa doble de celofán en forma tal que cubriera el fondo del frasco. En el frasco n° 3 introdujimos en la misma forma una capa doble de papel de filtro y en el frasco n° 4, vertimos 150 ml de caldo sobre una capa de agar lavado disuelto en agua destilada en la proporción de 1,5 %, previamente esterilizado. Después de esterilizar los tres primeros frascos se los sembró con una suspensión de esporos del *P. notatum* en agua destilada y, al día siguiente, agregamos a todos ellos 1 % de glucosa.

Los frascos fueron incubados a unos 25°, acostados, para ofrecer el máximo de superficie y con un espesor de capa líquida de 1,50 a 2 cm.

El máximo de producción se obtuvo en el frasco con papel de filtro con un título de 1/400 y, por orden decreciente, el frasco con caldo, el que tenía una capa de agar en el fondo y finalmente el provisto de celofán.

Titulando diariamente el poder inhibitor del contenido líquido de cada frasco comprobamos que el máximo se produjo en el frasco n° 3 hacia el 5º día, se mantuvo estacionado hasta el 7º y luego comenzó a bajar en pendiente acentuada hasta el 11º día, cuyo título de inhibición total fué tan solo de 1/10.

Cinco días después de la siembra, el frasco n° 1, presentaba un desarrollo pobre que señalamos con + consistente en la formación de islotes de color blanco y el caldo no había mudado de color.

El frasco n° 2, tenía un desarrollo +++ y el caldo presentaba su tinte original. El frasco n° 3: desarrollo +++ de color verde por la esporulación, particularmente en los bordes y el líquido era citrino.

Frasco n° 4: desarrollo +++-+ totalmente blanco y el caldo conservaba su tinte original.

3ª SERIE DE EXPERIENCIAS. — El día 30 de noviembre distribuimos el medio líquido de Parker, gentilmente suministrado por el Dr. Zanoli, en 10 frascos de ginebra en la siguiente forma: 1) medio de Parker; 2) medio de Parker adicionado de 0,25 % de glucosa (en solución en agua destilada esterilizada aparte a 115°, 15 minutos); 3) medio de Parker con atmósfera de 20 % de CO₂; 4) medio de Parker con 0,25 % de glucosa y atmósfera de CO₂; 5) medio de Parker con papel de filtro; 6) íd. que el n° 5 con 0,25 % de glucosa; 7) medio de Parker con papel de filtro y atmósfera de CO₂; 8) íd. que el n° 7 con 0,25 % de glucosa; 9) medio de Parker, vertido sobre una capa de agar agua al 1,5 %; 10) medio de Parker líquido, vertido sobre medio de Parker sólido.

El pH inicial de todos estos medios era igual a 7 y fueron sembrados con igual volumen de una suspensión de esporos en agua destilada del *P. notatum* y mantenidos a temperatura ambiente (de 25 a 30°C).

Diariamente se tomó el pH de cada frasco y se renovó la atmósfera de CO₂ en los frascos 3, 4, 7 y 8.

El 2 de diciembre, comenzó a manifestarse el desarrollo en los bordes únicamente, salvo en el frasco nº 5 que también lo presentó en la superficie formando pequeños islotes. El pH se mantenía igual a 7 en todos ellos y el poder de inhibición fué negativo.

Diciembre 3: El pH se mantiene igual a 7 en todos los frascos salvo en el nº 6 = 7,2 que tiene una infección bacteriana.

Poder de inhibición	Total	Parcial
1	0	
2	0	
3	1/10	1/25
4	0	
5	1/25	
6	0	
7	1/25	1/50
8	1/10	
9	0	
10	0	

Frasco nº	Intens. de desarrollo	Esporulación (color verde)	Color del medio	pH	Inhibición	
					Parcial	Total

Dicbre. 4:

1	+	0	0	7,2	1/10	
2	++	0	0	7,2	1/10	
3	+++	0	0	7,2	1/50	1/25
4	+	0	0	7,2	1/25	1/10
5	++++	++	0	7,6	1/150	1/75
6	++++	+	0	7,6	0	0
7	+++	0	0	7,2	1/100	1/50
8	++	0	0	7,2	0	0
9	+	0	0	7,2	0	0
10	+	0	0	7,1	0	0

Frasco n°	Intens. de desarrollo	Esporulación (color verde)	Color del medio	pH	UInhibición	
					Parcial	Total
<i>Dicbre. 5:</i>						
1	++	+	0	7,4	1/25	1/10
2	++	+	++	7,6	1/75	1/50
3	++	0	0	7,4	1/50	1/25
4	+	0	0	7,2		1/10
5	++++	+++	+	8	1/150	1/75
6	++++	+	0	8	0	0
7	+++	0	0	7,4	1/75	1/50
8	++	0	0	7,2	0	0
9	++	0	0	7,4	0	0
10	+	0	0	7,4	0	0
<i>Dicbre. 6:</i>						
1	++	0	0	8,2		1/25
2	++	+	+++	8	0	0
3	+	0	0	7,4		1/25
4	+	0	+	7,2	1/25	1/10
5	+++	+++	++	8,4		1/50
6	+++	+	+	8,4	0	0
7	++	0	+	7,4	1/150	1/25
8	+	0	++	7,2	1/50	1/10
9	++	0	0	7,6	0	0
10	++	0	0	7,4	0	0
<i>Dicbre. 7:</i>						
1	íd.	íd.	0	8	1/25	1/10
2	íd.	íd.	íd.	8	1/50	1/25
3	íd.	íd.	íd.			1/10
4	íd.	íd.	íd.			
5	íd.	íd.	íd.	8,4		1/25
6						
7						
8						
9	íd.	íd.	íd.	7,9	0	0
10	íd.	íd.	íd.	7,6	1/10	
<i>Dicbre. 8:</i>						
1				8,4	0	0
2				8,2	0	0
3				7,2		1/10
5				8,4	0	
7				7,2		1/10

Explicación: 0 indica ausencia de color, de modificación del color o de inhibición. El número de cruces indican diversas inten-

sidades. Id., significa que no hubo cambio con respecto al día anterior.

Estas experiencias fueron suspendidas el día 8 de diciembre en virtud de la marcada caída en el título de penicilina. El día 13 se volvió a tomar, sin embargo, el pH de los líquidos contenidos en los frascos 1, 2 y 5. Su valor fué igual a 8,4. El medio n° 2 había perdido su color citrino.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

De las experiencias expuestas vemos que, es posible extraer la penicilina de un cultivo en medio gelosado, con agua destilada.

Es muy probable que las sales reduzcan el poder inhibitor de la penicilina, dado que la extracción con agua destilada proporcionó un título mayor que la efectuada con el medio de Parker y los cultivos en caldo simple dieron, también, un título más alto que los efectuados en el medio de Parker.

De confirmarse este hecho por otras experiencias que tenemos en curso, la penicilina se comportaría como la actinomicina, cuya acción se anula en presencia de electrolitos (¹⁰). Por este motivo efectuamos nuestras suspensiones de esporos para sembrar, en agua destilada estéril.

La adición de levadura hidrolizada, mejora el desarrollo vegetativo, pero no influye sobre la producción de penicilina, como ya lo comprobaron otros autores (^{11, 12, 13, 14}).

La glucosa no parece tener una influencia apreciable sobre la producción de penicilina y, si la tiene, es desfavorable, como ya lo hiciera notar Fleming en 1929 (¹). Una atmósfera de 20 % de CO₂, renovada diariamente, influye desfavorablemente sobre el desarrollo del hongo y la producción de penicilina.

En los medios líquidos provistos de una capa de agar agua, de medio sólido de Parker o de celofán, la producción de penicilina fué mala o mediocre, lo cual indica que en estas condiciones el agar y el celofán no remueven del medio los elementos que destruyen la acción inhibitora. En cambio los medios líquidos, y particularmente el caldo simple (no glucosado), provistos de una capa de papel de filtro, permiten un desarrollo exuberante y rápido del hongo, que comienza a cubrirse de zonas verdes de esporulación hacia los tres o cuatro días y luego va en aumento. Coincidiendo con este aspecto macroscópico del cultivo se produce una elevación brusca del título de la penicilina y del pH del medio. El título de penicilina alcanza su pico hacia el 4^o-5^o día, se mantiene un par de días más y descendiendo luego un poco menos bruscamente que durante el ascenso.

El pH se mantiene, en cambio, constantemente por encima de 8 y creemos que sea éste uno de los factores de la reducción de la acción inhibidora.

La esporulación del *Penicillium notatum* tendría tanta importancia como la del *Actinomyces* en la producción de la acción inhibidora y lítica. Estas se forman y difunden en el momento de la esporulación (Welsch)⁽¹⁶⁾.

En ocasiones hemos notado la aparición de la acción inhibidora al mismo tiempo que el líquido de cultivo adquiriría un tinte marcadamente citrino y desaparecer con la pérdida de esa acción. Sin embargo, no parece tener relación con el título de penicilina.

En colaboración con la Srta. I. Fischer, hemos emprendido las siguientes experiencias, sobre cuyos resultados comunicaremos oportunamente: 1) observación de la producción de penicilina en un medio a base de caseína hidrolizada y de factores de crecimiento; 2) empleo del medio de Czapek con diferentes concentraciones de glucosa; 3) reemplazar la glucosa en el medio de Czapek por otra fuente de carbono, el citrato de sodio y el almidón; 4) investigar la influencia de la oxidación y de la reducción sobre la penicilina; 5) neutralización con una solución de ácido cítrico del medio de cultivo, en el momento de máxima producción de penicilina.

RESUMÉ

De nos expériences sur la production de « pénicilline » par le *Penicillium notatum* dans le bouillon de viande et le milieu de Parker (simple o gélosé), nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

1) On peut extraire la substance active des cultures sur milieux solides avec de l'eau distillée.

2) Le glucose, les sels et une atmosphère au 20 % de CO₂ semblent avoir une influence défavorable sur la production de « pénicilline ».

3) Nous n'avons pas observé aucune relation entre le changement du pH (vers l'alcalinité) ou de la couleur du bouillon (citrine) et le titre de la « pénicilline ».

4) Les cultures bien développées et particulièrement celles de couleur verdâtre par l'esporulation abondante, sont riches en « pénicilline ».

5) Le développement du *P. notatum* sur un milieu liquide pourvu d'une couche de papier à filtrer est luxuriant. L'esporulation et, par conséquent, la production de « pénicilline » se trouve franchement favorisée. Il est probable que le papier à filtrer agit, comme la gélose, par un mécanisme physique d'adsorption.

SUMMARY

From our experiences on « penicillin » production on broth and Parker's medium (liquid or solid), we can derive the following conclusions:

- 1) We can remove the active substance from culture on solid media with distilled water.
- 2) Dextrose, salts and 20 % CO₂ atmosphere seem to have an unfavourable influence on penicillin production.
- 3) We could not appreciate any relation between change of the pH or colour of the medium and the title of « penicillin ».
- 4) Well developed cultures and specially those with a good sporulation (greenish) are rich in « penicillin ».
- 5) Liquid media supplied with a layer of filter paper, enhance the development, sporulation and « penicillin » formation. The filter paper, as the agar, probably act by a physical mechanism of adsorption.

BIBLIOGRAFÍA

1. FLEMING, A. — *On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae.* *The Brit. J. of Exper. Path.*, vol. 10, pp. 226-236, 1929.
2. GLADSTONE, G. P. — *The production of staphylococcal hemolysin in chemically defined medium.* *The Brit. J. of Exper. Path.*, vol. 19, 208-226, 1938.
3. PARKER y colaboradores. — *Further studies on the production of staphylo-toxin.* *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, vol. 23, p. 344, 1925.
4. BURNET, F. M. — *The production of staphylococcal toxin.* *The J. of Path. and Bact.*, vol. 33, n° 1, pp. 1-16, 1930.
5. McCLEAN, D. — *Staphylococcus toxin.* *The J. of Path. and Bact.*, vol. 44, pp. 47-70, 1937.
6. MERCIER, P. — *Sur la toxigenèse staphylococcique.* *Rev. d'immunologie*, vol. 5, pp. 289-298, 1939.
7. RAMON, G. — *La production de toxine diphtérique, tétanique staphylococcique, etc.* *Rev. d'immunologie*, vol. 5, pp. 385-404, 1939.
8. JORDAN y BURROWS. — *Nature of the substance causing staphylococcus food poisoning.* *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, vol. 30, pp. 448-449, 1933.
9. FAVORITE, G. O., and HAMMON, W. Mc. D. — *The production of staphylococcus enterotoxin and haemolysin in a simplified medium.* *J. of Bact.*, vol. 41, pp. 305-316, 1941.
10. DATH, S., y RENAUX, E. — *Sur l'action bactériolytique du Streptothrix.* *C. R. Soc. Biol.*, vol. 97, pp. 1194-1195, 1927.
11. ABRAHAM, E. P., y colaboradores. — *Further observations on Penicillin.* *The Lancet*, vol. 241, pp. 177-189, 1941.
12. ATKINSON, N. — *Antibacterial substances produced by moulds.* *The Austr. J.*

- of *Exper. Biol. and Med.*, vol. 20, pp. 287-288, 1942, vol. 21, pp. 15-16, 1943, vol. 21, pp. 127-131, 1943.
13. CHAIN, E.; FLOREY, H. W., and JENNINGS, M. A. — *An antibacterial substance produced by P. claviforme*. *The Brit. J. of Exper. Path.*, vol. 23, n° 4, pp. 202-205, 1942.
 14. WILKINS, W. H., and HARRIS, G. C. M. — *Investigation into the production of bacteristatic substances by fungi*. *The Brit. J. of Exper. Path.*, vol. 23, n° 4, pp. 166-169, 1942.
 15. VONKENNEL, J.; KIMMIG, J., und LEMBKE, A. — *Die Mykoine, eine neue Gruppe therapeutisch wirksamer Substanzen aus Pilzen*. *Klin. Woch.*, Jg. 22, H. 16/17, pp. 321, 1943.
 16. WELSCH, M. — *Propriétés bactériolytique du Streptothrix et sporulation*. *C. R. Soc. Biol.*, vol. 123, ep. 1013-1017, 1936.