

Estudio sobre la acción inhibidora del *Penicillium notatum*

II. Influencia de la fuente carbonada de nutrición

Por P. NEGRONI e I. FISCHER

En un trabajo anterior, uno de nosotros expuso los resultados obtenidos en la producción de la substancia inhibidora sobre el *Staphylococcus aureus* por el *Penicillium notatum*, sembrado en caldo o en el medio de Parker con y sin glucosa y estudiamos la influencia de algunos factores físicos (agar, papel de filtro, celofán y una atmósfera de CO₂). También expusimos el programa de futuras experiencias variando la fuente de nutrición carbonada (utilizando el almidón y el citrato de sodio) y la nitrogenada (con el empleo de caseína hidrolizada y de ciertos factores de crecimiento), así como la neutralización del medio de cultivo en el momento de máxima producción de la substancia inhibidora que, en los medios mencionados, coincidía con un pH elevado (alrededor o mayor de 8).

En el presente trabajo hemos tratado de indagar la influencia de la nutrición carbonada sobre la producción de la substancia inhibidora.

Como tarea previa efectuamos el estudio auxanográfico en la siguiente forma: preparamos el medio sólido de Lodder (1934) y lo sembramos abundantemente con una suspensión de esporos del *Penicillium*, cuando estaba fundido a 45°C. Volcamos en cajas de Petri, dejamos solidificar y secar en la estufa y, luego de dividirla en sectores con lápiz graso, con trazos efectuados en el fondo, depositamos en la base de cada sector un poco de los diferentes hidratos de carbono, en substancia. Al cabo de varios días de incubación a temperatura ambiente obtuvimos el siguiente resultado: el hongo crece con la misma intensidad en el sector con glucosa, galactosa, lactosa, maltosa, sacarosa, con cierta mayor exuberancia en el sector con rafinosa y casi nada con almidón (fig. 1).

En vista de estos resultados utilizamos para nuestras experiencias la glucosa y el almidón, como los dos extremos de la serie men-

cionada y el medio líquido de Czapek modificado (Abraham y colaboradores, 1941), de composición definida, para evitar la introducción de factores de difícil interpretación.

1ª SERIE DE EXPERIENCIAS

Medio de Czapek repartido en frascos de Erlenmeyer de 500 cm³ en volumen de 80 ml cada uno y esterilizados a 115° durante 15 minutos. El pH se ajustó a 6,4. Se prepararon, por otra parte, las siguientes soluciones: glucosa en agua destilada al 20 % esterilizada por filtración; CO₃HNa en solución al 10 % esterilizada por filtración. Almidón en solución al 15 % y citrato de sodio en solución al 10 % esterilizados en el autoclave a 115° durante 15 minutos. El volumen de cada frasco fué completado a 100 ml con agua destilada estéril y la siembra se efectuó con una suspensión densa de esporos en levadura de cerveza hidrolizada (técnica de Stockhausen) en volumen de 2 ml para cada frasco. En ésta, como en las experiencias siguientes, la suspensión de esporos fué obtenida de cultivos del *Penicillium* en agar mosto de cerveza en tubos comunes, de 1 a 2 semanas de edad.

Frasco n° 1: con 4 % de glucosa; frasco n° 2: íd. con dos rodajas de papel de filtro; frasco n° 3: con 0,25 % de glucosa y el n° 4: íd. con papel de filtro. Frasco n° 5: con 0,5 % de citrato de sodio y el n° 6: íd. con papel de filtro. Frasco n° 7: con 1 % de almidón y el n° 8: íd. con papel de filtro. Frasco n° 9: con 0,25 % de glucosa y 0,2 % de la solución de bicarbonato que, según Ramon, sería un buen « buffer ». Frasco n° 10: íd. con papel de filtro.

Resultados: El desarrollo del hongo fué mucho más intenso en el medio con 4 % de glucosa y 1 % de almidón que en los restantes. La capa micelia comienza a esporular hacia el 4º ó 5º día y a cubrirse de numerosas gotitas amarillentas; al propio tiempo el medio de cultivo también adquiere un tinte amarillento, bastante más acusado en el medio con almidón.

El pH del medio descendió en los frascos con glucosa a 4-5, para elevarse hacia el 6º y llegar a pH 8, hacia el 10º día. En cambio en los frascos con almidón no se produjo este descenso del pH, sino que, gradualmente, se elevó hasta llegar a pH 8,6 hacia el 12º día.

Respecto a la producción de la substancia inhibidora comenzó a aparecer hacia el 6º día y alcanzó su máximo al 13º. Fué de una unidad Oxford en los medios con 4 % de glucosa y en los que contenían 1 % de almidón; tal vez algo mayor en este último y en los frascos que contenían papel de filtro.

Finalmente diremos que el citrato de sodio es una pésima fuente

carbonada. El desarrollo del hongo es muy pobre y no produce sustancia inhibidora.

Esta, como las experiencias que más adelante detallaremos, han sido hechas por duplicado, para reducir los errores de observación.

2ª SERIE DE EXPERIENCIAS

Esta serie de experiencias fué similar a la precedente, pero el medio de Czapek fué repartido en frascos de ginebra para obtener una mayor relación de superficie a volumen. En unos, la glucosa al 4 % se esterilizó junto con el medio de cultivo en el autoclave y en otros frascos, se le adicionó una solución de glucosa esterilizada aparte por filtración. Utilizamos, finalmente, el agua harina de maíz cuya técnica de preparación hemos descripto (Negroni, P., «Morfología y biología de los hongos», 1938).

Resultados: Únicamente produjeron sustancia inhibidora los frascos con 0,25 % de glucosa (esterilizada aparte por filtración) más 0,2 % de bicarbonato de sodio y los que contenían almidón (1 %), cuyos títulos eran, a los diez días, de 11 mm y 19 mm respectivamente (titulación en cajas de Petri) y el pH era de 8,4 y 8. En ese momento le agregamos a uno de los frascos de cada serie (con glucosa y bicarbonato y con almidón) 2 ml de una solución de ácido cítrico al 20 %. Dos días más tarde el frasco con glucosa y «buffer» acidificado tenía un pH 7,8 y el no modificado pH 8,6. El poder inhibidor era igual en ambos (11 mm); pero cuatro días más tarde el frasco acidificado llegó a producir una inhibición de 14 mm en tanto que el testigo, no acidificado, ya no poseía, casi, sustancia inhibidora.

Otros fueron los resultados obtenidos en los frascos con 1 % de almidón. Debido a la ausencia de «buffer» el pH había descendido a 5, dos días más tarde con desaparición completa de la sustancia inhibidora, en tanto que el testigo, no acidificado, llegó a tener a los 14 días una unidad y media Oxford.

El agua harina de maíz, a pesar de contener almidón, es un medio inadecuado para la obtención de la sustancia inhibidora del *Penicillium*.

3ª SERIE DE EXPERIENCIAS

Cuyo objeto fué adicionar al medio líquido de Czapek 0,01 por mil de sulfato de zinc que estimula la esporulación y tratar de obtener así un mayor título de la sustancia inhibidora. Se le agregó además 1 % de almidón y el pH se ajustó a 6,8. Por los resultados obtenidos podemos afirmar que el sulfato de zinc, en la dosis utilizada, no mejora la producción de la sustancia inhibidora.

CONCLUSIONES

Del resultado de nuestras experiencias, utilizando el medio líquido de Czapek con diferentes fuentes carbonadas, podemos deducir que el almidón es la mejor. El desarrollo es exuberante, la capa miceliana gruesa y bien esporulada se cubre de gotas amarillas y el medio también adquiere el mismo tinte el 8º día. El hongo utiliza gradualmente el almidón, por eso, probablemente, el pH del medio no desciende, sino que se eleva hasta llegar a un máximo de 8,4-8,6.

En los medios con glucosa se produce un descenso inicial del pH hasta 4, más o menos, para elevarse luego gradualmente. La adición de 0,2 % de CaHNa impide ese descenso del pH. La proporción de glucosa de 0,25 % a 4 % no parece influir en la producción de la sustancia inhibidora así como tampoco la adición de sulfato de zinc al 0,01 por mil.

El citrato de sodio al 0,5 % es una pésima fuente de carbono. El hongo se desarrolla muy pobremente y no produce sustancia inhibidora. El agua harina de maíz tampoco es utilizable para la obtención de la sustancia inhibidora.

La acidez del medio de cultivo parece impedir la formación de la sustancia inhibidora o destruir la ya formada.

El máximo de producción de la sustancia inhibidora tiene lugar después de los 10 días, cuando todo el azúcar ha sido oxidado y el almidón hidrolizado.

Una gran superficie de aireación al favorecer y acelerar el proceso de combustión de la fuente carbonada, mejora y protege la producción de la sustancia inhibidora. Si por algún procedimiento mecánico se consiguiera aumentar la superficie de oxidación, como para la obtención del vinagre por el procedimiento rápido o la del ácido glucónico, mediante el empleo de tambores rotatorios con inyección de aire esterilizado, se mejoraría, probablemente, la producción de sustancia inhibidora.

RÉSUMÉ

Nous avons étudié l'influence de différentes sources de charbon sur la production de « pénicilline » par le *Penicillium notatum* ensemencé dans le milieu de Czapek.

Nous avons trouvé que l'amidon est le meilleur et qu'en employant le glucose, les différentes proportions de 0,25 % à 4 % ne semblent pas avoir une influence appréciable sur la production de « pénicilline ».

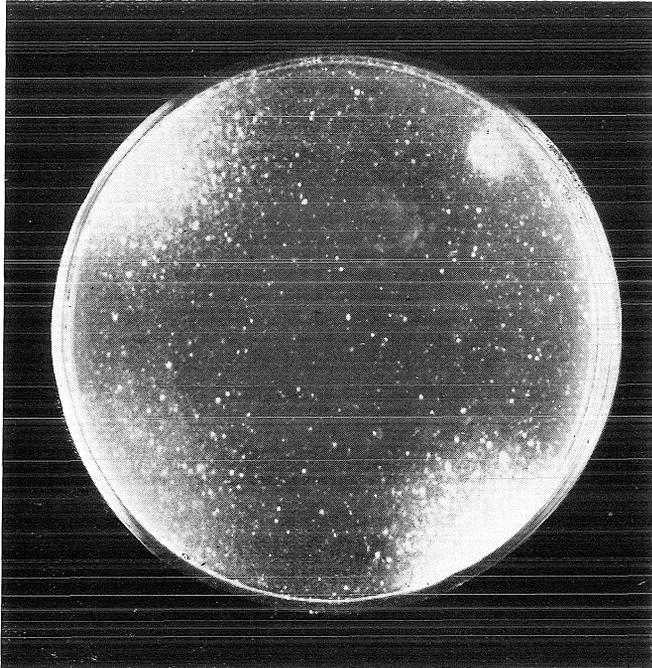


FIG. 1. — Auxanograma de los hidratos de carbono correspondientes al *Penicillium notatum*. La mancha más pequeña es el sitio donde se depositó el almidón.

Le citrate de sodium a 0,5 % est une mauvaise source de charbon pour le développement et la production de la substance inhibitrice. L'eau de farine de maïs n'est pas un milieu utilisable pour cet objet.

L'addition a un milieu de Czapek de 0,001 % de sulfate de zinc ne change pas les résultats précédemment obtenus.

L'acidité du milieu paraît empêcher la formation de la « penicilline » ou détruire celle déjà formée.

SUMMARY

We have tested the influence of different carbon compounds on the antibiotic substance upon *St. aureus* produced by *Penicillium notatum* sowed on Czapek medium.

Starch is the best carbon source. Different proportions of dextrose from 0,25 % to 4 % have no noticeable influence on penicillin production.

Corn-meal water is a poor medium for this purpose.

The addition of 0,001 % of zinc sulphate to Czapek medium does not change the results formerly obtained.

Sodium citrate (0,5 %) is a bad source for the development of the fungus and the production of antibiotic substance.

The acidity of the medium seems to check penicillin formation or to destroy it if already formed.