

Estudio sobre la acción inhibidora del *Penicillium notatum*

III. Influencia de la fuente de nutrición nitrogenada

Ppr P. NEGRONI e I. FISCHER

Como en el trabajo anterior sobre el estudio de la influencia de la fuente de nutrición carbonada, comenzamos en éste por obtener el auxanograma del N, sembrando el *Penicillium* en el medio de Lodder (1934) de la siguiente composición: Agua destilada 100 ml; fosfato monopotásico 0,1 g; sulfato de magnesio 0,05 g; glucosa 2 g; agar lavado 2 g, comprobando que en este medio el desarrollo tenía lugar aproximadamente con la misma intensidad, cualquiera fuera la fuente nitrogenada utilizada.

Recurrimos, entonces, con éxito al empleo del agar agua (agar lavado 2 g, agua destilada 100 ml) para eliminar o reducir otras fuentes de nutrición que oscurecían los resultados. Las fuentes de N utilizadas fueron las siguientes: Bactopeptona Difco, asparagina, creatinina, alanina, histidina, urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio. El *P. notatum* se desarrolla bien en los sectores con peptona y asparagina, muy poco con creatinina, alanina e histidina y nada con urea, sulfato de amonio y nitrato de potasio (fig. 1).

Ya sabemos lo que puede dar el nitrato de potasio como fuente de nutrición nitrogenada en relación a la producción de sustancia inhibidora, dado que entra en la composición del medio de Czapek utilizado en las experiencias del trabajo anterior.

Expondremos ahora los resultados obtenidos con el empleo de diversas peptonas, de asparagina y de caseína hidrolizada.

1ª SERIE DE EXPERIENCIAS

En el agua corriente peptonada al 1 % (Bactopeptona Difco) el hongo se desarrolla muy bien y la capa miceliana se cubre de gotitas incoloras. El pH de 6,6 que era el original ascendió a 8 y adquirió un título máximo de inhibición de 1 unidad Oxford al cabo de 7 días, título que se mantuvo durante unos 15 días más.

2ª SERIE DE EXPERIENCIAS

En vista de los resultados que anteceden, agregamos 2 % de Bactopeptona Difco al agua de remolachas y al agua harina de maíz, dejando otra serie de 6 frascos conteniendo el mismo medio sin peptonar.

El máximo de producción de sustancia inhibidora se obtuvo al 8º día con 5 unidades Oxford en el agua de remolacha adicionada de peptona, en tanto que en el agua de remolacha sola, se obtuvo una unidad. En el agua harina de maíz adicionada de peptona se obtuvo el máximo de producción al 5º día con una unidad, mientras que en el agua harina de maíz no peptonada, no se produjo sustancia inhibidora alguna.

3ª SERIE DE EXPERIENCIAS

Dado que el *Penicillium notatum* y hongos vecinos viven habitualmente en el suelo donde desarrollan su acción inhibidora sobre las bacterias y otros hongos, se nos ocurrió preparar un medio con extracto de suelo (ver Negroni, P., «Morfología y biología de los hongos. Técnica micológica», 1938), adicionado de las fuentes nitrógenadas y carbonadas que en seguida se detallarán. El medio líquido fué ajustado a pH 6,6 y repartido en volumen de 150 ml en frascos de ginebra para obtener amplia superficie, disponiendo la experiencia en la siguiente forma: 1) extracto de suelo; 2) extracto de suelo más 1 % de tapioca; 3) extracto de suelo más 1 % de harina de trigo; 4) extracto de suelo más 1 % de harina de trigo y 1 % de bactopeptona; 5) extracto de suelo más 1 % de harina de trigo y 1 % de Bactotriptonas Difco. Las siembras fueron efectuadas con una suspensión de esporos en autolizado de levadura de cerveza y dispusimos esta experiencia, como todas las demás, por duplicado, para reducir las causas de error.

El desarrollo y la esporulación fueron muy buenos en los frascos 4 y 5, escaso en los 2 y 3 y muy pobre en el 1.

Es muy importante hacer notar que únicamente obtuvimos producción de sustancia inhibidora en los frascos 4 y 5 con peptona, alcanzándose el máximo hacia el 6º día, siendo el título un poco más elevado en el medio 5 con Bactotriptonas. Respecto al pH comprobamos lo observado en experiencias anteriores que, no habiendo glucosa, el pH se eleva gradualmente hasta 8-8,2 y que, en el momento de máxima producción de la sustancia inhibidora, casi toda la fuente carbonada ha desaparecido.

4ª SERIE DE EXPERIENCIAS

Como con el empleo del extracto líquido de suelo, no obtuviéramos una mayor producción de substancia inhibidora, pensamos utilizar la tierra de jardín seca y tamizada adicionada de agua peptonada con o sin hidrolizado de caseína. Las experiencias fueron efectuadas como sigue: 1) 100 g de tierra más 100 ml de agua peptonada (Bactopeptona Difco) al 1 % y 10 ml de caseína hidrolizada; 2) 100 g de tierra más 100 ml de agua peptonada al 1 %; 3) 100 g de tierra más 100 ml de agua peptonada al 1 % (Bactotripton Difco); 4) 100 g de tierra más 100 ml de agua al 1 % de Bactotripton y 10 ml de caseína hidrolizada.

El título máximo de producción de substancia inhibidora se registró hacia el 6º día: 8 unidades Oxford para el frasco nº 2, siguiéndoles luego los nº 1 y 3 con una unidad y en el frasco nº 4 no se obtuvo formación de substancia inhibidora.

5ª SERIE DE EXPERIENCIAS

Con estas experiencias nos propusimos indagar la influencia conjunta de la fuente carbonada y nitrogenada, así como la acción de la vitamina B₁ y del CO₃HNa al 0,2 %, disponiéndolas en la siguiente forma: 1) 100 g de tierra más 100 ml de solución de Bactopeptona al 1 %; 2) íd. con Bactotripton al 1 %; 3) 100 g de tierra más 100 ml de agua con 1 % de Bactopeptona y 2 % de glucosa (esterilizada aparte); 4) íd. con Bactotripton al 1 %; 5) 100 g de tierra más 100 ml de agua con 1 % de Bactopeptona y 0,5 % de almidón (en solución acuosa esterilizada aparte); 6) íd. con 1 % de Bactotripton; 7) 100 g de tierra, más 100 ml de solución de Bactopeptona al 1 %, 2 % de glucosa (esterilizada aparte) y 8 γ de Betaxina (vitamina B₁); 8) íd. con 0,5 % de almidón; 9) 100 g de tierra con 100 ml de solución de Bactopeptona al 1 % y 8 γ de Betaxina; 10) 100 g de tierra más 100 ml de agua peptonada al 1 % (Bacto), 2 % de glucosa y 0,2 % de CO₃HNa; 11) íd. que el anterior con 0,5 % de almidón; 12) 100 g de tierra más 100 ml de agua peptonada (Bactopeptona) al 1 % y 5 ml de caseína hidrolizada; 13) íd. que el anterior con 2 % de glucosa; 14) íd. con 0,5 % de almidón en lugar de la glucosa; 15) 100 g de tierra más 100 ml de agua con 0,5 % de asparagina; 16) íd. más 2 % de glucosa; 17) íd. más 0,5 % de almidón. El pH inicial oscilaba alrededor de 6,8.

El pico de producción de substancia inhibidora se obtuvo hacia el 6º día en los frascos 2, 6, 13 y 14 (una unidad Oxford) siendo algo mayor en el frasco nº 14.

En los frascos 4, 7, 8 y 11 se obtuvo menor cantidad y nada en los restantes. En los medios con glucosa el pH cae alrededor de 4 en los primeros días y no se observa aparición de la substancia inhibidora hasta que el pH se eleva y desaparece la acción reductora sobre el licor de Fehling (después del 5º día en los medios peptonados).

CONCLUSIONES

De las experiencias expuestas en este trabajo, nos parece poder deducir que *la fuente nitrogenada es de gran importancia* en la producción de la substancia inhibidora para el *St. aureus* por el *P. notatum*. El auxanograma revela que la peptona y la asparagina, son las fuentes de nitrógeno mejor utilizadas y hemos comprobado que regularmente se obtienen los mejores títulos de poder inhibidor en los medios líquidos peptonados. Particularmente ilustrativo es a este respecto el resultado de la 3ª serie de experiencias.

La asparagina, según nuestra experiencia, es una fuente de N inadecuada para la producción de la substancia inhibidora. La Bactotripton se ha mostrado, en general, ligeramente superior a la Bactopeptona (Difco).

La adición de 2 % de glucosa no modifica y a veces inhibe la formación de la substancia inhibidora, en presencia de peptona.

La adición de 0,5 % de almidón mejora, a veces, la producción de substancia inhibidora en los medios peptonados. Este efecto lo hemos notado, particularmente en el medio peptonado adicionado de 2,5 % de caseína hidrolizada.

La adición de vitamina B₁ no modifica los resultados obtenidos en los medios con hidrato de carbono.

En los medios glucosados el pH desciende alrededor de pH 4 en los primeros días y la substancia inhibidora no aparece hasta que el pH se eleva a un valor de 8 aproximadamente, y ha desaparecido la acción reductora sobre el licor de Fehling.

La adición de 2,5 % de caseína hidrolizada al medio conteniendo 1 % de Bactotripton, no parece mejorar su rendimiento.

Agradecemos al Dr. Ruff el habernos suministrado caseína hidrolizada.

RÉSUMÉ

Nous pouvons déduire de nos recherches que la source azotée employée dans le milieu de culture pour le *P. notatum* a une grande influence sur la production de la substance antibiotique.

La peptone semble être la meilleure source d'azote. La Bactotripton Difco est faiblement supérieure à la Bactopeptone.

Nous avons obtenu le titre plus élevé de « pénicilline » en employant un milieu peptoné additionné de 0,5 % d'amidon et 2,5 % de caséine hydrolysée.

L'addition de vitamine B₁ au milieu avec hydrate de carbone ne change pas les résultats précédemment obtenus.

En employant l'asparagine à 0,5 % nous n'avons pas obtenu la production de la substance inhibitrice.

SUMMARY

The results of our experiments seem to enhance the influence of N. source in culture media on the production of antibiotic substance by *P. notatum*.

Peptone seems to be the best N. source. Bactotriptide Difco gave some better results than Bactotryptone.

We have obtained the highest titer of « penicillin » employing a culture medium with peptone, 0,5 % starch and 2,5 % hydrolysed caseine.

We have not obtained « penicillin » production in culture media containing 0,5 % asparagine.

The addition of vitamine B₁ to culture media with carbohydrates seems to have no influence on « penicillin » production.

BIBLIOGRAFÍA

- Es ya muy abultada, por eso remitimos a nuestro trabajo anterior:
 NEGRONI, P. — *Estudio sobre la penicilina. I. Influencia de ciertos factores físicos y químicos sobre su producción. La Prensa Médica Arg.*, XXXI, n° 5, 238-242, 1944.
 y a las siguientes publicaciones donde se encuentran resumidos todos los trabajos:
Penicillin and other antibiotics produced by microorganisms. E. R. Squibb & Sons, July 1943.
Penicilina. 1929-1943. Colaboración especial. *Bol. Med. Británico*, 2, 1-31, 1944.

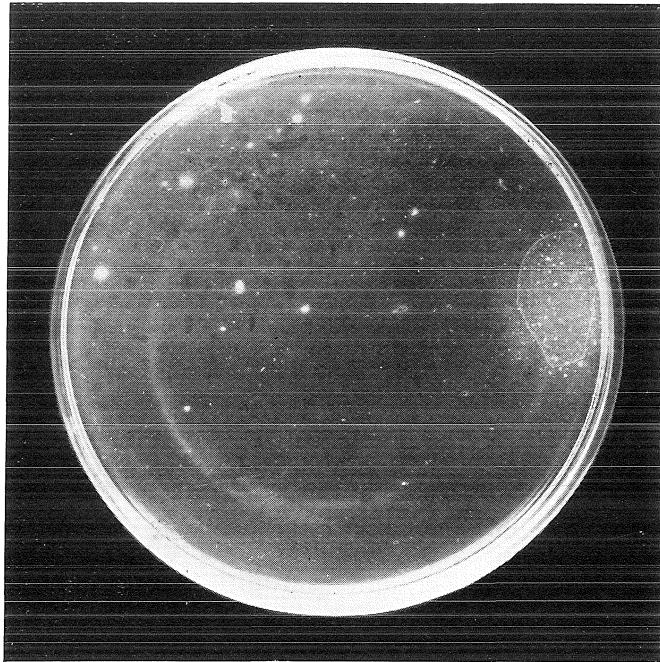


FIG. 1. — Auxanograma del nitrógeno correspondiente al *Pen. notatum*.