

Tesis de Posgrado

Un método sencillo para estimar la producción de un antibiótico

González Corrales, Elsa L.

1951

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

González Corrales, Elsa L.. (1951). Un método sencillo para estimar la producción de un antibiótico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0688_GonzalezCorrales.pdf

Cita tipo Chicago:

González Corrales, Elsa L.. "Un método sencillo para estimar la producción de un antibiótico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1951.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0688_GonzalezCorrales.pdf

MINISTERIO DE EDUCACION
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES

Un método sencillo para estimar
la producción de un antibiótico

Tesis presentada por

ELSA L. GONZALEZ CORRALES

para optar al título
de DOCTORA EN QUIMICA

1951

TESIS 688

A mi hermano que, como siempre,
me ha estado ayudando.

A. his palmas y

Al Doctor Alfredo Cordelli,
espíritu profundo y sutil, que supo conducir mis
primeros pasos por el difícil sendero de la in-
vestigación científica, todo mi agradecimiento.

Sinceramente reconocida al personal del Taller de Vidrio de la Facultad de Ciencias, Exactas, Fisicas y Naturales y a toda persona que en una u otra forma hayan contribuido a la realizaci3n de este trabajo.

I.- Objeto del presente trabajo

II.- Antecedentes.-

1.- Los problemas de la producción de antibióticos

2.- Métodos experimentales de laboratorio y de escala semi-industrial.

3.- El uso del disco de agar en la elección de la cepa.

4.- Posibilidades que ofrece el uso del disco de agar.

III.- Estudio de las condiciones en que se puede aplicar el método propuesto.

IV.- Material y métodos.

1.- Material. Su descripción y preparación.

2.- Medios de cultivo y soluciones.

3.- Métodos.

a.- Técnica de preparación de las cajas de agar macerado de maíz para la curva standard.

b.- Técnica de preparación de las cajas de producción de penicilina.

I.- Preparación de las cajas I.

II.- Preparación de las cajas II

c.- Técnica de preparación de las cajas de difusión de penicilina

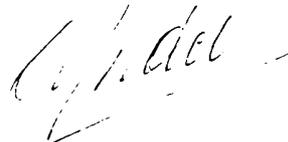
d.- Técnica de preparación de las cajas de agar-Staphylococcus.

e.- Construcción de la curva standard.

f.- Medida de la cantidad de penicilina producida en cada caja.

V.- Resultados experimentales.-

a.- Estudio de la difusión en el agar.



b.- La influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de penicilina.

c.- La influencia de la cepa en la producción de penicilina.

VI.- Láminas

VII.- Conclusiones.

VIII.- Resumen.

IX.- Bibliografía.

I.- Objeto del presente trabajo

En octubre de 1949 fué aislado en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales un hongo que producía la inhibición de l desarrollo de un coco aislado de la boca.

Se efectuaron los estudios requeridos para su identificación y al determinar la naturaleza del microbio aislado se reconoció su identidad con el *Penicillium notatum*.

Este hecho nos indujo a adoptar definitivamente como tema de nuestro trabajo de tesis, el método de producción y dosaje de penicilina que vamos a describir.

Nuestra decisión fué tomada principalmente por la falta de recursos para poder realizar de manera sistemática y simple el estudio correcto de la producción de penicilina en forma cuantitativa en las condiciones precarias del laboratorio en que fuera realizado el trabajo.

Al mismo tiempo, pensamos realizar una contribución para la simplificación de los métodos que se utilizan en tales medidas.

El método ideado para el estudio, consistía en términos generales en la aplicación de una variante de la técnica que Raper y sus colaboradores describieron en 1944 (28)

La idea general que guió nuestro trabajo consistió en estudiar la concentración del antibiótico que difunde en el agar desde un centro donde está cultivado el *Penicillium notatum* en el medio apropiado.

Una vez fijadas las condiciones de la técnica lo que demandó un trabajo considerable, fué posible estudiar dos problemas diferentes.

El primero fué investigar la influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de penicilina.

El segundo, la influencia de la cepa en la producción de penicilina.

Por tratarse de la adopción de un método para obtener cifras significativas en la comparación de la influencia de diferentes variables, fué necesario "standardizar" de la mejor manera posible todos los elementos: materiales, sustancias y técnicas que se utilizarían.

Por eso el trabajo es esencialmente el del estudio, elección, realización práctica y crítica del método propuesto.

II.- Antecedentes.

1.- Los problemas de la producción de antibióticos.

Con el descubrimiento de la penicilina hecho por Sir Alexander Fleming (1), se abre al mundo científico el importante capítulo de los antibióticos.

Cabe a la penicilina el mérito de ser el primer antibiótico descubierto y estudiado a fondo.

En 1928, trabajando en el St Mary's Hospital, en Londres, Fleming observó que un hongo era capaz de inhibir el desarrollo de una bacteria. Y así lo comunica en (1) y dice que "trabajando con variantes de estafilococos, un nº de placas fueron dejadas de lado en el laboratorio. En los exámenes periódicos de las mismas, estas se contaminaron con microbios del aire. Se notó que alrededor de una de las colonias gigantes de un hongo, las colonias de estafilococos se habían hecho transparentes, y era obvio, que habían sufrido una lisis Se encontró, que el caldo en el que se había cultivado el hongo, a temperatura ambiente, durante una o dos semanas, había adquirido gran poder bactericida y bacteriolítico a muchas de las bacterias patógenas más comunes".

Este caldo, en que Fleming cultivaba el hongo que resultó ser una cepa del grupo *Penicillium chrysogenum* según Thom - fué nombrado PENICILINA. Posteriormente, el nombre fué asignado a la substancia pura cristalizada.

En 1932, Clutterbuck y colaboradores en un trabajo que aparece en el *Biochemical Journal* 26, 1907 - 1918 (2) , describen por vez primera un intento de aislamiento de la substan -

cia bactericida. Citan también ,por primera vez, la composición de un medio de cultivo para la producción de penicilina.

"El propósito de este trabajo, es describir el aislamiento del pigmento (chrysogenina), de la proteína, usando la cepa tipo de P.Chrysogenum Nº 26 Thom y los ensayos preliminares de aislamiento de la penicilina, usando el cultivo de Fleming".

Utilizan un medio de Czapek Dox modificado.

No logran aislar la sustancia bactericida por ser ésta sumamente lábil, pero hacen observaciones de valor respecto a su estabilidad.

"La sustancia antibacteriana es extremadamente lábil haciéndose inactiva durante la evaporación de una solución etérea en una corriente de aire y por evaporación, in vacuo, a 40 -45°C en soluciones ácidas o alcalinas. Es, sin embargo, más estable a PH 5-6 y puede ser extraída con éter de una solución ácida".

Aparece en 1935, una publicación de Reid, R.D. (3) , donde intenta aislar la sustancia sin lograrlo. Desarrolla el hongo en un caldo de ternera incubando durante 7-10 días en un medio sintético durante 20-25 días, pero en ningún caso cita la composición del medio de cultivo empleado.

El grupo de investigadores de Oxford, presentan un trabajo en 1940, (5), que constituye el punto de partida procurando la obtención intensiva de la producción y la aplicación terapéutica de la penicilina. Logran preparar un polvo de color castaño fácilmente soluble en agua y de un poder bactericida mucho mayor que el que poseía el filtrado obtenido hasta ese momento.

En 1941, continuando las investigaciones ante-

riores describen (6), precisamente, la preparación en escala semi-industrial de penicilina, utilizando el mismo medio de cultivo que Glutterbuck y sus colaboradores emplean en el trabajo más arriba citado.

Obtienen un producto que posee alrededor de 40-50 Unidades Oxford por mg. Definen a la unidad Oxford como la cantidad de penicilina que disuelta en 1 m. de agua produce una inhibición del St.aureus de 24 mm. , por el método de la copa .

Describen además, con detalle el método de la copa, que con pocas modificaciones es el usado hasta la actualidad para los controles de potencia, en las fábricas de penicilina.

Challinor, S.W. y Mc.Naughton, J. en (12), producen penicilina en un medio de Czapek-Dox modificado y encuentran que en un medio con buffer de fosfatos, se obtiene un aumento en la producción. Observan además, que el CaCO_3 suspendido en el medio de cultivo, acrecienta el rendimiento.

En 1944, Cochill, R.D. comunica en (14) un hecho de extraordinaria importancia en la producción de penicilina. Encuentra que añadiendo a los medios de cultivo corn steep liquor (CSL), se produce un incremento enorme en la producción de penicilina.

El problema de obtener medios de cultivo donde se aumente el rendimiento era y sigue siendo estudiado en todos los laboratorios que se ocupan del tema.

Así, Cook y colaboradores publican una serie de trabajos, (18), (31), (32), (33), (34), (48), (50) y (57), donde estudian la activación en la producción de penicilina por distintos

extractos, estudian las distintas fracciones, la subatitución del CSL por extractos de arvejas, pero aunque obtienen buenos rendimientos, en ningún caso éstos superan a los obtenidos con CSL .

Coghill, R.D. y el grupo de investigadores del Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, USA, continúan estudiando el problema.

Resultados de gran importancia se infieren de estos trabajos. En ellos (39) y (40) describen la producción de penicilina en cultivo superficial y sumergido respectivamente.

En el (3), describen la producción en cultivo superficial, y estudian la influencia de diferentes fuentes de C en la producción, encontrando que la lactosa y el almidón son las más utilizadas como fuente de energía en la biosíntesis de la penicilina. La adición de CSL en determinadas concentraciones (entre 7.4-12,5 %) produce el rendimiento máximo de penicilina, habiendo aumentado la potencia de los caldos de 2 a 200 unidades por CC.

En una publicación posterior (40) introducen el cultivo sumergido y agitado para la producción de este antibiótico en el laboratorio. Estudian la influencia de la lactosa y el almidón en la producción y encuentran, en este caso también que la lactosa es superior al almidón y atribuyen la diferencia a la mayor lentitud en el proceso de hidrólisis del almidón. La lactosa es también superior a la glicerina y a la glucosa y quizás la razón sea que éstas últimas son consumidas por el hongo en su desarrollo, no dando tiempo a su utilización en la biosíntesis de la penicilina.

Parece ser, que para la producción de penicilina, sea menester un hidrato de carbono lentamente asimilable y este papel

parece desempeñarlo la lactosa. En estas condiciones experimentales, la producción óptima se logra con la mitad de las concentraciones que en el cultivo en superficie.

En una detallada publicación,(53), Bowden, J.P. y Peterson, W.H., la influencia del CSL en la producción de penicilina. Ensayan materiales naturales de los más diversos orígenes-hidrolizado de caseína harina de pescado, extracto de levadura, tejido de tubérculo de papa, leche en polvo, harina de soja, extracto de papa, hígado solubilizado, caseína, harina de carne, no encontrando ninguno superior al CSL.

Estudian también extractos de maíz, hechos en distintas condiciones experimentales, fermentan macerados con levadura en condiciones adecuadas de aereación encontrando en este caso, un aumento del 20% respecto de los macerados no fermentados. La adición de células de levadura al 1% sin fermentación parece aumentar la potencia de los macerados en un 10%.

Respecto del CSL diremos que es un extracto acuoso de los sólidos del maíz extraídos en un medio de pH cercano a 4 y con una concentración de SO₂ de 0.0-0.2 % y a temperatura de 48-50°C sufriendo al mismo tiempo una intensa fermentación láctica.

Liggett, R.W y Koffler, H. (54) definen al CSL como un concentrado de los sólidos solubles del maíz que ha sido extraído durante el proceso de "steeping" a pH 4 y a una temperatura de 45-52°C en presencia de SO₂ y de una fermentación láctica activa".

Moyer, A.J. y Coghill, R.D. (39) dicen: "El CSL es un subproducto de la industria del almidón. Antes de que el grano sea molido, se macera durante 30 horas más o menos en agua conteniendo originariamente de 0.1- 0.3 % de SO₂. El agua ha lavado previamente el almidón y pasa a través del tanque de depósito del gluten. El agrega -

do de SO₂, al tiempo de comenzar la maceración, inhibe la fermentación. Antes de la concentración se produce una fermentación láctica en grado variable. Hay una variación considerable en el contenido de azúcar y de ácido láctico".

Bowden J.P. y Peterson W.H. (53) ,lo describen como el extracto acuoso obtenido en la manufactura industrial del almidón, gluten y otros productos del maíz. Se concentra habitualmente hasta una concentración de un 50 % aproximadamente y es muy empleado en la manufactura de productos alimenticios comerciales".

El descubrimiento de Moyer y Coghill abre un nuevo derrotero en las investigaciones acerca de la producción de la penicilina.

Cuál es la sustancia que hay en el CSL que incrementa la producción de penicilina ?

En diversos sentidos se orientan ahora, las investigaciones.

Cardinal, E.V. y Hedrick, L.R. (67) estudian el contenido en amino-ácidos del CSL por el método microbiológico.

Knight, S.G. y Frazier, W.C. (30) describen los efectos de las cenizas del CSL en la producción.

Coghill y colaboradores (39) estudian la influencia de diversos metales en cantidades catalíticas, de distintos aminoácidos- glicina, tirosina, alanina, metionina, triptofano, valina, prolina, histidina, fenilalanina, y beta-alanina-, de diversos factores de crecimiento ácido pimélico, ácido nicotínico, tiamina, inositol, piridoxina, pantotenoato de sodio, biotina y p-aminobenzoico- y no encuentran en ningún caso a ninguna de las sustancias mencionadas como responsables de incrementar la producción de penicilina.

Trataron de aislar la fracción activa, fraccionando el CSL por membrana de colodión. La fracción dializable, después de concentrada se encontró que era tan buena como el CSL no dializado para el desarrollo y la producción.

Una extracción prolongada a pH 5.0 con n-butanol o eter etílico parece extraer algo que añadido al medio standard en vez de CSL, aumenta algo la producción.

Añadiendo volúmenes grandes de acetona o de alcohol etílico al CSL se obtienen copiosos precipitados y en términos generales, se puede decir, que a mayor precipitación, menor actividad hay en el filtrado. Sin embargo, no ha sido posible obtener ninguna fracción que contenga el principio activo.

Siendo el CSL muy rico en sustancias nitrogenadas se utilizaron otras fuentes de nitrógeno tales como harina de soja, harina de pescado y papilla de maíz entero, pero sólo produjeron aumentos pequeños en la producción.

Es tan vasta la producción bibliográfica en este tema que por razones de tiempo y de espacio no se pueden consignar aquí. En la bibliografía del presente trabajo se citan solamente los trabajos que hemos logrado conocer, sin pretender bajo ningún punto de vista haber agotado el tema.

2.- Métodos experimentales de laboratorio y de escala semi-industrial

Desde el punto de vista de sus caracteres de cultivo el *Penicillium chrysogenum* puede ser desarrollado en dos tipos de cultivo.

El cultivo en superficie desarrolla el hongo en la superficie de capas delgadas de medio de cultivo líquido. El hongo consume en su metabolismo los nutrientes - que encuentra en la superficie del medio, que por un proceso de difusión se van renovando; hasta producir el agotamiento del medio - y O₂ del aire.

En realidad, el método de cultivo en superficie en la actualidad, sólo tiene interés histórico, pues ha sido sustituido definitivamente por el cultivo sumergido y agitado.

Todos los trabajos realizados desde el original de Fleming (1) hasta el (39) de Moyer y Coghill, utilizan en la producción de penicilina el método de cultivo en superficie.

Es, en la comunicación que hace el grupo de investigadores de Oxford (6), donde se describe explícitamente el primer método de producción en escala semi-industrial de penicilina, con cultivo agitado. Llegan a obtener unos 500 litros de caldo fermentado por semana, utilizando unos recipientes de poca altura dispuestos en una mesa especial que permite la renovación continua de medio de cultivo por un sistema de succión.

Moyer y Coghill en (39) describen la producción en escala de laboratorio, utilizando como recipientes, Erlenmeyers de 200 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio nutritivo. Los frascos se sembraban con esporas secas e incubados durante varios

días a 24 ° C. Es en este trabajo donde, estos investigadores describen explícitamente el uso del CSL en la producción de penicilina.

El medio de cultivo empleado tiene la siguiente composición:

CSL	100.00	gr.
Lactosa monohidrato	44.00	gr.
Glucosa monohidrato	2.75	gr.
NaNO3	3.00	gr.
KH2PO4	0.500	gr.
MgSO4.7H2O	0.250	gr.
ZnSO4.7H2O	0.044	gr.
MnSO4.4H2O	0.250	gr.
H2O destilada	1000.00	gr.
PH inicial 4.6		

En escala industrial, varía solamente la calidad, la cantidad y la capacidad de los recipientes.

Se usaron botellas de leche, frascos cónicos especiales contruidos para tal fin. El uso de botellas de leche simplificaba el problema del lavado, puesto que había máquinas de lavado en todas partes.

En cada botella se ponía una capa de medio de cultivo de espesor variable entre 1-4 cm. Los frascos, una vez esterilizados, eran enfriados y sembrados con suspensiones de esporas, o esporas secas mediante un pulverizador.

Las botellas se incubaban a 24° C. durante 5 a 8 días en los E.E.U.U. y durante 8 a 11 días en Inglaterra.

El cultivo sumergido desarrolla el hongo dentro del medio de cultivo. El hecho de agitar y aerar el frasco, durante la fermentación hace que las partículas se agiten en forma helicoidal, desarrollando en grumos.

Moyer y Coghill en (40), describen con todo detalle, las primeras experiencias realizadas en este tipo de cultivo.

El hongo se cultiva en Erlenmeyers de 300 cc. de capa-

idad que contienen 125 cc por frasco, esterilizándose el medio durante 20 minutos a 120 C°. La inoculación se efectúa con una suspensión de esporas del hongo o con esporas secas, previo añadido a cada frasco de 1.2 a 1.5 gr. de CaCO₃ estéril. Probaron un nuevo tipo de inóculo, que consistía en sembrar esporas en un medio formado por las sales standard, 30.0gr de lactosa y 55 ml de CSL. Este medio se distribuye en Erlemeyer de 300 cc de capacidad, a razón de 125 cc de medio de cultivo y se agita durante 2 o 3 días en el aparato de Ross-Kershaw. En la inoculación de los frascos, se utilizan de 5-7.5 cc del cultivo preparado en esa forma.

Estudian la influencia de la lactosa en los rendimientos y encuentran que con una concentración de lactosa de 3 % produce máximo de potencia (80 Un/cc) después de 6 días de incubación.

La concentración optima de CSL fué de 4 % a los 6 días de incubación. Ese 4 % de CSL, significa una cantidad tal de CSL- que es un concentrado de los sólidos de maíz de alrededor de 50-55% que en el medio de cultivo final hayan 4 gr de sólidos del maíz por 100 ml de medio de cultivo calculados en base a la concentración del CSL empleado.

En escala semi-industrial, Stefaniak y sus colaboradores describen con exactitud y prolijidad (55) una planta piloto de producción de penicilina.

El diseño y manejo de la planta está descripto con todo detalle en el trabajo citado.

Los tanques de fermentación tienen una capacidad de 100 galones.

El inóculo se prepara sembrando en placas con esporas conservadas en tierra y se incuban durante 4 días a 23° C.

Después del período de incubación, las placas se conservan en la heladera hasta el momento del uso. Una suspensión acuosa de las esporas de una caja, alcanza para inocular 2 frascos agitados, que contengan 100 ml de medio (tabla 1). Mientras, el medio 2 se esteriliza en el tanque-inóculo.

Table 1.- MEDIOS USADOS EN LAS FERMENTACIONES. CONCENTRACIONES EN GR/Lt.

SUBSTANCIAS	MEDIO I	MEDIO II	MEDIO III	MEDIO IV
Dextrina	60
Glucosa	40
Lactosa	30	20
Sólidos del CSL ..	20	20	40	20
Nitrato de sodio	3	3
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0.125	0.125
CaCO ₃	5.0	. . 10. .	1.8

Después de incubado el inóculo durante 24 horas a 23° C su contenido es transferido al tanque inóculo.

Este segundo inóculo, se incuba durante 36 horas a 23° C con una aereación de 100 litros por minuto. A las 36 horas el desarrollo es espeso y tiene la consistencia de la pulpa de papel. Generalmente, 50 % de la glucosa del inóculo se ha fermentado. 20 litros de este inóculo se insuflan a un tanque medidor y luego, se pasan al fermentador.

Una vez limpios los fermentadores, el agente antiespumante se esteriliza durante 4 horas. El medio 3, detallado en la tabla 1 es el empleado en la fermentación propiamente dicha.

La técnica de preparación del medio de cultivo es la siguiente:

A un tanque vacío y limpio, se le añaden los componentes sólidos necesarios para preparar 200 litros de medio de cultivo, se agregan 150 litros de agua y los 50 restantes son provistos por la condensación del vapor de agua producido en la esterilización.

Durante la esterilización, enfriamiento y fermentación, los agitadores funcionan continuamente.

Cuando el medio de cultivo se ha enfriado a la temperatura de incubación, se procede a la siembra.

La siembra se efectúa insuflando en el fermentador, 20 litros del inóculo preparado anteriormente. La aereación comienza de inmediato. Durante las 6 primeras horas, a una velocidad de 60 litros por minuto y luego, a razón de 200 litros por minuto. El sistema antiespumante automático se hace funcionar a las 6 horas de comenzada la fermentación.

El agente antiespumante empleado es una solución al 3 % de octadecanol en aceite de lardo.

Durante toda la operación, se toman muestras a distintos tiempos. Se analiza el contenido en penicilina, pH, azúcar total y nitrógeno amoniacal. Se controla el contenido en CO₂ del aire que sale de los fermentadores.

Después de las primeras 36 horas de comenzada la fermentación, se sacan muestras para el control de esterilidad. Este control se hace inoculando 15 ml de caldo glucosa- extracto de carne peptona, con 0.15 ml de cultivo en fermentación. El tubo inoculado se incuba a 30° C y se observa a las 48 horas. Los resultados positivos son visibles a las 12 horas.

La influencia de la aereación en la evolución de la fermentación se puede ver en los gráficos del mencionado trabajo.

3.- El uso del disco de agar en la elección de la cepa.

El uso del disco de agar en la elección de la cepa ha sido empleado por distintos investigadores.

Aparece en el *Journal of Bacteriology*, 47,308 (1944), un trabajo de Waksman y Reilly donde describen un método de elección de cepas de *P. chrysogenum* desde el punto de vista de la capacidad de producción de penicilina.

Desarrollan el hongo en la superficie del agar colocado en tubos de ensayo de condiciones especificadas. El agar se deja solidificar en posición vertical. Se siembra en la superficie y se seca la columna de agar de 7 mm de diámetro. Estos se colocan sobre la superficie de agar- *Staphylococcus aureus* y se leen las inhibiciones producidas después de 16 horas de incubación a 37° C.

De acuerdo a los resultados anteriores, se pueden comparar cepas de diferentes capacidad de producción y hacer una estimación aproximada, comparando con inhibiciones producidas por cantidades conocidas de penicilina, de la cantidad de penicilina producida por el hongo. Además, se puede estudiar con este método el fenómeno de difusión en el agar.

A título ilustrativo, se pueden leer más abajo la tabla de valores que publica Waksman en el trabajo de referencia.

Nº cepa	Incubación días	Parte superior de la columna	Parte central de la columna	Final de la columna.
41	3	33.6	0	0
	7	36.3	30.0	0
	9	38.3	35.0	16.0
	14	41.5	36.5	34.0

Nº cepa	Incubación días	Parte superior de la columna	Parte central de la columna	Final de la columna
40	3	42.0	13.0	-----
	6	40.0	3.0	-----
43	3	33.8	9.0	-----
	6	36.3	23.5	-----
45	3	30.3	0.0	-----
	6	30.8	12.5	-----
47	3	40.3	14.0	-----
	6	40.3	29.8	-----
161	3	25.8	0.0	-----
	6	25.5	11.5	-----

Raper, Alexander y Coghill (28) describen un método de comparación de cepas de *S. chrysogenum* con el empleo del disco de agar, extruido del medio donde se ha desarrollado el hongo.

A cajas de Petri de condiciones especificadas, añaden 20 ml. de agar 2% fundido y a 48° C. Una vez frío, se siembra en el mismo medio del agar base, una gota de agar inoculado con esporas de la cepa a usar. Lo mismo se hace con una cepa de producción conocida, que se utiliza como testigo de comparación.

Se incuban las cajas durante 6 días a 24° C y luego, en dirección radial respecto del centro de la caja, se sacan discos de agar desde la colonia hasta el borde de la caja. Para la extracción de los discos utilizan un sacabocado Nº 2 de 5.5 mm. de diámetro. Los discos se retiran del sacabocado con una aguja de inyecciones desuntada y se colocan sobre la superficie de cajas de agar-*Staphylococcus* según Schmidt y Hoyer (1944) (29). Las cajas se incuban durante la noche a 37° C. midiéndose al término del período de incubación los halos de inhibición con aproximación de 0.5 mm.

Las cepas que producen inhibiciones menores que las ce-



pas tests, se desechan, conservándose sólo las que producen inhibiciones iguales o mayores que el testigo.

En el método que vamos a describir a continuación y que es el objeto de nuestro trabajo , utilizamos también los discos de agar sacados de la base de las cajas de producción, pero intentamos llegar a un método cuantitativo para el dosaje de penicilina ,

4.- Posibilidades que ofrece el uso de disco de agar.-

En el presente trabajo ,que tiene la pretensión de decir algo un poco nuevo, se describe un método de estimación de sustancias antibióticas, en particular, de la penicilina, en el que extrayendó discos de agar por una técnica adecuada se hace posible la valoración de la cantidad de penicilina contenida en cada disco, y por ende, la cantidad de penicilina producida en cada placa.

Siendo la penicilina una sustancia cristalina tiene capacidad de atravesar membranas y sustancias coloidales como el agar. Esta propiedad de difundir , es la base del método que vamos a describir, por otra parte, la difusión de la penicilina en agar es el fundamento de todos los métodos de estimación de penicilina en medios sólidos.

Brevemente describiremos el método que nos ocupa.

De un núcleo de difusión donde cultiva el hongo, ubicado en el centro de una caja de Petri, difunden las sustancias antibióticas producidas por el hongo, y por lo tanto, desde el centro de la caja hacia la periferia se va produciendo una caída en la concentración de la sustancia.

Extrayendo a distancias distintas del centro o núcleo de difusión cantidades iguales de agar, en las que se determina la cantidad de penicilina presente, es posible extrapolar en el gráfico correspondiente, los valores correspondientes al centro y la periferia teniendo en cuenta que la concentración es función lineal inversa de la distancia al centro de la placa.

Con una simple representación gráfica y

con la ayuda de una curva standard, se puede calcular por un método sencillo la cantidad de antibiótico producida por el hongo en esas condiciones experimentales.

Con este método se hace posible el estudio de dos problemas importantes en la producción de penicilina.

El primero es el de la selección de cepas de *P. chrysogenum*, desde el punto de vista de su capacidad de producción de penicilina.

El segundo es el de la selección de los medios de cultivo.

III.- Estudio de las condiciones en que se puede aplicar el método propuesto.

Este método es de muy sencilla aplicación, siempre que se respeten las condiciones fijadas, para poder apreciar los resultados en forma correcta.

Ante todo, las cajas de Petri, deben ser de condiciones especificadas y todas iguales.

Nosotros usamos cajas de Petri de vidrio Pyrex USA de 90x15 mm de fondo absolutamente plano. La selección de los fondos fue realizada con sumo cuidado, eligiéndose las que cumplieran esta condición entre 200 cajas de Petri.

El medio de cultivo debe agregarse a las cajas sobre una mesa absolutamente plana, pues así el agar al solidificar tiene igual espesor en todas sus partes. La mesa absolutamente plana se logró, nivelando un trozo de cristal de 0,5 cm de espesor. La nivelación fue realizada con un nivel de burbuja.

Un problema serio en la realización de nuestro trabajo fue el de la esterilización del ambiente del laboratorio.

El laboratorio donde fueron realizadas estas experiencias es de construcción muy antigua. Sus paredes sumamente altas y sus techos abovedados hacen que la limpieza sea efectuada en pocas oportunidades al año y cuando esto sucede, nunca es hecho con las exigencias de un laboratorio de bacteriología. La gran cantidad de personas que debían trabajar simultáneamente en él, ocasionaba por su movimiento corrientes de aire. Muchas horas de labor intensa fueron malogradas por contaminación de las placas. El problema fue resuelto en la mejor forma posible instalando encima del lugar del trabajo, una lámpara de rayos ultravioletas y fumigando

un líquido esterilizante antes de comenzar el trabajo. La luz ultravioleta se encendía 30 a 60 minutos antes de comenzar el trabajo, continuando encendida durante el mismo. La fumigación se efectuaba con un pulverizador de vidrio. El líquido esterilizante empleado era una mezcla de alcohol, timol y propilenglicol.

En el mismo centro del agar solidificado en las cajas de Petri, se hace caer un anillo de acero inoxidable, con uno de sus bordes biselados, para obtener un cierre hermético sobre la superficie del agar.

Los anillos deben ser todos iguales y para tal fin son construídos a partir del mismo tubo de acero.

Los medios de cultivo se vertieron a la caja siempre a la misma temperatura, para asegurar una mayor uniformidad de las condiciones experimentales.

El inóculo fue preparado a partir de micelio proveniente de germinación de esporas, por centrifugación y posterior lavado con agua destilada estéril, tratando en lo posible de proceder siempre en la misma forma. (Ver página 31)

Dentro de variaciones no controlables, las experiencias fueron realizadas siempre en la mejor forma posible y las técnicas respetadas en toda su integridad.

IV- Material y métodos.

1.- Material. Su descripción y preparación.-

Cajas de Petri.- Calidad: Vidrio PYREX USA; dimensiones: 90 x 15 mm/;
Condición: fondo absolutamente plano.

Anillos.- Calidad: Acero inoxidable; dimensiones: 11.0mm de diámetro
0.6 mm de espesor 10.6 mm de altura.

Sacudiscos.- Calidad: Vidrio Pyrex. Ver descripción lamina nº 1

Lavado.- Todo el material de vidrio y acero se lavaba con agua jabonosa hirviendo durante media hora y luego se enjuagaba con agua corriente.

Una vez escurrido y seco, se preparaba en forma habitual, para ser esterilizado.

Las pipetas exactas, después de lavadas, se colocaban en mezcla sulfocrómica durante varias horas. Nuevamente se las enjuagaba con agua corriente y luego, con agua destilada. Los anillos se retiran de las cajas de producción con una pinza y con la ayuda de una varilla se saca el trozo de agar con micelio. Los anillos una vez lavados y secos, se colocan apoyándolos sobre el lado del bisel en una caja de Petri, esterilizándolos en estufa durante una hora a 180° C.

Esterilización.-

En la envoltura del material para la esterilización se utilizó papel de diario por no disponer de papel blanco

La esterilización de los medios de cultivo se efectuó en autoclave a 120° C durante 20 minutos.

La esterilización del material de vidrio, en estufa a 180° C durante 1 hora.

2.- Medios de cultivo y soluciones.-

Medios de cultivo líquidos .-

Las sustancias sólidas se pesan en un vaso de precipitados y se disuelven en una pequeña cantidad de agua destilada hirviente, tomada del volumen total del medio que se va a preparar. Luego, se agrega esta solución concentrada al resto del agua y se ajusta el pH. Una vez ajustado el pH, se procede a su distribución en los recipientes necesarios.

En el caso de medios de cultivo con diversas sustancias, conviene tener soluciones concentradas de las mismas y en el momento del uso diluirlas a la concentración requerida.

Las soluciones minerales no presentan dificultades en cuanto a su conservación, por cuanto es muy útil tenerlas concentradas, pero las orgánicas-ácidas, azúcares, etc.-presentan el inconveniente de contaminarse con hongos, por cuanto, si se desea preparar soluciones concentradas deben conservarse con una pequeña cantidad de toluol o cloroformo que inhiba el desarrollo de gérmenes.

En general, las sustancias orgánicas conviene pesarlas cada vez. En el caso de necesitarse un volumen grande de solución a distribuir en distintos recipientes, en el momento del uso se prepara la solución de cada sustancia y se distribuye.

Medios de cultivo sólidos.-

El medio líquido se prepara como hemos indicado anteriormente. Se le agrega 2% agar en rama, se calienta en el autoclave durante 20 minutos a 120° C y se filtra. En el caso de medios con algún componente insoluble o algún precipitado en suspensión, no

deben filtrarse, estando por lo tanto, después de la primera esterilización apto para el uso.

Ajuste del pH.-

Según el caso, el pH puede ajustarse con el potenciómetro o simplemente con la ayuda de los indicadores de Clark y Lubs. Para ajustar el pH electrométricamente se usó un potenciómetro Thermotren con electrodo de cido.

Para ajustar el pH con indicadores, en un tubo de ensayo se colocan 10 cc de medio de cultivo, a temperatura ambiente, 0.5 cc de solución de indicador y se agrega con una pipeta HONa N/10 hasta el pH buscado.

Conociendo el volumen gastado, se calcula la cantidad necesarias por litro y se agrega 10 veces menos de HONa N/1.

Se ajusta nuevamente el pH para controlar si la operación ha sido bien efectuada.

En general, el pH de los medios de cultivo se ajusta con ayuda de los indicadores y el de las soluciones cuyo pH debió fijarse exactamente, se hizo con ayuda del potenciómetro.

Medios de cultivo con macerados de maíz.-

El concentrado tiene generalmente una concentración de 50-55% de sólidos. En base al residuo del concentrado, determinado por evaporación en estufa de 100°C, se calcula la cantidad de macerado a utilizar por litro de medio de cultivo.

En las experiencias que describiremos a continuación designaremos con agar MA, a los medios de cultivo preparados con macerado industrial argentino y con agar MUSA, a los preparados con macerados industriales norteamericano y con agar E al preparado con macerado de maíz obtenido en el laboratorio.



con macerado de maiz obtenido en el laboratorio.

COMPOSICION DEL LOS MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.-

Agar Sabouraud Difco.-

Neopeptona	20 g
Dextrosa	80 g
Agar	30 g
Agua destilada	1 lt

Agar e tracto de carne-extracto de levadura Difco(YBA).

Extracto de carne	1.5 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona	6.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 lt

pH 6.6.

Caldo Penassay.-

Extracto de carne	1.5 g
Extracto de levadura	1.5 g
Peptona	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
CLNa	3.5 g
PO ₄ HK ₂	3.68g
PO ₄ H ₂ K	1.32g

pH 7.0

Agar MAJ MUSA Y E.-

Con la base del medio de Moyar y Coghill publicado en 1947 (77) y el agregado de fenilacetamida se prepararon los medios de cultivo para los ensayos de producción.

Lactosa	27.5 g
Glucosa	3.0 g
CO ₃ Ca	5.0 g
SO ₄ Mg.7 H ₂ O	0.25 g
NO ₃ Na	3.0 g
Fenilacetamida	2.0 g
PO ₄ H ₂ K	0.5 g
SO ₄ zn.7 H ₂ O	0.04g
Macerado de maiz	40.00 g del de 50%.
SO ₄ Mn	0.20 g

Agar en forma 20.00 g
 Agua destilada 1000.00 ml
 pH 6.0 antes de agregar el CO_3Ca y el agar.

Buffer de fosfatos pH 6.0

$PO_4HNa_2 \cdot 2 H_2O$ 4.3 g
 PO_4H_2K 11.98 g
 Agua destilada 1000.00 ml

pH 6.0 con $HONa$ N/10

Granitos de centeno para el inóculo.-

Se preparan por esterilización en frascos de Erlenmeyer con el agregado de CO_3Ca .

Tubos de talco para conservar las esporas de los Penicillium.-

En tubos de ensayo de vidrio Pyrex Industria Argentina, de 100 x 12 mm. se coloca un poco de talco y se esteriliza durante una hora a 180° C., poniéndolos a enfriar en un desecador de vacío con Cl_2Ca donde se conservan hasta el momento del uso.

Soluciones de penicilina standard de 1500 Un/mg.-

La solución de penicilina standard que se usó en estas experiencias fue cedida por los laboratorios de E. R. Squibb & Sons, Argentina Ltda. (Martínez, Provincia de Buenos Aires).

En un tubo estéril y seco, se pesa una pequeña cantidad de penicilina standard (más o menos 0.05 g) con aproximación del 1/10 mg.

Se hace una solución madre de penicilina en buffer pH 6.0 de 10.000 Un/ml.

Diluciones.-

A partir de la solución madre (1), se preparan soluciones de concentración decreciente.

(1)	10.000 Un/ml	
(2)	5.000	"
(3)	3.000	"
(4)	2.000	"
(5)	1.000	"
(6)	100	"
(7)	10	"
(8)	1	"

3.- Métodos.-

a.- Técnica de preparación de las cajas de agar macerado de maíz para la curva standard.

Material.

- 1.- Cajas de Petr. de condiciones especificadas.
- 2.- Pipeta de 25 ml.
- 3.- Pipetas de 1 ml.
- 4.- Agar macerado de maíz fundido y a 48° C.

Técnica propiamente dicha.

- a.- Se colocan las cajas sobre la plataforma horizontal.
- b.- Se las numera igual a que las soluciones de penicilina.
- c.- A la caja (1) se le agrega 1 ml. de solución (1) y así sucesivamente.
- d.- Sobre el ml de solución, se agrega lentamente 11 ml de agar (M.), moviendo la caja en distintas direcciones, asegurándose así una distribución uniforme de la penicilina.
- e.- Se deja solidificar bien a temperatura ambiente y luego se guarda en la heladera durante media hora.

b.- Técnica de preparación de las cajas de producción de penicilina.-

En nuestras experiencias hemos usado dos tipos de cajas de producción. En unas usamos como inóculo, una suspensión en agua, de esporas desarrolladas sobre granitos de centeno. En las otras, una suspensión de micelio de cultivo sumergido y agitado en agua destilada estéril.

A las primeras las designamos en lo sucesivo cajas I.

Las segundas, cajas II.

L.- Preparación de las cajas L.-

a.- Preparación del inóculo.-

Material.-

- 1.- Esporas desarrolladas sobre granitos de centeno.
- 2.- Agua destilada estéril.
- 3.- Tubos de ensayo comunes estériles y marcados con el nombre de cada cepa.
- 4.- Agar NA fundido y a 48-50° C.
- 5.- Una pipeta de 1 ml.
- 6.- Una pipeta de 10 ml para cada cepa.
- 7.- Una espátula flameada y fría.

Técnica.-

- a.- Con pipeta de 1 ml se distribuye 0.5 ml de agua destilada estéril en tantos tubos como cepas haya.
- b.- Con la espátula se toman 10 granitos de centeno y se pasan al tubo anterior.
- c.- Se agita el tubo para desprender la mayor cantidad de esporas posibles, obteniéndose una suspensión bastante espesa.
- d.- Se añade 9.5 ml de agar NA fundido y a 48-50° C, homogeneizándose por repetidas aspiraciones el contenido del mismo. Este inóculo debe utilizarse inmediatamente de preparado.

b.- Preparación de las cajas.-

Material.-

- 1.- 6 cajas para cada cepa.
- 2.- 6 anillos de acero inoxidable para cada cepa.
- 3.- 3 ó 4 pipetas de 25 ml exactas.
- 4.- 2 pipetas de 1 ml para cada cepa.

- 5.- 90 cc de agar MA para cada copa.
- 6.- Una pinza flameada y fría
- 7.- Molde N° 1.

Técnica,-

- a.- Se colocan las cajas sobre una plataforma horizontal.
- b.- A cada una se agrega 12 cc de agar MA exactamente medidos.
- c.- Con la ayuda del molde N° 1 se marca el centro de la caja.
- d.- Con la pinza se deposita suavemente sobre la superficie del agar, una anillo de acero inoxidable apoyándolo del lado del bisel.
- e.- Con una pipeta de 1 ml, se vierten dentro del anillo 0.3 ml del agar fundido y a 48° C exactamente medidos. Se deja solidificar.
- f.- Con una pipeta de 1 ml se agragan sobre el agar recientemente colocado dentro del anillo 0.3 ml del inóculo.
- g.- Una vez frío el agar, se incuban las cajas a 28° C, por ser ésta temperatura óptima para el desarrollo del hongo, durante 3, 4 y 5 días. Después de estos períodos de incubación se procede a la toma de muestra, en la forma que más adelante se detallará.

II.- Preparación de las cajas II.-

a.- Preparación del inóculo.-

Unos 18- 20 ml de cultivo de Penicillium de los germinadores de producción de penicilina, se centrifugan durante 10 minutos. Se vuelca el sobrenadante y el precipitado se suspende en 8 - 10 ml de agua destilada estéril. Se repite esta operación 3 veces. La suspensión final se conserva en la heladera hasta el momento del uso, que nunca será mayor de 2 a 3 horas.

Material.-

- 1.- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm de vidrio Pyrex Ind. Arg.
- 2.- Agar MA fundido y a 48-50° C.
- 3.- Pipetas de 1 ml.
- 4.- Un vaso de precipitados de 100 ml con agua caliente a 60° C.
- 5.- Suspensión de micelio.

Técnica.-

- a.- Con pipeta de 1 ml se distribuye en los tubos de ensayo 1.8 ml de agar MA fundido.
- b.- Los tubos se mantienen dentro del vaso de precipitados.
- c.- Con pipeta de 1 ml, se agrega a los tubos anteriores 0.2 ml. Este inóculo debe usarse enseguida de preparado.

b.- Preparación de las cajas.-

Material.-

- 1.- De 4-6 cajas para cada medio de cultivo distinto.
El n° de cajas a usar depende del n° de medios de cultivo.
- 2.- Tantos anillos como cajas se usan.
- 3.- Una pipeta de 25 ml para cada medio de cultivo.
- 4.- Una pinza flameada y fría.
- 5.- Dos pipetas de 1 ml para cada medio de cultivo.
- 6.- Inóculo.

Técnica.-

- a.- Se colocan las cajas sobre la plataforma horizontal.
- b.- Se marcan en la siguiente forma:
Arriba a la izquierda: el nombre del medio de cultivo.
Por ejemplo: E₁. Significa Extracto n° 1.
Abajo a la izquierda: el n° de la caja, indicándolo con N°s. romanos.
Por ejemplo: Primer caja de la serie: I.

Abajo a la derecha: Fecha.

- c.- En cada caja de cada serie, se colocan 12 ml de medio de cultivo correspondiente, exactamente medidos.
- d.- Una vez solidificado el agar, se marca por la parte de atrás el mismo centro, con ayuda del molde n° 1.
- e.- Sobre la superficie del agar se deposita con sumo cuidado de no romper el agar, un anillo depositándolo del lado del bisel.
- f.- Dentro del anillo se escurren 0,3 ml de medio de cultivo fundido y se deja solidificar.
- g.- Sobre esta basecita que se ha formado dentro del anillo se escurren 0,6 ml del inóculo recientemente preparado.
- h.- Se incuban las cajas a 28° C, tomándose muestras a las 72, 96 y 120 horas.

....

Conservación de las esporas en talco.-

Se utilizan los tubos de talco descritos anteriormente y un cultivo de la cepa de penicillium en agar Sabouraud de 96 horas a 28° C. Las esporas son desprendidas mecánicamente por una espátula o ansa y luego se incorporan al talco mezclando bien. Se tapa con tapón estéril de caucho.

Obtención de esporas sobre centeno.-

Se agrega al centeno esterilizado en un frasco preparado como se menciona anteriormente una suspensión muy espesa de esporas de la cepa de Penicillium usando una solución de CINA con un detergente. Se cultiva por 4 días a 27° C.

....

c.- Técnica de preparación de las cajas de agar-Staphylococcus.

1.- Suspensión standard de St. aureus 209 P FDA.

a.- De un cultivo conservado a 0° C, se hace una estría en YBA

y se incuba durante 16 horas a 37° C.

b.- Se pasa un ansa cargada con el cultivo anterior a un tubo con 20 ml de caldo Penassay, incubándose durante 6h a 37°C.

c.- Se inoculan 200 ml de caldo Penassay y con 1 ml del cultivo en caldo preparado recién. Se incuba durante 16 horas a 37°C. Se conserva en la heladera hasta el momento del uso. Se puede utilizar hasta una semana después de su preparación. Después de este tiempo, el cultivo comienza a aglutinarse produciéndose, por lo tanto, una distribución no homogénea de las células provocando por lo tanto un desarrollo discontinuo.

2.- Preparación de las cajas.-

a.- Se colocan las cajas en la plataforma horizontal.

b.- A cada una se le agreg 10 ml de YB fundido y medido a 48-50°C.

c.- Se deja solidificar a temperatura ambiente.

d.- En un Erlenmeyer que contiene YBA fundido y medido a 48-50°C se añade suspensión standard de St. aureus al 4%.

e.- Con pipeta de 25 ml. se escurre sobre la superficie de las bases agar, 4 ml del agar inoculado moviéndolo en varias direcciones de modo de cubrir bien la superficie del agar.

f.- Se dejan enfriar y si no se usan a seguida se guardan en la heladera hasta el momento del uso, que nunca excede una a una hora y media.

d.- Construcción de la curva standard.-

Las cajas preparadas en 3.- a.- son las que sirven para la construcción de la curva standard.

Material.-

1.- Cajas de agar MA-penicilina.

2.- Sacadiscos esterilizado por ebullición.

- 3.- Cajas de agar-Staphylococcus aureus.
- 4.- Una caja con papeles de filtro estériles.
- 5.- Molde Nº 2.

Técnica.-

- a.- Se marcan las cajas de agar-Staphylococcus aureus con las concentraciones de penicilina.
- b.- De cada caja y de distintas posiciones se sacan 5 discos de agar con ayuda del sacadiscos estéril y seco (pág.72), colocándolos uno a uno suavemente sobre la superficie del agar-Staphylococcus.
En el caso de las concentraciones mayores de 100 unidades se colocan sólo 3 discos en cada caja.
- c.- Las cajas se incuban 16 horas a 37 °C.
- d.- Transcurrido el período de incubación, se retiran de la estufa y se leen los halos de inhibición con ayuda de una regla con aproximación de 0.5 mm.

a.- Trazado de la curva standard.-

- a.- Los diámetros de los halos obtenidos para cada concentración de penicilina se anotan en una tabla de valores y se promedian los halos para cada concentración y para cada tiempo de incubación.
- b.- Con los valores promedios y las concentraciones se traza una curva standard, en papel semi-logarítmico, que en nuestro caso, resultó ser una recta. En el eje de abscisas se representan los halos de inhibición y en el eje de ordenadas las concentraciones de penicilina por caja (Gráfico II).

f.- Medida de la cantidad de penicilina producida en cada caja.

Las cajas I y II son las que interesan en este caso.

Material.-

- 1.- Cajas I y II.
- 2.- Molde I.
- 3.- Sacadiscos esterilizado.
- 4.- Una caja con papeles de filtro estériles.
- 5.- Dos cajas de agar Staphylococcus por cada caja de producción.

Técnica.-

a.- Se marcan las cajas de agar Staphylococcus en la siguiente forma:

Arriba a la izquierda: nombre del cultivo o medio de cultivo

Abajo a la izquierda: Muestras extraídas de la caja N° posición M.

N° I, II, etc. M: A o B

A o B son posiciones radialmente opuestas respecto del centro de difusión como se puese observar en la lámina N° 2.

Abajo a la derecha: tiempo del cultivo,

b.- Se apoya la caja sobre el molde N° 1 y se sacan los discos a los 12 , 24 y 36 mm del centro de difusión, colocándolos sobre la superficie del agar-Staphylococcus en posiciones equidistantes con ayuda del molde N° 3.

c.- Se incuban las cajas durante 16 horas a 37° C, leyándose los halos de inhibición en la forma indicada.

d.- Se promedian los valores obtenidos a iguales distancias del centro en las distintas cajas, consignando los valores en una tabla (Ver pág. 49 tabla N° 4.)

- e.- Se representa en papel milimetrado :los halos promedios, en ordenadas y en abscisas, las distancias al centro de la caja. Los 3 puntos experimentales representan una recta.
- f.- Por extrapolación se determina el halo correspondiente a los discos desde el centro de la caja hasta el borde.
- g.- En la curva standard (gráfico Nº 2), se busca la cantidad de penicilina por caja que corresponde a los distintos halos y en la tabla 1, se busca la cantidad de penicilina po disco.
- h.- La cantidad de penicilina de cada disco se multiplica por el nº de discos correspondiente al anillo circular del mismo radio del cual proviene el disco.
- i.- Se suman los valores anteriores y se obtiene la cantidad de penicilina por caja.

- - - - -

El nº de discos correspondientes a los anillos circulares de radio creciente desde el centro de la caja son los siguientes:

Radios del anillo		superficie del mismo	Nº de discos en cada anillo
0	- 6 mm	1.13 cm ²	4.0
6	- 12 mm	3.39 "	12.1
12	- 18 mm	5.65 "	20.1
18	- 24 mm	7.91 "	28.2
24	- 30 mm	10.17 "	36.3
30	- 36 mm	12.44 "	44.0
36	- 42 mm	14.70 "	52.5
42	- 45 mm	8.20 "	29.2

- - - - -

Superficie del disco: 28.0 mm² Diámetro : 0.6 cm
Superficie de la caja: -63.61 cm² Diámetro: 9.0 cm
Superficie de la caja / Superficie del disco : 227 .
Nº de discos en la caja : 227.
Volumen del agar : 12 cc .

- - - - -

c.- Técnica de preparación de las cajas de difusión de penicilina.

Se usa la misma técnica que en el caso de la producción de penicilina.

La única variación es que en este caso, en vez de poner en la parte superior del anillo central 0.3 cc. de agar con esporas o micelio, ponemos 0.3 cc. de agar con penicilina disuelta en él.

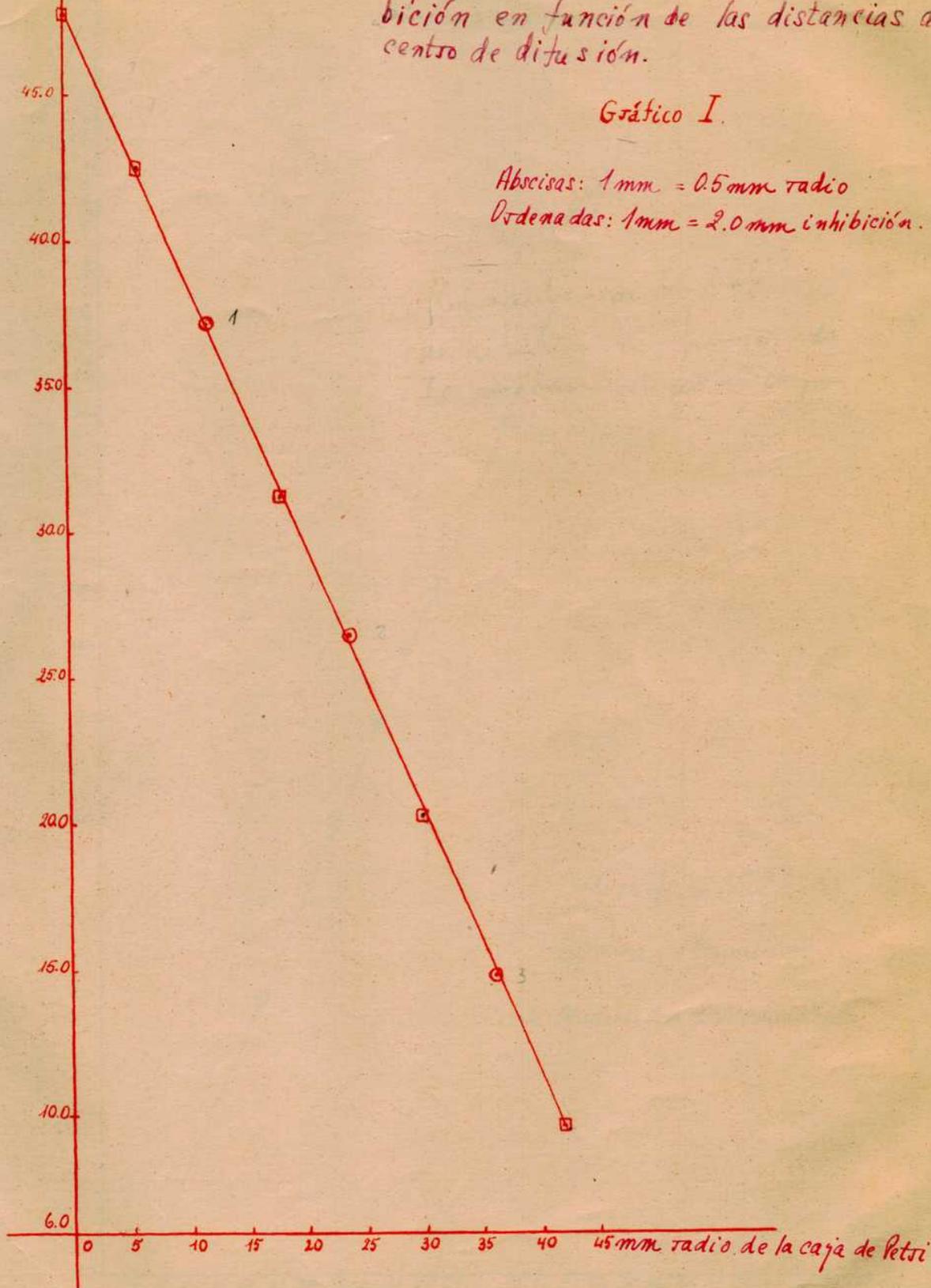
- - -

Halo de inhibición
50.0 mm

Representación de los halos de inhibición en función de las distancias al centro de difusión.

Gráfico I.

Abcisas: 1 mm = 0.5 mm radio
Ordenadas: 1 mm = 2.0 mm inhibición.



Representación de las unid. penicilina/caja en función de los halos de inhibición expresados en milímetros.

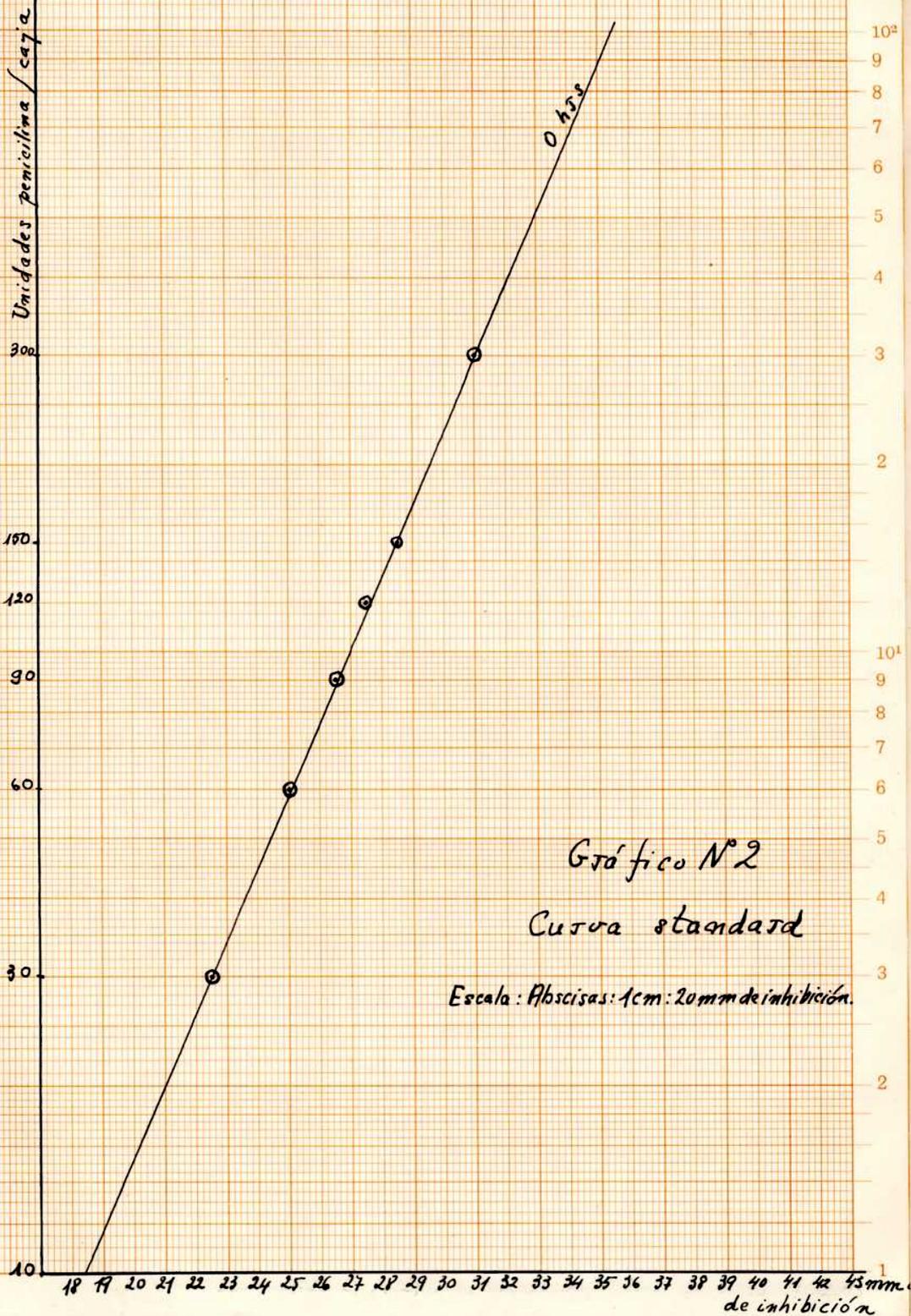


Gráfico N° 2

Curva standard

Escala: Abscisas: 1cm: 20mm de inhibición.

Relación entre las Unidades/caja y las Unidades/disco.

Un/ caja	Un/disco	Un/caja	Un/disco	Un/caja	Un/ disco
1	0.0043	32.5	0.142	59.5	0.260
2	0.0086	33.0	0.144	60.0	0.262
3	0.013	33.5	0.146	60.5	0.264
4	0.017	34.0	0.149	61.0	0.266
5	0.021	34.5	0.151	61.5	0.268
6	0.026	35.0	0.153	62.0	0.270
7	0.030	35.5	0.155	62.5	0.273
8	0.035	36.0	0.157	63.0	0.276
9	0.039	36.5	0.160	63.5	0.278
10	0.043	37.0	0.162	64.0	0.280
10.5	0.046	37.5	0.164	64.5	0.282
11.0	0.048	38.0	0.166	65.0	0.284
11.5	0.050	38.5	0.168	65.5	0.286
12.0	0.052	39.0	0.171	66.0	0.288
12.5	0.054	39.5	0.173	66.5	0.290
13.0	0.057	40.0	0.175	67.0	0.293
13.5	0.059	40.5	0.177	67.5	0.295
14.0	0.061	41.0	0.179	68.0	0.297
14.5	0.063	41.5	0.182	68.5	0.300
15.0	0.065	42.0	0.184	69.0	0.302
15.5	0.068	42.5	0.186	69.5	0.304
16.0	0.070	43.0	0.188	70.0	0.306
16.5	0.072	43.5	0.190	70.5	0.308
17.0	0.074	44.0	0.192	71.0	0.310
17.5	0.076	44.5	0.195	71.5	0.312
18.0	0.078	45.0	0.197	72.0	0.314
18.5	0.080	45.5	0.199	72.5	0.317
19.0	0.082	46.0	0.201	73.0	0.320
19.5	0.084	46.5	0.203	73.5	0.322
20.0	0.086	47.0	0.206	74.0	0.324
20.5	0.089	47.5	0.208	74.5	0.326
21.0	0.091	48.0	0.210	75.0	0.328
21.5	0.094	48.5	0.212	75.5	0.330
22.0	0.096	49.0	0.214	76.0	0.332
22.5	0.098	49.5	0.217	76.5	0.334
23.0	0.100	50.0	0.219	77.0	0.336
23.5	0.103	50.5	0.221	77.5	0.338
24.0	0.105	51.0	0.223	78.0	0.342
24.5	0.107	51.5	0.225	78.5	0.344
25.0	0.109	52.0	0.227	79.0	0.346
25.5	0.111	52.5	0.230	79.5	0.348
26.0	0.114	53.0	0.232	80.0	0.350
26.5	0.116	53.5	0.234	80.5	0.352
27.0	0.118	54.0	0.236	81.0	0.354
27.5	0.120	54.5	0.238	81.5	0.356
28.0	0.122	55.0	0.240	82.0	0.358
28.5	0.125	55.5	0.242	82.5	0.360
29.0	0.127	56.0	0.244	83.0	0.363
29.5	0.229	56.5	0.247	83.5	0.366

Un/ caja Un/ disco Un/ caja Un/ disco Un/ caja Un/ disco

86.0	0.576	160.0	0.700	375.0	1.674
86.5	0.578	162.5	0.711	380.0	1.655
87.0	0.580	165.0	0.722	385.0	1.688
87.5	0.582	167.5	0.733	390.0	1.710
88.0	0.584	170.0	0.744	395.0	1.731
88.5	0.586	172.5	0.755	400.0	1.754
89.0	0.590	175.0	0.766	405.0	1.775
89.5	0.592	177.5	0.777	410.0	1.798
90.0	0.594	180.0	0.788	415.0	1.820
90.5	0.596	182.5	0.799	420.0	1.842
91.0	0.598	185.0	0.810	425.0	1.865
91.5	0.600	187.5	0.821	430.0	1.887
92.0	0.602	190.0	0.832	435.0	1.907
92.5	0.604	192.5	0.843	440.0	1.929
93.0	0.607	195.0	0.854	445.0	1.950
93.5	0.610	197.5	0.865	450.0	1.972
94.0	0.612	200.0	0.876	455.0	1.995
94.5	0.614	202.5	0.887	460.0	2.018
95.0	0.616	205.0	0.898	465.0	2.040
95.5	0.618	210.0	0.921	470.0	2.060
96.0	0.620	215.0	0.943	475.0	2.082
96.5	0.622	220.0	0.964	480.0	2.104
97.0	0.624	224.0	0.986	485.0	2.123
97.5	0.628	230.0	1.009	490.0	2.148
98.0	0.632	235.0	0.030	495.0	2.167
98.5	0.632	240.0	1.052	500.0	2.192
99.0	0.634	245.0	1.074	510.0	2.238
99.5	0.636	250.0	1.096	520.0	2.280
100.0	0.638	255.0	1.117	530.0	2.324
102.5	0.649	260.0	1.140	540.0	2.368
105.0	0.660	265.0	1.162	550.0	2.412
107.5	0.671	270.0	1.184	560.0	2.456
110.0	0.682	275.0	1.206	570.0	2.500
112.5	0.693	280.0	1.228	580.0	2.544
115.0	0.504	285.0	1.250	590.0	2.588
117.5	0.515	290.0	1.272	600.0	2.630
120.0	0.526	295.0	1.294	610.0	2.674
122.5	0.535	300.0	1.315	620.0	2.720
125.0	0.546	305.0	1.337	630.0	2.762
127.5	0.557	310.0	1.360	640.0	2.806
130.0	0.568	315.0	1.381	650.0	2.850
132.5	0.579	320.0	1.403	660.0	2.896
135.0	0.590	325.0	1.425	670.0	2.940
137.5	0.601	330.0	1.448	680.0	2.982
140.0	0.612	335.0	1.470	690.0	3.024
142.5	0.623	340.0	1.491	700.0	3.064
145.0	0.634	345.0	1.512	710.0	3.110
147.5	0.645	350.0	1.532	720.0	3.156
150.0	0.656	355.0	1.555	730.0	3.200
152.5	0.667	360.0	1.578	740.0	3.242
155.0	0.678	365.0	1.600	750.0	3.268
157.5	0.689	370.0	1.621	760.0	3.332

<u>Un/ cais</u>	<u>Un/disco</u>	<u>Un/ cais</u>	<u>Un/ disco</u>	<u>Un/ cais</u>	<u>Un/ disco</u>
770.0	3.376	850.0	3.730	930.0	4.080
780.0	3.420	860.0	3.774	940.0	4.120
790.0	3.462	870.0	3.814	950.0	4.161
800.0	3.508	880.0	3.858	960.0	4.208
810.0	3.550	890.0	3.900	970.0	4.246
820.0	3.596	900.0	3.944	980.0	4.286
830.0	3.640	910.0	3.990	990.0	4.324
840.0	3.684	920.0	4.036	1000.0	4.364

V.- Resultados experimentales.

a.- Estudio de la difusión en el agar.

Mediante el método experimental descrito fué estudiado el fenómeno de la difusión de la penicilina potásica standard y de la penicilina que se va produciendo en la caja de producción.

La difusión fué estudiada en dos medios de cultivo diferentes.

El primeramente utilizado fué agar buffer pH 6.0. Posteriormente en vista de que no había destrucción en agar macerado de maíz (pág. 27), se continuaron las experiencias en este medio.

Los resultados obtenidos en estos ensayos se detallan a continuación:

Cuadro N° 2.-

Resultados de las experiencias de difusión realizadas con agar buffer de fosfatos pH 6.0

Dentro del centro de difusión se colocan cantidades decrecientes de penicilina en agar.

Tiempo de difusión	Pos. N°	Unidades / 0.3 ml						
		300	150	90	30	15	9	3
Halos expresados en mm.								
48 h	3	33.0	30.5	29.7	25.3	21.2	20.5	13.5
	5	27.0	23.5	20.7	16.5	13.5	10.1	0.0
	7	15.8	14.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0
72 h	3	33.0	30.0	28.2	24.5	21.2	20.0	13.5
	5	28.0	25.5	22.9	18.2	15.0	13.9	8.5
	7	21.0	17.0	15.5	8.0	7.0	8.0	0.0
96 h	3	34.5	----	7.7	----	----	18.5	15.5
	5	29.5	----	23.0	----	----	14.5	10.0
	7	24.0	----	19.0	----	----	8.5	0.0
120 h	3	36.5	32.0	30.0	25.0	22.0	20.0	17.0
	5	33.5	30.5	26.5	20.5	19.5	14.0	14.5
	7	26.5	27.0	21.0	17.5	13.5	11.0	14.0

Curva standard.- Cada dato es promedio de 5 determinaciones.

Tiempo de preparación	Unidades/ caja						
	750	500	300	100	50	30	10
48 h	35.4	34.5	27.9	25.0	23.9	17.5	12.7
72 h	34.6	----	27.0	26.8	24.0	19.9	18.0
96 h	----	33.4	28.6	25.1	23.6	18.2	18.8
120 h	35.7	32.0	28.0	23.7	20.1	19.9	14.6

Cálculo mediante el método de la penicilina difundida en las cajas de difusión.-

	Penicilina colocada en 0.3 ml.							
	300 Un.	150	90	30	15	9	3	
48 h	295.41 Un.	177 Un.	146 Un.	64 Un.	34 Un.	8 Un.	---	
72 h	167	" 100	52"	35 "	18 "	13	3 Un.	
96 h	310	" ----	86"	---	---	12	" 6 "	

120 hrs 624 313 182 63 38 20.1 ---

Cuadro N° 3.5

Resultados de las experiencias de difusión realizadas con agar MA (pág. 27)

Dentro del centro de difusión se colocan 0.5 ml con cantidades decrecientes de penicilina disuelta en agar.

Tiempo de difusión	Disco N°	300 / 0.3 ml	90 / 0.3 ml	30 / 0.3 ml
		HALOS	Expresados en	mm .
72 hrs	1 2 3 4 5 6 7 8	37.0	37.0	33.0
		35.0	35.0	31.0
		33.0	31.0	27.5
		31.0	29.0	24.5
		28.0	26.0	21.5
		26.0	---	19.0
		---	19.0	---
		---	---	---
96 hrs	1 2 3 4 5 6 7 8	38.5	35.0	33.5
		36.0	34.5	---
		31.5	31.5	28.0
		27.5	---	---
		25.0	25.0	21.5
		---	---	18.0
		---	20.0	17.5
		---	---	---
120 hrs	1 2 3 4 5 6 7 8	37.0	32.0	31.0
		36.0	31.0	29.5
		33.0	---	28.0
		30.0	28.0	26.5
		---	26.5	---
		---	---	23.5
		23.5	23.5	23.0
		---	---	---

Curva standard.-

Tiempo	Fecha	Unidades / caja.					
		10.000	8.500	3.000	1.000	100	10
0 hrs	30/3/51	---	43.4	40.0	38.4	29.8	17.2
0 hrs	3/4/51	43.6	---	---	37.5	29.8	18.6

0 hrs 4-IV-51	- - - -	- - - -	41.2	37.8	29.0	19.0
0 hrs 5-IV-51	- - - -	- - - -	---	37.5	28.5	21.1
72 hrs 3-IV-51	- - - -	- - - -	48.2	37.5	29.6	13.6
96 hrs 4-IV-51	- - - -	- - - -	42.0	39.1	30.3	18.2
120 hrs 5-IV-51	- - - -	- - - -	41.2	37.8	29.0	19.0

Cálculo.-

Tiempo de difusión.	300/ 0.3	90/ 0.3	30/ 0.3
72 hrs	145.5	87.72	32.24
96 hrs	85.76	44.26	21.23
120 hrs	120.0	35.30	41.74

Los cultivos designados Cálculo.- corresponden a la penicilina calculada mediante el método en experimentos de difusión realizadas con cantidades de penicilina conocida. De estos resultados se infiere que es posible comparar cantidades de penicilina, aunque no determinara cantidades absolutas.

Con estas experiencias se demuestra que la penicilina difunde desde un centro produciéndose un gradiente de concentración desde el centro hacia la periferia de la caja que se mantiene hasta las 120 hrs. La penicilina no se destruye en 5 días en el medio de cultivo con respecto al inoculante.

En todos los casos la cifra calculada es superior a la real en un 100 %. Sin embargo, se puede aplicar el método en la comparación de las respectivas actividades de distintos cepas o en el estudio de distintos medios de cultivo. Con el objeto de verificar estas posibilidades se han realizado los ensayos que a continuación se describen:

b.- La influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de penicilina.

En estas experiencias se varía la composición del medio de cultivo variando las condiciones de preparación de los extractos de maíz.

Se compararon diversos extractos, cuya nómina y composición se detallan a continuación:

EXTRACTO N°	COMPOSICION.
9	Maíz Agua Clorofórmico
11	" " " Acido láctico
12	" " " " "
13	" " " " fosfórico
14	" " Anh.sulfuroso
15(1)	" " " " Acido láctico
15 (2).	" " " " " "
M.A.	Macerado de maíz industrial (argentino).
M.U.S.A.	" " " " U.S.A.

En el capítulo de preparación de los medios de cultivo se indica la composición del medio de cultivo empleado en las experiencias, es decir, del agar extracto de maíz.

Quadro N° 4.-

Influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de penicilina.-

Inóculo preparado con micelio.-

Disco N°	Medio de cultivo	96 horas				120 horas			
		Caja N°1	2	3	4	1	2	3	4
1	E ₉	35.6	32.6	----	34.1	42.0	40.4	----	40.6
		30.2	28.6	----	30.3	37.2	35.4	----	35.4
		26.0	24.5	----	26.5	32.5	30.5	----	30.5
		21.3	20.4	----	22.8	27.4	25.5	----	25.2
		15.0	16.4	----	19.0	22.5	19.5	----	19.0
		12.8	12.3	----	15.2	17.5	15.4	----	14.8
		8.5	8.0	----	11.5	12.5	10.5	----	10.0
		----	----	----	7.6	7.5	----	----	----
1	E ₁₁	45.2	35.6	31.6	38.7	43.7	44.3	39.3	43.3
		39.3	31.0	27.7	33.0	38.7	38.9	35.0	38.4
		33.0	26.5	23.5	29.0	33.5	33.5	30.5	33.5
		26.9	22.1	19.7	25.7	28.5	28.3	26.3	28.1
		20.5	15.5	16.5	17.0	25.0	22.5	21.9	22.5
		14.3	12.8	11.0	13.7	16.0	17.6	17.6	17.8
		8.0	8.0	7.5	9.0	13.5	13.0	13.0	13.0
		----	----	----	----	8.8	8.7	7.0	8.5
1	E ₁₂	39.4	38.9	37.1	42.6	----	46.3	45.9	42.7
		34.0	34.5	32.3	37.0	----	41.4	39.8	38.8
		30.0	30.0	27.5	31.5	----	36.5	33.0	35.0
		25.4	25.9	22.3	25.7	----	31.7	27.5	31.3
		21.5	22.5	12.5	20.0	----	26.5	22.5	27.5
		16.2	17.0	12.4	14.2	----	22.0	15.2	23.6
		11.5	12.5	7.5	8.5	----	17.0	8.5	19.7
		7.0	8.0	----	----	----	12.2	----	15.8
1	E ₁₃	42.2	----	42.0	43.6	43.0	----	43.0	41.9
		37.3	----	38.1	38.0	37.3	----	38.4	37.1
		32.5	----	33.5	33.0	32.5	----	33.5	32.5
		27.6	----	28.7	27.9	27.7	----	28.9	27.5
		22.5	----	24.0	22.8	22.5	----	24.0	21.5
		17.7	----	19.3	17.9	17.9	----	19.4	17.7
		13.0	----	14.5	13.0	13.0	----	14.5	13.0
		----	----	10.0	----	8.1	----	9.9	8.0
1	E ₁₄	41.7	44.0	45.0	37.6	43.2	44.9	43.9	40.2
		36.8	38.0	39.3	32.0	38.6	40.1	39.4	35.8
		32.0	32.0	33.5	26.5	34.0	35.0	35.0	31.5
		26.8	26.6	28.0	20.6	29.5	30.6	32.1	27.0
		21.5	21.5	22.5	15.0	24.5	26.0	23.5	21.5
		17.0	15.4	17.0	9.4	20.4	21.1	21.1	18.0
		12.5	9.5	11.5	12.0	15.5	16.0	16.5	13.5
		----	----	----	----	11.2	11.5	11.9	9.1

(1) Ver pág 76 molde N° 1.

Disco N°	Medio de Cultivo	96 horas Caja N°				120 horas Caja N°			
		1	2	3	4	1	2	3	4
1	E15(1)	46.8	47.6	---	43.4	46.3	46.0	---	46.5
2		46.5	41.0	---	38.0	41.6	41.2	---	42.2
3		34.0	34.0	---	32.5	37.0	36.5	---	37.5
4		27.8	27.5	---	27.2	32.3	31.4	---	33.1
5		24.0	21.5	---	22.5	27.5	25.0	---	28.0
6		14.8	14.2	---	16.5	23.1	21.5	---	24.1
7		9.0	7.5	---	11.0	18.5	16.5	---	19.5
8		---	---	---	---	13.9	11.6	---	15.0
1	E15(2)	44.0	43.7	44.5	42.8	45.8	44.9	42.2	44.8
2		39.0	38.5	39.0	37.5	40.9	40.2	38.2	40.0
3		34.0	33.5	33.5	34.0	36.0	35.0	34.0	35.0
4		29.1	28.4	27.8	26.4	31.2	30.5	30.4	30.5
5		24.0	23.5	21.6	20.5	26.3	27.0	27.0	26.0
6		19.1	18.5	16.7	15.2	21.5	20.8	22.7	21.0
7		14.0	13.5	11.5	10.0	16.5	15.5	18.5	16.0
8		9.1	8.5	---	---	11.9	11.0	14.9	11.4
1	M.A.	45.3	48.3	47.9	49.0	45.0	44.9	44.2	47.4
2		40.1	42.7	43.3	43.0	40.6	40.5	40.6	47.6
3		35.0	37.0	39.0	37.0	36.0	36.0	37.0	37.0
4		29.8	31.7	34.3	31.1	31.9	31.8	35.5	32.7
5		24.7	27.0	30.0	25.3	27.4	27.5	30.0	28.5
6		19.6	20.6	25.5	19.6	23.0	23.0	26.4	22.8
7		14.5	15.0	21.1	14.0	18.5	18.5	22.8	17.0
8		9.1	9.6	16.8	9.4	14.2	14.2	19.2	12.9
1	M.U.S.A.	48.7	47.7	48.0	48.9	47.5	45.1	43.2	42.0
2		43.4	42.2	42.6	43.9	42.8	40.7	39.2	38.1
3		38.0	37.0	37.0	37.0	38.0	36.0	34.5	34.0
4		32.9	31.8	31.7	31.0	33.6	32.0	31.0	30.4
5		28.5	27.0	26.5	25.5	30.0	28.0	28.0	26.5
6		22.7	21.6	20.4	18.7	24.3	27.2	22.9	22.6
7		17.5	16.5	14.5	12.5	19.5	18.5	18.5	18.5
8		12.5	11.4	9.0	6.0	15.0	14.4	14.7	14.7

Cuadro N° 5.-

Hrs	Disco N°	Medio	Halo	promedio	potencia del disco	Producto
96	1 2 3 4 5 6 7 8	E ₉	34.1	0.010	10.00	
			29.7	0.280	1.25	
			25.3	0.103	2.03	
			21.5	0.0376	0.91	
			16.8	0.012	0.387	
			13.1	0.0052	0.205	
			9.2	-----	-----	
			7.6	-----	-----	
SUMA					14.782	
120	1 2 3 4 5 6 7 8	E ₁₀	41.0	11.84	146.22	
			36.0	3.508	15.68	
			31.1	1.030	20.3	
			26.0	0.502	7.50	
			20.5	0.072	2.33	
			15.9	0.0258	1.03	
			11.0	0.0078	0.38	
			7.5	-----	-----	
SUMA					193.24	
96	1 2 3 4 5 6 7 8	E ₁₁	37.7	1.272	24.35	
			32.9	0.312	2.51	
			28.0	0.186	3.66	
			23.2	0.054	1.31	
			17.3	0.0135	0.41	
			13.1	0.0048	0.18	
			8.1	-----	-----	
			-----	-----	-----	
SUMA					32.68	
120	1 2 3 4 5 6 7 8	E ₁₀	42.6	17.15	219.21	
			37.7	3.26	23.51	
			32.7	1.532	30.51	
			27.8	0.46	11.13	
			22.9	0.140	4.522	
			17.9	0.042	1.66	
			13.0	0.0127	0.62	
			8.0	-----	-----	
SUMA					270.822	
96	1 2 3 4 5 6 7 8	E ₁₂	39.4	2.982	36.83	
			34.6	0.921	4.12	
			29.7	0.280	0.55	
			24.7	0.082	1.98	
			19.1	0.021	0.68	
			14.7	0.0072	0.28	
			12.0	-----	-----	
			-----	-----	-----	

120 horas	1	44.9	30.64	378.40
	2	40.0	9.43	42.75
	3	34.8	2.544	50.12
	4	30.1	0.818	19.60
	5	25.5	0.266	8.60
	6	20.2	0.0711	2.80
	7	15.0	0.0208	1.03
	8	14.0	0.0162	0.92
SUMA				504.22

13	1	42.6	6.34	77.20
96 horas	2	37.8	2.060	9.21
	3	33.0	0.634	12.43
	4	28.05	0.186	4.50
	5	23.1	0.054	1.74
	6	18.3	0.017	0.67
	7	13.5	0.00535	0.26
	8	10.0	-----	-----
SUMA				106.01

120 horas	1	42.3	16.21	199.19
	2	37.6	5.04	22.53
	3	32.8	1.578	31.09
	4	28.0	0.482	11.66
	5	22.6	0.151	4.23
	6	18.3	0.046	1.81
	7	13.5	0.0144	0.22
	8	9.1	0.0048	0.27
SUMA				271.00

14	1	42.0	5.46	69.43
96 horas	2	38.5	2.412	10.78
	3	31.0	0.384	7.56
	4	25.5	0.098	2.37
	5	22.6	0.046	1.49
	6	14.7	0.0072	0.28
	7	11.3	-----	-----
	8	-----	-----	-----
SUMA				91.91

120 horas	1	43.05	10.72	243.64
	2	38.4	6.23	28.95
	3	33.8	2.04	40.19
	4	29.5	0.70	16.94
	5	23.7	0.171	5.52
	6	20.1	0.072	2.84
	7	15.3	0.0223	1.10
	8	10.9	0.0072	0.41
SUMA				339.59

120 horas

CONTINGENCIA

120 horas

120 horas

120 horas

SUMA

480.72

IRISA
96 horas

CONTINGENCIA

96 horas

96 horas

96 horas

SUMA

384.56

120 horas

CONTINGENCIA

120 horas

120 horas

120 horas

SUMA

480.72

Resumen del cuadro nº 5 .-

Medio d cultivo

Penicilina producida por la cepa 23 "
variando la composición del medio de cul-
tivo.

	96 horas	120 horas
E ₉	14 Unidades	193 Unidades
E ₁₁	32 "	290 "
E ₁₂	44 "	564 "
E ₁₃	106 "	271 "
E ₁₄	91 "	339 "
E ₁₅₍₁₎	218 "	747 "
E ₁₅₍₂₎	125 "	414 "
M.A.	351 "	549 "
H.U.S.A.	481 "	492 "

Las experiencias anteriores nos demuestran que el método sirve para comparar la producción de penicilina variando la composición del medio de cultivo.

Es evidente la influencia del ácido láctico en la producción de penicilina.

Se encontró un máximo rendimiento con extractos de maíz efectuados con ácido láctico y anhídrido sulfuroso en cantidades adecuadas.

Las cantidades producidas con los extractos láctico-sulfuroso son aproximadamente las mismas que las producidas con los macerados industriales de maíz.

c.- La influencia de la cepa en la producción de penicilina.

Las experiencias realizadas manteniendo constante la composición del medio de cultivo y variando la cepa de producción demuestran que es posible explicar el estado descrito en la selección de cepas.

Se utilizaron cinco cepas de *Penicillium chrysogenum*. Cuatro de ellas, mutantes inducidas por irradiación ultravioleta descendientes de la cepa QW 176. La quinta fue aislada en el laboratorio de Microbiología.

Cuadro N° 6.- La Influencia de la cepa en la producción de penicilina.-

Disco N° Cepa Tiempo de desarrollo del hongo: 9 6 horas

Disco N°	Cepa	Caja N°						Halo promedio			
		1A	1B	2A	2B	3A	3B				
1	"S"	44.1	42.5	50.5	50.0	46.0	47.4	49.0	45.6	48.3	
		39.4	44.8	41.5	41.2	40.0	43.4	40.0	43.2	42.3	
		34.2	39.0	38.0	38.3	35.2	39.0	37.0	37.0	38.5	
		29.0	33.0	32.5	32.0	30.2	33.1	30.0	30.0	31.5	
		25.0	26.0	27.0	27.0	26.2	26.5	26.5	26.5	26.0	
		20.0	21.2	20.0	21.1	19.9	20.1	20.0	20.0	20.0	
		15.0	15.5	13.0	15.0	14.5	14.5	12.5	14.5	14.5	
		10.0	10.0		10.0	10.0	10.0		10.0	10.4	
2	"S"	43.0	43.0	42.0	41.6	41.0	41.7	40.5	41.4	42.3	
		39.0	39.0	39.0	39.0	37.0	39.4	37.0	39.0	39.5	
		34.0	34.4	34.0	34.1	33.0	34.2	33.0	34.0	34.1	
		30.0	31.4	31.0	31.1	30.0	31.2	30.0	30.0	30.1	
		28.0	28.0	28.0	29.0	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0	
		22.0	23.0	23.0	24.0	23.0	24.1	22.0	22.0	22.0	
		18.0	19.0	19.0	20.0	19.0	20.5	17.0	18.0	18.0	
		14.0	15.0	15.0	17.0	16.0	17.1	15.0	14.1	14.0	
3	"S"	48.6	48.9	46.0	48.4	48.3	48.6	48.7	48.6	48.9	47.9
		43.3	43.0	41.6	43.2	43.0	43.2	43.2	43.0	43.0	43.7
		38.0	38.0	37.0	37.5	38.0	38.0	38.0	38.0	38.5	38.2
		32.4	32.7	32.4	32.0	32.7	32.5	32.0	32.0	32.5	32.9
		28.0	28.0	27.5	27.5	28.0	27.8	28.0	28.0	28.0	28.5
		22.0	22.5	21.0	21.2	22.6	21.8	20.0	22.0	22.0	22.1
		16.0	17.0	18.4	15.5	17.5	16.5	15.5	17.5	17.5	15.0
		10.0	10.0		10.0	10.0	10.0		10.0	10.0	10.9

1	39.2	39.5	39.7	---	---	---	---	---	---	39.2	39.7	39.4
2	35.9	36.3	36.4	---	---	---	---	---	---	35.7	35.7	36.0
3	32.5	32.5	32.5	---	---	---	---	---	---	32.0	32.0	32.3
4	29.3	29.3	29.3	---	---	---	---	---	---	28.6	28.6	29.1
5	26.5	27.5	26.5	---	---	---	---	---	---	26.5	26.5	26.9
6	22.6	23.2	22.5	---	---	---	---	---	---	21.5	21.5	22.1
7	19.5	19.5	18.5	---	---	---	---	---	---	18.0	18.0	18.6
8	16.2	16.6	15.2	---	---	---	---	---	---	14.4	14.4	15.2

1	47.3	44.1	45.3	43.2	39.9	48.4	44.1	44.1	48.1	46.8	44.7
2	40.5	38.3	38.7	37.3	34.7	40.0	38.5	37.9	40.9	39.6	37.5
3	33.0	33.0	32.0	32.0	29.5	31.8	33.0	33.0	33.0	32.0	32.5
4	26.0	26.5	25.0	25.5	23.7	22.8	25.5	25.5	26.0	24.7	25.3
5	19.0	18.0	18.5	18.5	15.5	14.5	19.0	18.5	18.5	17.5	17.5
6	11.8	14.5	11.5	13.5	13.0	6.0	15.4	13.3	11.3	9.9	12.3
7	---	9.0	---	8.0	8.0	---	10.0	8.0	---	---	7.2
8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1	44.5	43.8	42.8	42.8	41.8	45.8	44.3	44.3	43.5	43.6	43.4
2	40.0	38.9	38.0	38.0	37.1	38.5	39.6	39.0	38.8	38.9	38.4
3	34.5	33.5	33.8	33.8	32.0	32.5	34.0	33.5	34.0	33.5	33.1
4	30.4	28.9	28.8	28.8	27.6	27.7	29.5	28.6	29.6	29.3	28.6
5	27.5	26.5	25.5	25.5	24.0	24.1	26.0	25.0	26.0	26.0	25.4
6	21.0	19.1	19.4	19.4	18.1	17.1	19.4	18.3	20.3	20.0	18.0
7	16.0	13.5	14.5	14.5	13.0	11.5	14.0	13.0	15.5	15.0	13.7
8	11.7	9.4	10.1	10.1	8.8	6.7	9.3	8.1	11.2	10.8	9.2

1	48.1	47.0	47.8	46.7	45.0	45.0	47.1	45.7	47.0	46.5	46.8
2	41.7	40.7	40.8	40.2	39.0	39.8	40.8	40.0	40.8	40.2	40.5
3	34.5	34.5	33.5	34.0	32.5	34.5	34.0	34.0	34.5	34.0	34.0
4	28.6	28.2	26.3	27.2	26.3	28.8	27.2	28.2	28.1	27.7	28.5
5	23.5	22.0	19.0	19.5	19.5	21.5	20.5	22.0	21.5	21.5	20.9
6	15.5	15.4	12.0	14.0	12.7	17.5	13.8	16.3	15.4	15.1	14.6
7	8.5	9.5	---	8.0	6.0	12.0	7.2	10.5	9.1	9.0	8.89
8	---	---	---	---	---	6.2	---	---	---	---	6.2

1	44.3	43.6	42.7	42.6	43.2	43.5	43.6	45.6	43.5	44.2	45.0	43.7
2	39.5	37.1	38.0	38.2	39.0	38.9	38.9	40.9	39.0	39.5	39.9	39.0
3	34.5	34.5	33.5	33.5	34.5	34.0	34.5	35.5	34.0	34.5	34.0	34.2
4	30.1	30.0	28.7	29.2	30.0	29.6	29.4	31.0	29.3	30.0	29.6	29.6
5	27.6	26.5	25.5	26.5	27.5	25.5	26.0	27.5	26.0	25.5	25.5	26.1
6	20.6	20.8	19.4	20.0	21.0	20.1	19.8	20.9	19.7	20.3	19.0	19.27
7	15.5	16.0	14.5	15.5	15.5	15.5	14.5	15.5	14.5	15.5	13.5	15.2
8	11.1	11.5	10.1	11.2	11.9	10.8	10.5	11.0	10.1	10.8	8.6	10.7

1	31.7	30.7	31.7	36.6	37.2	32.9	31.5	32.5	32.5	29.5	28.2	32.7
2	26.6	26.1	26.6	31.4	31.5	28.8	27.5	28.5	28.5	25.4	24.2	27.8
3	21.5	21.5	21.5	26.0	25.5	25.0	23.5	24.5	24.5	21.5	20.5	25.5
4	16.1	17.0	16.1	21.7	19.6	20.6	18.4	20.7	20.5	17.5	16.3	19.5
5	11.5	12.5	11.5	15.5	14.0	15.5	15.3	17.0	16.5	15.5	12.5	14.1
6	6.2	8.0	6.2	10.1	8.1	12.2	11.3	12.8	12.4	9.6	8.4	6.6
7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1	31.3	32.4	36.5	33.6	---	32.5	30.3	37.2	34.4	33.7	34.1	34.5
2	28.5	28.0	31.2	29.3	---	28.5	26.5	32.6	30.0	29.4	29.7	30.0
3	24.5	25.5	26.0	25.0	---	24.5	22.5	27.5	25.5	25.0	25.8	26.6
4	20.5	19.0	20.6	20.8	---	20.5	18.5	23.3	21.2	20.8	20.5	20.5
5	16.5	14.5	15.5	17.5	---	16.5	14.5	19.0	16.5	17.5	15.5	16.0
6	12.6	10.0	10.2	12.4	---	12.6	10.5	13.9	12.4	12.3	12.2	11.6
7	8.8	---	---	8.0	---	8.8	6.7	9.0	8.0	8.0	8.0	8.0
8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

✓

En las tablas que más abajo se leerán, se consigna en la columna producto, el producto de la potencia de cada línea por el Factor correspondiente de acuerdo a la posición que ocupa respecto del centro de difusión (ver párg. 37).

.....

Cuadro N° 7.-

Copa "S"	Disco N°	Halo promedio	Potencia de cada disco	Producto de la pot. x N° discos
96 horas	1	48.3	61.2	755.00
	2	42.9	12.5	56.00
	3	38.5	3.508	70.5
	4	31.5	0.438	10.6
	5	26.3	0.076	2.45
	6	20.2	0.0162	0.54
	7	14.3	0.0027	0.13
	8	10.4	0.00109	0.061
SUMA				895.381
120 hrs	1	42.3	19550	240.82
	2	38.5	6.56	29.32
	3	34.1	1.798	35.42
	4	30.7	0.678	16.40
	5	28.1	0.324	10.46
	6	22.9	0.070	2.76
	7	18.8	0.0227	1.12
	8	15.0	0.0076	0.33
SUMA				336.63

Copa 3	Disco N°	Halo promedio	Potencia	Producto
96 hrs	1	47.9	54.6	694.1
	2	42.7	11.84	52.92
	3	38.2	3.14	61.86
	4	31.9	0.482	11.66
	5	26.5	0.100	3.23
	6	21.1	0.021	0.83
	7	16.0	0.0046	0.23
	8	8.0	0.00043	0.024
SUMA				824.854
120hrs	1	39.4	854	105.47
	2	36.0	3.14	14.04
	3	32.3	1.074	21.16
	4	29.1	0.428	10.36
	5	26.9	0.227	7.33
	6	22.1	0.058	2.29
	7	18.6	0.0214	1.05
	8	15.2	0.0080	0.45
SUMA				162.15



Capa W190	Disco N°	Halo promedio	Potencia	Producto
96 hrs	1	44.7	21.04	259.84
	2	37.5	2.544	11.37
	3	32.5	0.590	11.6
	4	25.3	0.071	1.71
	5	17.5	0.0062	0.20
	6	12.3	0.0016	0.06
	7	7.2	0.000376	0.02
	8	----	----	----
SUMA				281.82
120 hrs	1	43.45	27.2	335.9
	2	38.45	6.34	28.34
	3	33.16	1.381	27.20
	4	28.63	0.372	9.00
	5	23.45	0.082	2.65
	6	18.0	0.018	0.71
	7	13.7	0.0058	0.28
	8	9.21	0.0015	0.08
SUMA				404.16

Copa w 47	Dise N°	Halo promedio	Potencia	Producto
96 hrs	1	46.8	39.14	487.08
	2	40.5	6.12	27.35
	3	34.0	0.921	18.14
	4	39.5	0.184	4.15
	5	20.9	0.0197	0.636
	6	14.6	0.003	0.12
	7	8.89	0.00061	0.03
	8	6.2	---	---
SOMA				557.06
120 hrs	1	43.7	29.4	363.09
	2	39.0	7.27	32.49
	3	34.2	1.97	35.609
	4	29.6	24.2	12.196
	5	26.1	0.184	5.94
	6	19.27	0.026	1.037
	7	15.2	0.0080	0.794
	8	10.7	0.0023	0.129
SOMA				450.885

CEPA E.G.	Disco N°	Halo promedio	Potencia	Producto
96 hrs	1	32.7	0.656	8.08
	2	27.8	0.149	0.67
	3	25.5	0.076	1.51
	4	19.5	0.013	0.31
	5	14.1	0.0026	0.08
	6	6.6	0.00032	0.01
	7	----	----	----
	8	----	----	----
SUMA				10.66
120 hrs	1	34.5	2.018	24.92
	2	30.0	0.557	2.49
	3	26.6	0.210	4.14
	4	20.5	0.037	0.89
	5	16.0	0.010	0.32
	6	11.6	0.0029	0.11
	7	8.0	0.00105	0.05
	8	----	----	----
SUMA				32.92

Cepa	Penicilina		producida en	
	96 horas		120 horas	
"S"	895	Unidades/caja	336	Unidades/caja
3	824	"	162	"
W 190	284	"	404	"
W 47	537	"	450	"
E.O.	10	"	32	"

La cepa "S" es la que mayor rendimiento produce a las 96 horas de cultivo en caja de Petri. En las 24 horas subsiguientes esta cepa destruye $\frac{2}{3}$ de la penicilina producida.

La cepa 3 produce a las 96 horas un 8% menos que la cepa "S", destruyéndose las $\frac{4}{5}$ partes de la penicilina producida en las 24 horas subsiguientes.

La cepa 47 produce a las 96 horas, la tercera parte de la producida por la cepa "S", incrementando la producción en 45% en las 24 horas subsiguientes.

La cepa E/G. (cepa aislada en el laboratorio), produce a las 96 horas 10 veces menos que la cepa "S", manteniéndose la misma relación a las 120 horas.

De lo expresado más arriba, vemos que es posible utilizar el método propuesto en la selección preliminar de las cepas para conocer su comportamiento en la producción de penicilina.



VI.- Láminas

N° 1.- 3 discos. Ver descripción pág. 72.

N° 2.- Caja de producción de penicilina, donde han sido extraídos los discos cada 24 horas.

N° 3.- Halos de inhibición de las posiciones 3, 5 y 7 cepa "s"

N° 4.- " " " " " " " " " " 3

N° 5.- " " " " " " " " " " 190

N° 6.- " " " " " " " " " " 47

N° 7.- " " " " " " " " " " S.O.

Las fotografías son de tamaño natural.

N° 8.- Halos n° 1.

N° 9.- " " 2.

N° 10.- " " 3.

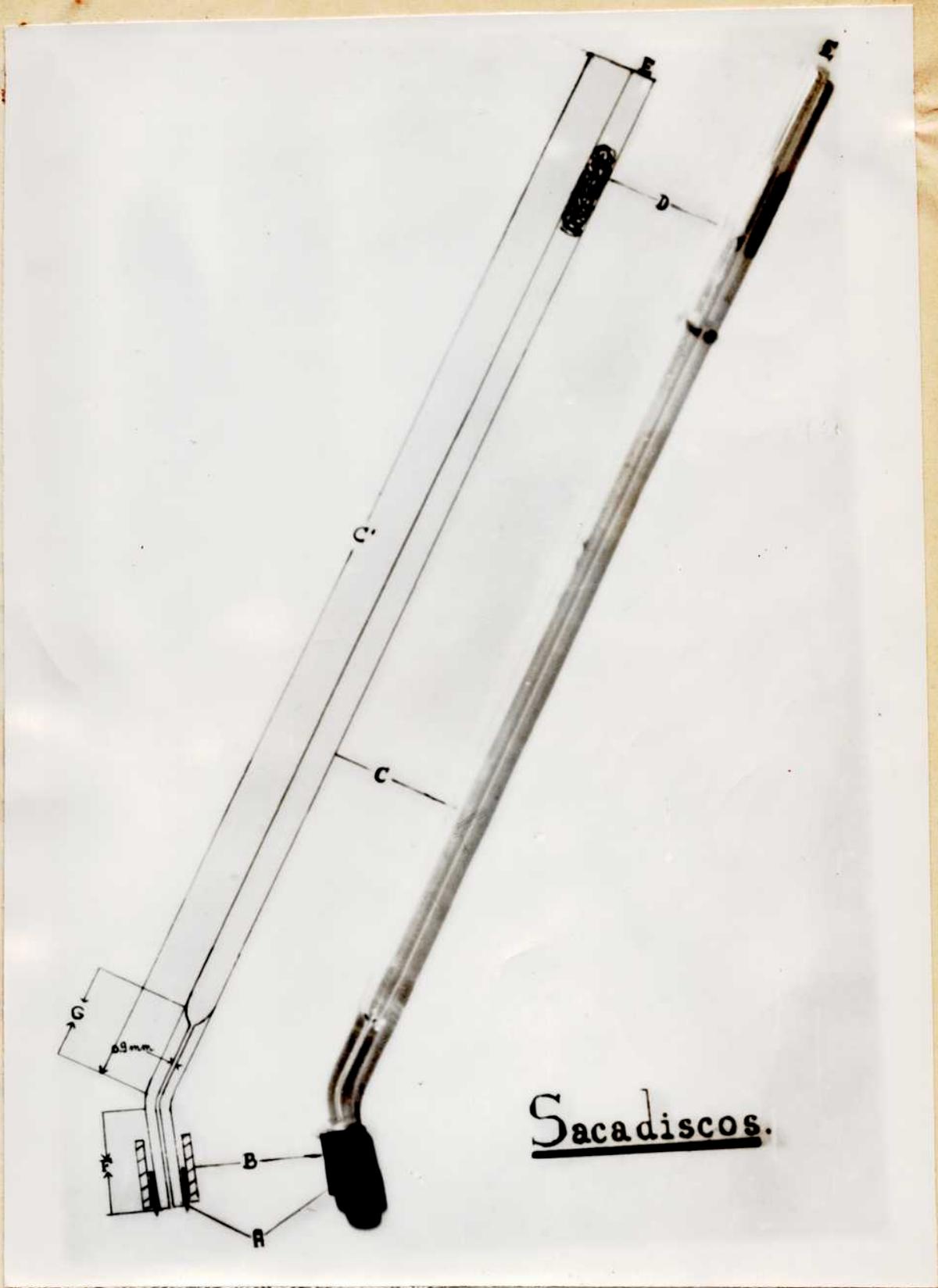


Lámina N° 1.

DESCRIPCION DE LA LAMINA N°1

A.- Sacaboc dos de acero inoxidable de 6 m. de diámetro x 8 mm. de altura x 0,1 mm. de espesor.

B.- Trocito de goma "Intex".

C.- Soporte del sacaboc dos.

D.- Trozo de algodón.

E.- Extremo donde se inserta un tubo de goma Intex de 35-40 cm. de largo y de 8 mm. de espesor. Al tubo de goma se adosa una piccita bucal de 6-8 cm. de largo de vidrio común.

F.- Trozo superior del capilar de 22 mm. de longitud.

G.- Trozo inferior del capilar de 20 mm. de longitud.

El capilar tiene 0,9 mm. luz.

El sacaboc dos debe ajustarse a 0,15-0,17 mm. de la base del sacaboc dos.

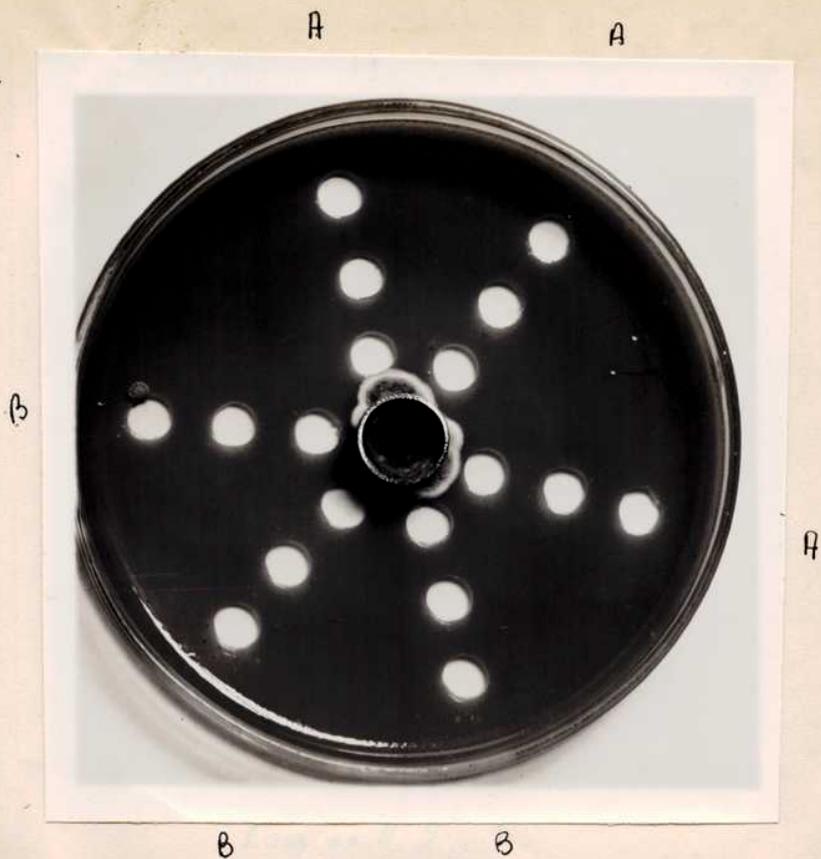


Lámina N^o 2.

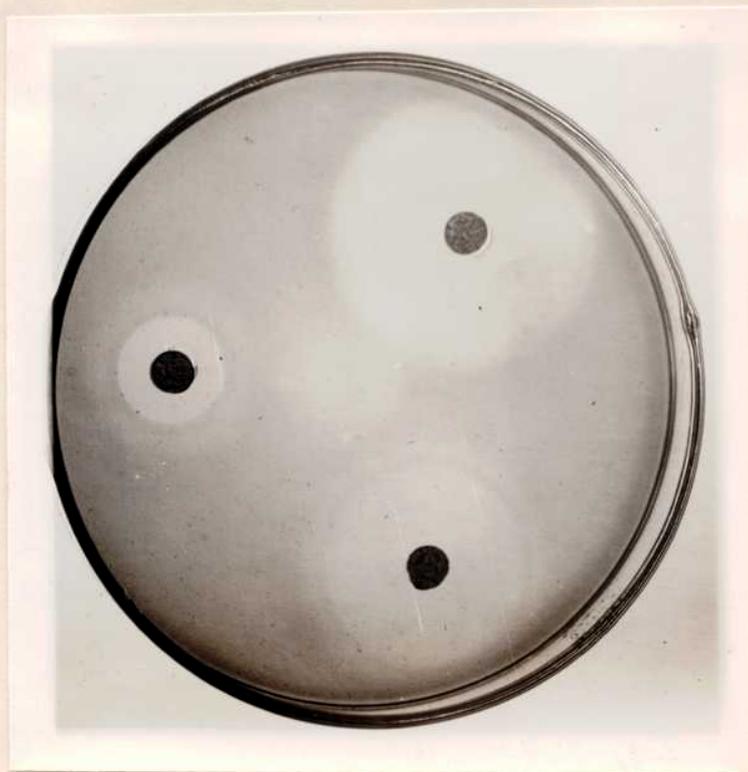


Lámina N^o 3.

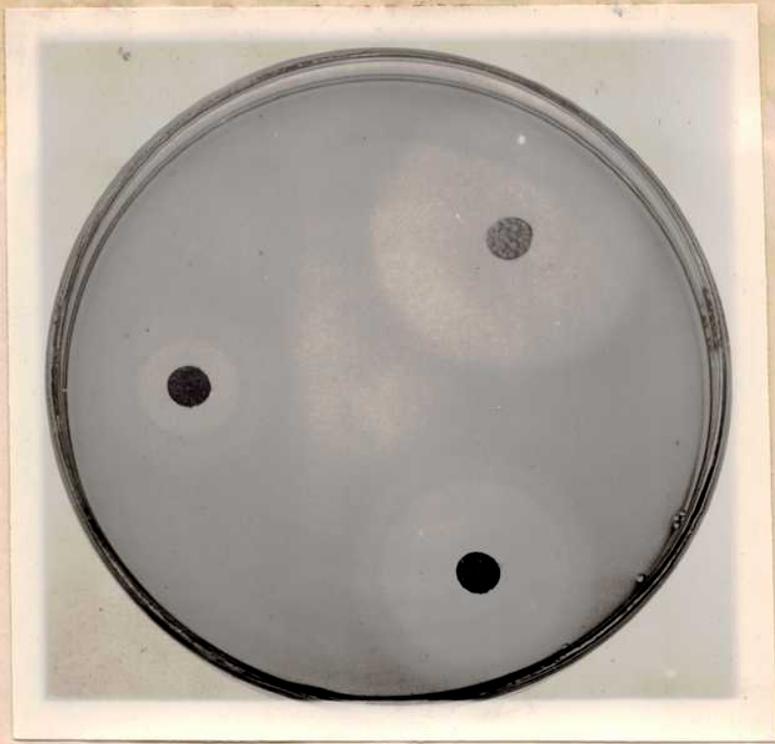


Lámina N° 4

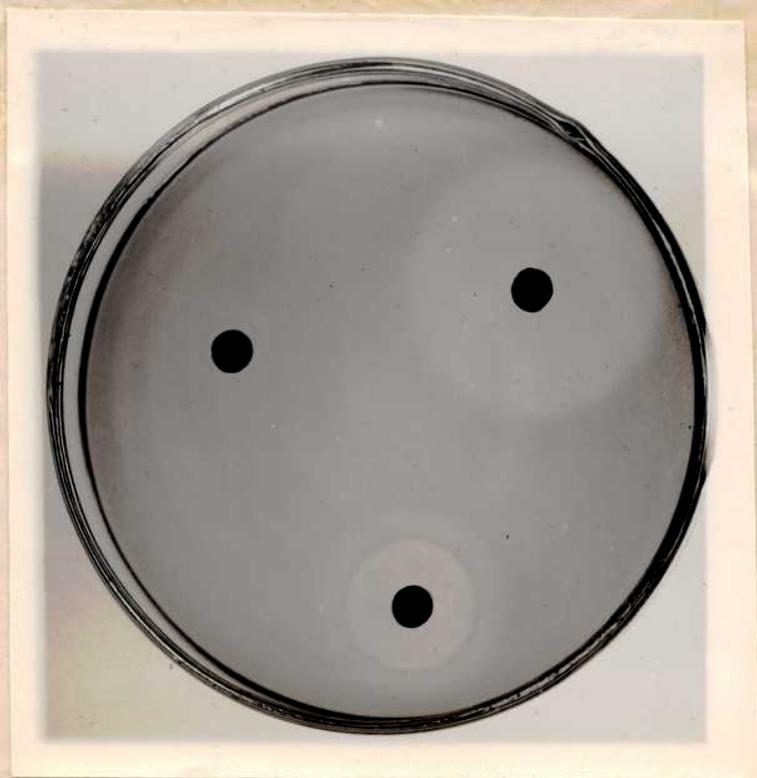


Lámina N° 5

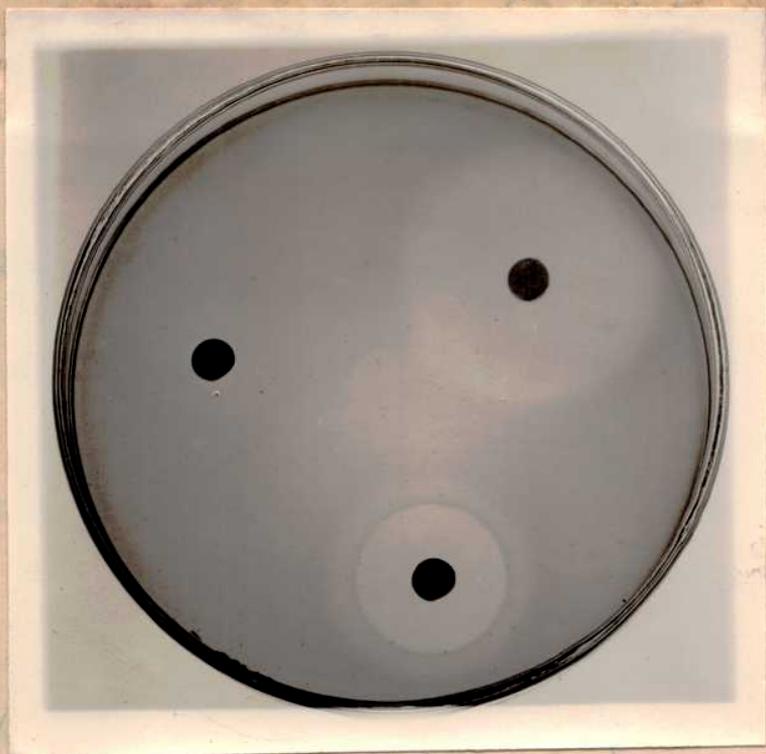


Lámina N° 6

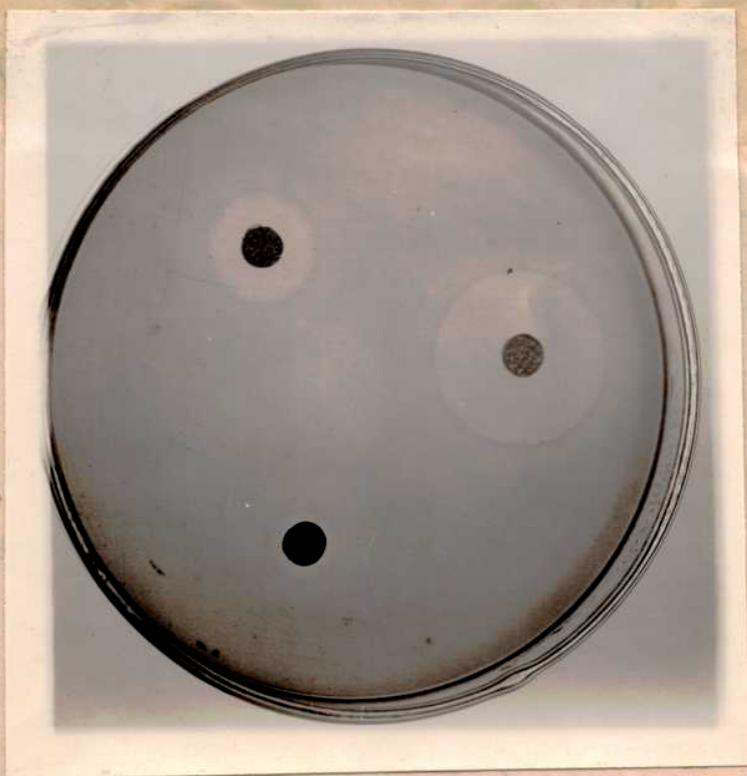
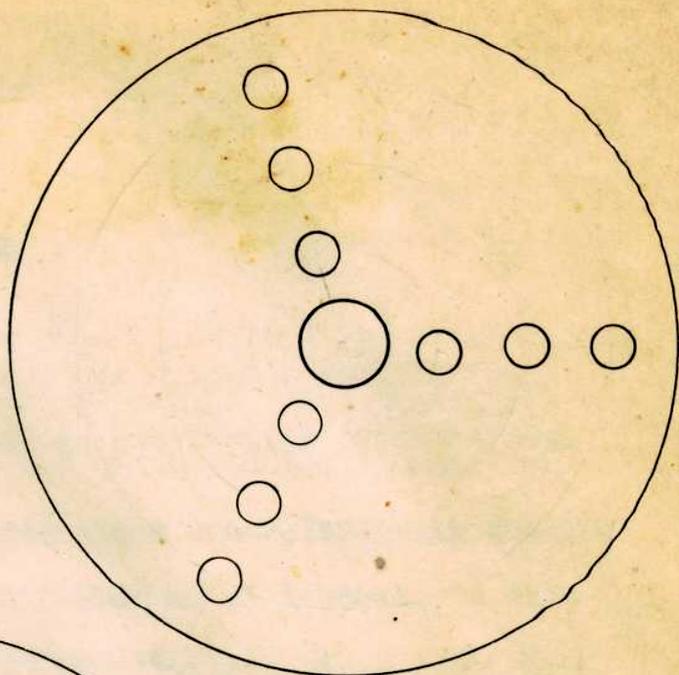
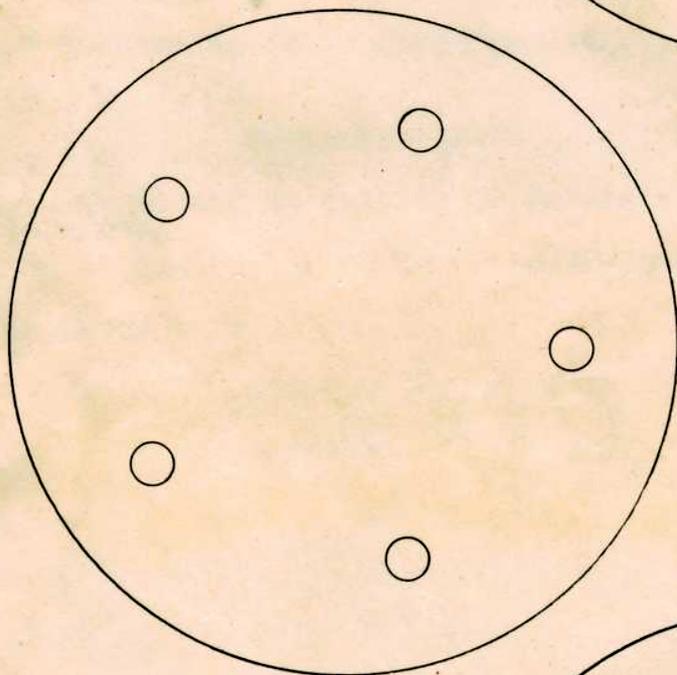


Lámina N° 7

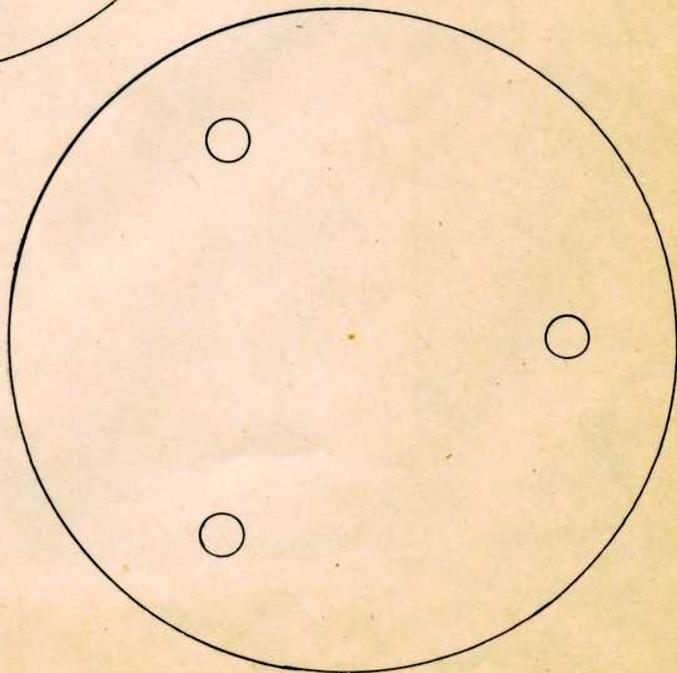
MOLDE N°1



MOLDE N°2



MOLDE N°3



VII.- CONCLUSIONES

En el trabajo que antecede se describe un método sencillo de estimación de sustancias antibióticas.

El objeto del mismo fué desarrollar una técnica sencilla y de fácil aplicación en el laboratorio donde fueron realizadas estas experiencias.

Se hizo posible comparar la producción de penicilina en medios de cultivo de composición diferente y la producción de penicilina en un mismo medio de cultivo por cepas diferentes.

VIII. RESULTADOS.

Se describe un método para la determinación de la cantidad de penicilina que difunde desde un centro de producción en el agar contenido en la placa de Petri.

Por aplicación de dicho método ha sido posible establecer las siguientes conclusiones:

1.- La penicilina disuelta en agar de distinta composición y mantenida a la temperatura de 28°C no se destruye hasta las 120 horas.

2.- La penicilina disuelta en agar y colocada en el centro de una placa de Petri difundió rápidamente manteniéndose un gradiente que cambia poco de punto hasta las 120 horas. En estas condiciones experimentales la penicilina no se destruye.

3.- La aplicación del método ha permitido revelar diferencias muy marcadas en la producción de penicilina por la influencia del medio de cultivo habiéndose comprobado que diferentes concentraciones de agua producen cantidades distintas de penicilina.

4.- A la misma conclusión se llega en el caso de la variación de las copas.

5.- No es posible aplicar el procedimiento para conocer la cantidad absoluta de penicilina formada en el centro de producción por cuanto los valores obtenidos oscilan casi en un 100 % la cantidad de penicilina colocada en el centro de difusión.

IX.- Bibliografía.

Publicaciones periódicas.

ANO	Nº	Autores	Publicación	Tomo	Página
1929	(1)	Fleming, A.	B.J.E.P.	10	226
1932	(2)	Clutterbuck, P.W. y col.	B.J.	26	1907
1935	(3)	Reid, R.D.	J.B.	29	215
1940	(4)	Fleming, A.	Pharm. Journal	145	162
	(5)	Chain, E. y col.	Lancet	II	226
	(6)	Chain, E. y col.	Lancet	II	177
1942	(7)	Foster, J.W.	J.B.C.	144	285
	(8)	Challinor, S.W.	Nature	150	688
	(9)	Fleming, A.	Lancet	242	732
1943	(10)	Taylor, H.G.	Proc. Soc. Exp. Biol Med.	52	299
	(11)	Clifton, C.E.	Science	98	69
	(12)	Challinor, S.W.	J. Path. Bact.	55	441
	13)	Wise, B. y col.	J.B.	46	333
	(14)	Raper, K.B. y col.	J.A.M.A.	123	1135
1944	(15)	Coghill, R.D.	Chem. Eng. News	22	588
	(16)	Garrod, L.P. y col.	Brit. J. Surgery	32	117
	(17)	Epstein, J.A. y col.	J. Lab. Clin. Med.	29	319
	(18)	Elder, A.L. y col.	Chem. & Eng. Eng	51	103
	(19)	Cook, R.P. y col.	J. Path. Bact.	56	555
	(20)	Foster, J.W. y col.	J.B.	47	43
	(21)	Bliss, C.I.	Science	100	577

	(22)	Elder, A.L.	Chem. Ind.	54	501
	(23)	Waksman, S.A. y col.	Proc. Nat. Acad. Sci.	30	99
	(24)	Callahan, J.R.	Chem. Met. Eng.	51	94
	(25)	Pearl, I.A. y col.	Science	100	51
	(26)	Heatley, H.G.	B.J.	38	61
	(27)	Bliss, C.I.	Science	100	577
	(28)	Raper, K.B. y col.	J.B.	48	639
	(29)	Schmidt y col.	J.B.	47	199
	(30)	Waksman, S.A. y col.	J.B.	47	308
1945	(31)	Knudsen, L.F.	Science	101	46
	(32)	Beadle, G.W. y col.	J.B.	49	101
	(33)	Stanley, J. y col.	Am. J. Clin. Path. Tech. Section	3	22
	(34)	Koffler, H. y col.	J.R.	50	517
	(35)	idem	idem	idem	549
	(36)	Knightsidem	idem	idem	505
	(37)	idem	Science	102	617
	(38)	Cook, R.P. y col.	Nature	155	515
	(39)	idem	B.J.	39	XXIV
	(40)	idem	B.J.	39	XXIII
	(41)	idem	B.J.	39	314
	(42)	White, A.G.C. y col.	Arch. Bioch.	8	383
	(43)	Tanner, F.W. y col.	Arch. Bioch.	8	29
	(44)	Medical Research, Wash. & London	Science	102	627
	(45)	de Beer, E.J. y col.	J.B.	50	459
	(46)	Loe, Y.H. y col.	M.B.	50	701
1946	(47)	Welch, H y col.	J. Am. Pharm. Assoc.	35	102
	(48)	Moyer, A.J. y col.	G.B.	51	57-78

	(49) Moyer, A.J. y col.	J.B.	51	79
	(50) Koffler, H. y col.	J.B.	51	385
	(51) Liggett, R.W.	J.B.	51	597
	(52) Stone, R.W. y col.	J.B.	51	598
	(53) Foster, J.W. y col.	J.B.	51	695
	(54) Raper, K.B. y col.	J.B.	51	761
	(55) Stefaniak, J.J. y col.	J.B.	52	119
	(56) idem	id.	id.	129
	(57) Cook, R.P. y col.	B.J.	40	XLIX
	(58) idem	id.	id.	XXXIV
	(59) idem	id.	id.	XXI
	(60) Balverksaft, R.J.	Lancet	251	265
	(61) Higuchi, K.	J.A.C.S.	68	1669
	(62) Bowden, J.P. y col.	Arch. Bioch.	9	387
	(63) Stone, R.W. y col.	Science	104	445
	(64) Stefanick, J.J. y col.	Ing. Eng. Chem.	38	666
	(65) Johnson, M.J.	Ann. N.Y. Acad. Sci.	48	57
	(66) Foster, J.W. y col.	J.B.	51	465
1947	(67) Cook, R.P. y col.	Nature	159	376
	(68) Jarvis, F.G. y col.	J. Am. Chem. Soc.	69	3010
	(69) Taylor, T.H.M.	Chem. Eng. Prog. Trans. Sect.	43	155
	(70) Biosynthesis of Penicillin	Science	106	503
	(71) Koffler, H. y col.	J.B.	53	115
	(72) Thomas, J.O.	J.B. 54	54	546
	(73) Hahn, L.	Lancet	252	408
	(74) Pratt, R.	Nature	159	233
	(75) idem	J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.	36	69

	(76)	idem	Plant. Phys.	22	308
	(77)	Meyer, A.J. y col.	J.B.	53	329
1948	(78)	Cardinal, E.V.	J.B.C.	172	609
	(79)	Johnson, M.J. y col.	J.B.	56	339
1949	(80)	Liggett, R.W. y col.	Bact. Reviews	12	

Libros consultados .-

Antibiotics Florey, H.W. y colaboradores 1949 Oxford

Medical Publications.

Industrial Microbiology Prescott & Dunn 1949 Mc Graw Hill New York

An Introduction to Industrial Mycology Smith, G. El. Arnold London

Abreviaturas empleadas en la bibliografía.-

B.J.E.P.	British Journal of Experimental Pathology London.
B.J.	The Biochemical Journal Cambridge England.
J.B.	Journal of Bacteriology Baltimore USA.
J.B.C.	Journal of Biological Chemistry Baltimore USA.
J.Path.Bact.	Journal of Pathology and Bacteriology Baltimore USA
J.A.M.A.	Journal of the American Medical Association Chicago USA.
Brit.J.Surg.	British Journal of Surgery Bristol England.
Chem. Ind.	Chemical Industries East Liverpool New Haven.
Proc.Nat.Acad.Sci.	Proceedings of the National Academy of Sciences Washington USA.
Am.J.Clin.Path.	American Journal of Clinical Pathology Baltimore.
Arch.Bioch.	Archives of Biochemistry.
J.Am.Pharm.Assoc.	Journal of the American Pharmaceutical Association Washington USA.
Plant Phys.	Plant Physiology Lancaster, Pennsylvania USA.
Bact.Reviews	Bacteriological Reviews.

Indice.

Tema	Página
Plan del trabajo	1
I.- Objeto del presente trabajo	3
II.- Antecedentes.	
1.- Los problemas de la producción de antibióti- cos	5
2.- Métodos experimentales de laboratorio y de escala semi-industrial.	12
3.- El uso del disco de agar en la elección de la cepa	17
4.- Posibilidades que ofrece el uso del disco de agar	20
III.- Estudio de las condiciones en que se puede apli- car el métodos propuesto	22
IV.- Material y métodos.-	
1.- Material. Su descripción y preparación . . .	24
2.- Medios de cultivo y soluciones	25
3.- Métodos	29
V.- Resultados experimentales.	
a.- Estudio de la difusión en el agar.	44
b.- La influencia de la composición del medio de cultivo en la producción de penicilina. . . .	48
c.- La influencia de la cepa en la producción de penicilina	57
VI.- Láminas	70
VII.- Conclusiones	77
VIII.- Resumen	78
IX.- Bibliografía	80

Elmer H. Meyer

Alfred
