

**MINISTERIO DE EDUCACION Y**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL**

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**OBTENCION DE BACITRACINA**

**POR**

**FERMENTACION SUMERGIDA**

**POR**

**JORGE LUIS RIPOLI**

**1956**

MINISTERIO DE EDUCACION DE LA NACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

"OBTENCION DE HADITRACINA POR FERMENTACION SOMERGIDA"

Por

Jorge Luis Ripoli

1956

Trabajo de Tesis para optar el grado de Doctor en Química,  
realizado en el Instituto de Fermentaciones Industriales de la  
Cátedra de Industrias Químico-Farmacéuticas, bajo la dirección  
del Profesor Doctor EMMON MARIANO LUGONES.

4 222 2222

## S U M A R I O

### I. - MONOGRAFIA

- Capítulo I: Consideraciones generales sobre antibióticos.
- Capítulo II: Ordenamiento cronológico de los antibióticos más importantes.
- Capítulo III: Breves nociones sobre antibioticoterapia.
- Capítulo IV: Historia de la Bacitracina.
- Capítulo V: Producción en laboratorio.
- Capítulo VI: Propiedades físicas y químicas.
- Capítulo VII: Ensayos de Bacitracina.
- Capítulo VIII: Usos y ventajas de la Bacitracina.
- Capítulo IX: Esquema de una producción en escala industrial.

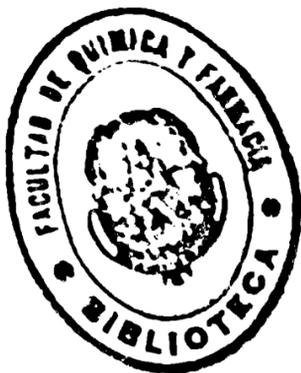
### II. - PARTE EXPERIMENTAL

- a) - Equipo fermentador.
- b) - Germen productor.
- c) - Inoculación y puesta a punto del método.
- d) - Técnica de valoración del antibiótico.
- e) - Empleo de distintos medios de cultivo.
- f) - Variación de la temperatura.
- g) - Variación empleando inóculo obtenido con agitación.
- h) - Métodos de obtención y análisis sumario de las sustancias utilizadas como fuente de nitrógeno proteico.

### III. - RESUMEN Y CONCLUSIONES

### IV. - BIBLIOGRAFIA.

I - MONOGRAFIA



## CAPITULO PRIMERO

### Consideraciones Generales Sobre Antibióticos

En los principios de la Microbiología se observaron fenómenos de incompatibilidad o antagonismo entre diversos organismos. Así WAKSMAN en "Microbial and Antibiotic Substances", enumera algunos antiguos ejemplos de este curioso efecto observado.

En 1876, JOHN TYNDALL, observando cultivos de hongos y bacterias, encontró una lucha por la vida, un verdadero antagonismo, entre la "Bacteria" y el "Penicillium". En esta lucha parecía triunfar la "Bacteria", ya que por lo general, mataba al "Penicillium" produciendo un característico pigmento verde.

En 1877, LOUIS PASTEUR, trabajando con cultivos del Bacillus Anthracis, vió que con el agregado de bacterias comunes producíanse modificaciones en el poder patógeno del germen y hasta se inhibía el crecimiento del mismo.

A través de otras experiencias de esta índole, se fue conociendo mejor el significado de las interrelaciones antagónicas y sinérgicas de los microorganismos, y PASTEUR ya vislumbró en aquel entonces, la consecuencia útil que estas interrelaciones pudieran tener en la lucha humana contra las enfermedades.

En 1885, BABES, al estudiar la acción antibacterial, demostró que era debida a la producción de una sustancia de composición química definida, y ya en 1887, se pudo poner mejor en evidencia estos fenómenos antagónicos al introducir GARRE el método de las diluciones seriadas.

Los avances de la Microbiología y de las técnicas de laboratorio, adelantaron los estudios sobre el antagonismo y una consecuencia señalable de ello, fue que en general, se dejó de considerar al suelo como reservorio de gérmenes patógenos, ya que estos en su gran mayoría mueren al caer en él, bien porque las condiciones del medio no les son favorables o porque existe allí una flora antagónica que los mata. Se excluyen de esta acción los microorganismos esporulados que conservan sus propiedades patógenas.

Para explicar estas acciones antibacterianas surgió el término "antibiótico" que significaría negación o destrucción de la vida.

En 1942 WAKSMAN y otros, sugirieron el término "antibiótico" y "efecto antibiótico" en relación con agentes antibacterianos de origen microbiano.

Los antibióticos fueron definidos por WAKSMAN en 1947: "son sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos"; pero frecuentemente el sentido de ese término ha sido ampliado para incluir algunas sustancias semejantes producidas por seres animales o vegetales superiores.

ROEMER, en sus estudios los define como: "agentes antimicrobianos producidos por células vivas".

Actualmente el término antibiótico se utiliza en un sentido mucho más estricto, diciendo: "son agentes antimicrobianos producidos por bacterias, levaduras, hongos y otros vegetales vivos".

R.A. PHILLO, los define de la siguiente manera: "entendemos como sustancia antibiótica, toda sustancia orgánica producida por microorganismos no patógenos, que ejerce su acción impidiendo el crecimiento o la actividad de un segundo microorganismo, cuando se halle presente en un medio apropiado para el crecimiento o para la actividad normal de ese segundo microorganismo".

-----

## CAPITULO SEGUNDO

### Orígenes cronológico de los Antibióticos más Importantes

En la práctica, es grande la cantidad de antibióticos conocidos. De ellos, y debido a la importancia que han adquirido en los campos de la terapia y de la alimentación, merecen citarse la penicilina, estreptomicina, tirotricina, neomicina, cloromicetina, aureomicina, terramicina y bacitracina.

Los sucesos que jalanan hasta hoy el estudio de esta especialidad son los siguientes:

En 1877, **EMILIO Y LUIGI** aplican cultivos de *Pseudomonas pyocyanea* que combaten con éxito el Antrax experimental.

Más tarde, en 1913, **ALBERTO Y HENRI** citan el ácido penicílico, obtenido de cultivos de *Penicillium puberulum* y *Penicillium cyclopium* que tenía una acción relativa sobre gérmenes Gram positivos y negativos y algunas levaduras.

Sobre los gérmenes Gram positivos y negativos también actúa la pio-cianina, obtenida en forma cristalizada de cultivos de *Pseudomonas pyocyanea* por **WILLIAM Y STRACK** en 1924.

En el mismo año, **GRATTIA Y DANIEL**, estudiando copas de actinomicas, hoy llamadas *Streptomyces albus G.*, obtuvieron la actinomicetina de acción sobre algunos microorganismos Gram positivos y negativos.

En 1929, **ALEJANDRO FLEMING** descubre uno de los antibióticos más importantes, la penicilina, obtenida del *Penicillium notatum*, de marcada acción sobre gérmenes Gram positivos y algunos Gram negativos.

En 1939, **HUBOS** extrae de cultivos de *Bacilo brevis*, la tirotricina, de acción sobre gérmenes Gram positivos.

**WILLIAM Y WOODWARD** en 1940, aislaron del suelo una especie de actinomyces que pertenecía al tipo de *Actinomyces chromogenas* de acción bacteriostática y bactericida que se denominó *Actinomyces antibioticus*.

Del cultivo de este hongo aislaron una sustancia que cristalizada, fraccionaron en dos: Actinomicina A y B, antagónicas de gérmenes Gram positivos y negativos y también fungiestáticas.

También ellos , en 1942, aislaron la estreptothricina, activa contra los mismos gérmenes.

En 1943, de un hongo, el *Aspergillus flavus*, WHITE y HILL aislaron el ácido aspergílico, de acción contra bacterias Gram positivas y negativas. Del mismo hongo y en el mismo año, DUSHI y GOTI, obtuvieron la flavicina, de acción mas marcada que la penicilina sobre determinados organismos Gram positivos.

En 1944, WAKSMAN y SCHATE, descubren la estreptomizina, de gran importancia terapéutica pues posee una enérgica acción contra muchos gérmenes patógenos, destacándose la que ejerce sobre el bacilo de la tuberculosis, sobre todo de la cepa humana.

En el mismo año, LAC INE, RACE y HOUCK descubrieron la flavicidina y JANSSEN y HIRSCHELMAN aislaron la subtilina.

También en 1944, GAUSE y BRAMNIKOVA, aislaron de un germen del suelo una sustancia bactericida que denominaron gramacidina S.

A fines de 1943 y durante 1944, se estudió un agente antibacteriano nuevo, aislado de cepas del Bacilo subtilis, variedad Licheniformes, que fue llamado bacitracina, y es el antibiótico que vamos a estudiar en este trabajo.

Mas tarde CARTER, COTTELL y ANTROCK, a partir de un *Streptomyces* relacionado con el *Streptomyces lavendulae*, obtuvieron la chloromicetina de acción sobre bacterias Gram positivas y negativas y muy activa sobre la *Rickettsia prowazeki*.

Un paso importante en el camino de los antibióticos, fue el logro de la aureomicina, aislada del *Streptomyces aureofaciens* en forma cristalina. La aureomicina, de acción mas bien bacteriostática que bactericida, es activa sobre los gérmenes Gram positivos más que sobre los Gram negativos, teniendo también acción sobre las *Rickettsias* y algunos virus.

A partir del *Streptomyces fradiae*, obtenido del suelo por WAKSMAN y CURTIS en 1915, el mismo WAKSMAN en colaboración con LECHEVALIER, obtuvieron en 1949 neomicina, antibiótico que posee acción sobre

bacterias Gram positivas y negativas, dobiéndose señalar su particular acción sobre varias formas de *Mycobacterium tuberculosis* y otras *Mycobacterias*, no teniendo acción fungicida.

También de un elemento del suelo, el *Streptomyces lavendulae* No. 3516, WILKIN y otros colaboradores llegaron a una sustancia que denominaron streptotricina VI por su semejanza a la streptotricina en cuanto a sus propiedades antibacteriales y químicas, con la conveniencia de su menor toxicidad. Se debe señalar su poderosa acción tuberculicida y tubérculoestática; tiene acción sobre ciertos hongos.

Siguiendo con los estudios sobre gérmenes del suelo, se llegó a obtener un antibiótico importantísimo por sus aplicaciones terapéuticas y que dado su origen fue denominado terramicina.

Se debe indicar que de animales y vegetales superiores se aislaron sustancias antibacteriales que pertenecen al campo de los antibióticos; así FLEMING obtuvo de la clara de huevo un principio enzimático que denominó lysotyme, aislado más tarde de tejidos animales y vegetales y de diversos humores (lágrimas, saliva, etc.).

Ya en el terreno de los vegetales superiores encontramos que CAVALLITO y MURPHY aislaron del *Allium sativum*, la allicina de acción sobre bacterias Gram positivas y negativas.

Actualmente se han sintetizado algunos productos de propiedades análogas a ciertos antibióticos naturales, como así también son muchas las sustancias antibacterianas que se descubren. Esto nos permite decir que en este terreno resta mucho aun por hacer.

## CAPITULO TERCERO

### Breves Nociones sobre Antibioticoterapia

El espectro antibacteriano de un antibiótico circun-  
da los tipos y especies de los microorganismos patógenos que son in-  
hibidos y amortiguados por la droga. Hay indudablemente muchos agen-  
tes antibacterianos que pueden inhibir todo tipo de bacteria, esto  
haría pensar en un bactericida universal, pero desafortunadamente,  
para que una droga llegue a poseer tal poder, tendría que aplicarse  
en concentraciones tan grandes, que resultan tóxicas no solo para las  
bacterias sino también para los tejidos adonde ellas viven.

Cuando se habla de un espectro antibacteriano, se da a entender la  
variedad de bacteria amortiguada o inhibida por un antibiótico espe-  
cífico o una droga concentrada que no daña los tejidos. Los antibió-  
ticos son selectivos en su acción y esta selectividad por suerte se  
superpone en alguna extensión.

Un estudio comparativo de la acción inhibitoria de varios antibió-  
ticos sobre bacterias aisladas ha sido hecho por FRIGAL y HONNIT.  
A partir de 225 cultivos faringeos, logrados de 163 pacientes con  
enfermedades respiratorias, obtuvieron 561 cultivos aislados. Estos  
fueron expuestos a la acción inhibitoria (in vitro) de la bacitra-  
cina, penicilina, estreptomicina, aureomicina y cloromicetina.

El procedimiento bacteriológico seguido por FRIGAL y HONNIT fue  
el siguiente: se usaron hisopos secos estériles para raspar las re-  
giones de las amígdalas en ambos lados de la faringe, se colocaron  
en 5 cc. de caldo nutritivo que contenía 0,1 % de glucosa y se incu-  
baron a 37,5 °C durante 6 a 8 horas. Usando 0,2 cc. del caldo se hi-  
cieron subcultivos a tubos con caldo de ensayo de antibiótico en los  
que el volumen final, con el agregado de todos los reactivos, era de  
10 cc.. Las soluciones respectivas de antibióticos se prepararon pre-  
viamente y se mantuvieron a - 50 °C, de modo que un cc. descongelado  
y agregado al tubo de cultivo daba la concentración final estableci-  
da. Al mismo tiempo se hicieron estrías en una placa de agar sangre.

Los tubos y las placas se incubaron a 37,5 °C y se observaron a las 8 y 20 horas.

Se hicieron extendidos de colonias sobre la placa, y de los tubos que mostraban crecimiento. Cuando se necesitaban subcultivos para identificar con mayor exactitud los organismos, se hacían los repiques en medios diferenciales; es decir, los bacilos Gram negativos se transfirieron a medios azucarados apropiados para su identificación.

En los estudios de inhibición, los tubos que contenían los organismos suspendidos en la soluciones de los distintos antibióticos, fueron examinados a intervalos de 6 a 8 horas, y de 20 a 24 horas después de inoculados.

Aunque algún organismo era inhibido totalmente en las primeras 6 a 8 horas se notó a veces que esta inhibición era vencida y el crecimiento se evidenciaba netamente a las 20-24 horas. La inhibición se informaba como temporaria. Se notó también inhibición parcial en la cual, a pesar de no notarse crecimiento a las 6 a 8 horas, se apreciaba un crecimiento pobre a las 20-24 horas. Cuando se evidenciaba inhibición parcial o temporaria, los organismos se identificaban por extendidos teñidos; en estos informes, todos los organismos que no fueron totalmente inhibidos en ambos períodos de observación, se informaron como no reactivos respecto del antibiótico específico utilizado.

ALLEN y ROBERT arribaron, luego de clasificar y estimar la frecuencia con que los organismos obtenidos de cultivos faringeos aparecían en sus experiencias, a las siguientes conclusiones:

Los organismos más comúnmente encontrados eran: estreptococos, 81 %, estafilococos, 71% ; catarralis, 49% y neumococos, 26%.

Las variedades hemolíticas de estreptococos se presentaban con una frecuencia de 17% y estafilococo hemolíticos, 24%. La alta frecuencia del *Streptococcus vulgaris* (15%) y bacilo coliforme (4%) puede explicarse por el hecho de que muchos pacientes habían sido tratados previamente con penicilina o bacitracina o combinaciones de estas, las cuales inhibían la flora habitual y daban por resultado un crecimiento de organismos Gram negativos no sujetos a inhibición por estos antibióticos.

En los estudios de la acción inhibitoria de penicilina, bacitracina y estreptomocina contra 564 cultivos aislados (Tabla 1) se notó que había considerable superposición de la actividad de los tres antibióticos, dado que un 54% eran igualmente sensibles a penicilina, bacitracina y estreptomocina. Penicilina y bacitracina se parecían mucho en su actividad inhibitoria: eran igualmente efectivas en un 61% de los organismos cultivados; sin embargo, cada uno puede ser efectivo donde el otro no lo es (penicilina, 11,5% y bacitracina, 11%).

A veces solo un antibiótico es eficaz (penicilina, 0,4%; bacitracina, 1% y estreptomocina, 5%), lo cual indica el valor de los cultivos y tests inhibitorios en pacientes que no responden a tratamientos con algunos antibióticos.

Nuevamente, en estos estudios se demostró que la estreptomocina era extraordinariamente potente, y se debía sin duda a los muchos cultivos de post tratamientos en los que los organismos Gram negativos aparecían por primera vez después de la terapia con aerosoles a base de penicilina o bacitracina, simples o combinadas.

La Tabla 1 no sólo indica sino que identifica el número de organismos inhibidos por cada antibiótico comparado con cada uno de los otros agentes. Particularmente digna de atención era la actividad de la estreptomocina contra estafilococos hemolíticos que no respondían ni a penicilina ni a bacitracina. Esto es de importancia porque este organismo se encuentra frecuentemente en infecciones crónicas rino-respiratorias y ordinariamente es difícil de extirpar. Esto recalca nuevamente la necesidad de realizar tests inhibitorios. La mera identificación del organismo como un estafilococo hubiera indicado el uso de penicilina o bacitracina, pero ninguna de estas drogas mostraba actividad contra los 4 estafilococos hemolíticos que fueron cultivados.

En agudo contraste ni penicilina ni bacitracina mostraban ninguna actividad contra los organismos Gram negativos.

De interés especial era el grupo de 13 organismos (3,2%) no inhibido por penicilina, bacitracina o estreptomocina indicando una posible explicación de la falla de la terapia así como la necesidad de otros antibióticos.

Como se revela en la Tabla 1, la mayoría de estos organismos (10) estaban en el grupo Gram negativo poniéndose de manifiesto la falla de

estreptomocina, e indicando la necesidad de otro antibiótico para este grupo. Tre s aislados de neumococos, dos estafilococos hemolíticos y un estreptococo alfa-hemolítico también aparecen en este grupo resistente, explicando algunas fallas clínicas y los peligros implicados a menos que se encuentren antibióticos nuevos y efectivos pues pudieran extenderse más estos microorganismos.

En la realización de estos tests inhibitorios, los organismos se se expusieron a una concentración de una unidad de penicilina o 10 microgramos de los otros antibióticos.

En series menores (164 aislados decultivos) fue posible comparar la acción inhibitoria de aureomicina y cloramfenicol, así como la de penicilina, bacitracina y estreptomocina. La Tabla 2 revela que, de los nuevos antibióticos, bacitracina (82%) y aureomicina (80%) son altamente efectivos. El cloramfenicol era de pobre reacción (37%) comparado con cualquiera de estos o con estreptomocina (72%) o penicilina (73%).

No se observaron organismos que fueran inhibidos solamente por el cloramfenicol. Todos los otros antibióticos mostraban alguna acción inhibitoria exclusiva, indicando utilidad especial.

Se encontraron tres organismos insensibles a cualquiera de los 5 antibióticos estudiados (2 cepas de *S. vulgaris* y 1 *Micrococcus tetrágenus*). Había por lo tanto una reducción de no reactores desde 3,2% a 1,0% por el agregado de aureomicina y cloramfenicol (comparar con Tabla 1). Era muy satisfactorio comprobar que no había neumococos, estreptococos ni estafilococos en este residuo cuando se usaban todos estos antibióticos.

Con todo esto se demostró la necesidad de hacer en el laboratorio pruebas de inhibición para encontrar una antibióticoterapia adecuada.

Algunas cepas de bacterias dentro de especies normalmente sensibles parecen adquirir resistencia frente a un antibiótico particular, por lo tanto el conocimiento de la acción de un determinado antibiótico permite al médico escoger otro o una combinación que produzca un resultado favorable. Sin embargo, la elección del antibiótico o de la combinación de antibióticos correcta, debe determinarse por verdaderos ensayos de laboratorio que puedan identificar al microorganismo causante y determinar su sensibilidad a los antibióticos.

efecto de antibióticos inhibidos o identificados de los aislados

Inhibido por	Antibióticos										Bacilos Grama no pativoo P. vul	TOTAL	Porcentaje del total de aislados de los inhibidos
	Penicilina	Streptomycin	Tetracycline	Sulfadiazine	Sulfathiazole	Sulfamethoxazole	Chloramphenicol	Neomycin	Polymyxin B	Colistin			
Penicilina solamente	0	1	3	0	0	0	0	0	1	1	0	6	1.2
Penicilina solamente	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0.4
Streptomycin solamente	0	0	0	4	0	1	2	0	1	1	13	27	4.8
Tetracycline pero no por penicilina	1	2	18	19	13	0	5	19	1	1	2	62	11.0
Penicilina pero no por bacitracina	1	9	15	5	9	2	11	11	1	1	1	65	11.5
Sulfadiazine por tetracycline y penicilina	3	25	96	35	75	12	80	30	7	7	9	375	66.5
Streptomycin pero no por estreptomycin	1	11	34	4	6	1	1	14	2	2	0	74	13.2
Polymyxin B pero no por estreptomycin	1	9	37	7	4	1	3	15	1	1	0	70	13.0
Sulfamethoxazole por tetracycline y estreptomycin	3	18	80	37	88	11	81	28	7	7	15	366	64.9
Sulfathiazole por penicilina, streptomycin y bacitracina	2	16	65	27	70	11	80	18	6	6	9	344	53.9
No inhibido por penicilina, bacitracina o estreptomycin	0	1	1	2	0	0	0	3	1	1	10	18	3.2

La concentración de antibióticos por c.c. en el caldo de cultivo final, para los cultivos de inhibidos, fueron: bacitracina y estreptomycin 10 µg.; penicilina 1 unidad

T A B L A N°2

Número de aislados inhibidos e identificados de los aislados

Inhibidos por	ESTREPTOCOCCOS - STREPTOCOCCUS		No base Bacilli so base Difteria		Micrococci		TOTAL	Porcentaje del total de aislados identificados.		
	Streptococcus	Streptococcus	Micrococci	Micrococci	Micrococci	Micrococci				
Bacitracina	2	25	10	32	2	21	50	7	135	82.3
Penicilina	2	23	8	26	2	21	28	4	128	73.2
Estreptomicina	0	18	10	30	3	21	21	3	118	72.0
Aureomicina	0	26	9	32	2	21	27	4	131	80.0
Clorotetracina	0	11	3	14	2	20	8	2	61	37.2
Bacitracina solamente	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1.2
Penicilina solamente	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0.6
Estreptomicina solamente	0	0	0	0	1	0	1	0	6	3.6
Aureomicina solamente	0	0	0	0	0	0	3	3	6	3.6
Clorotetracina solamente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No inhibidos por ninguno de los cinco antibióticos	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1.8

La concentración de los antibióticos por cc. en el caldo de dilución final, para los estudios de inhibición, fueron: bacitracina, estreptomicina, aureomicina y clorotetracina, 10 µg. c/uro; penicilina 1 unidad.

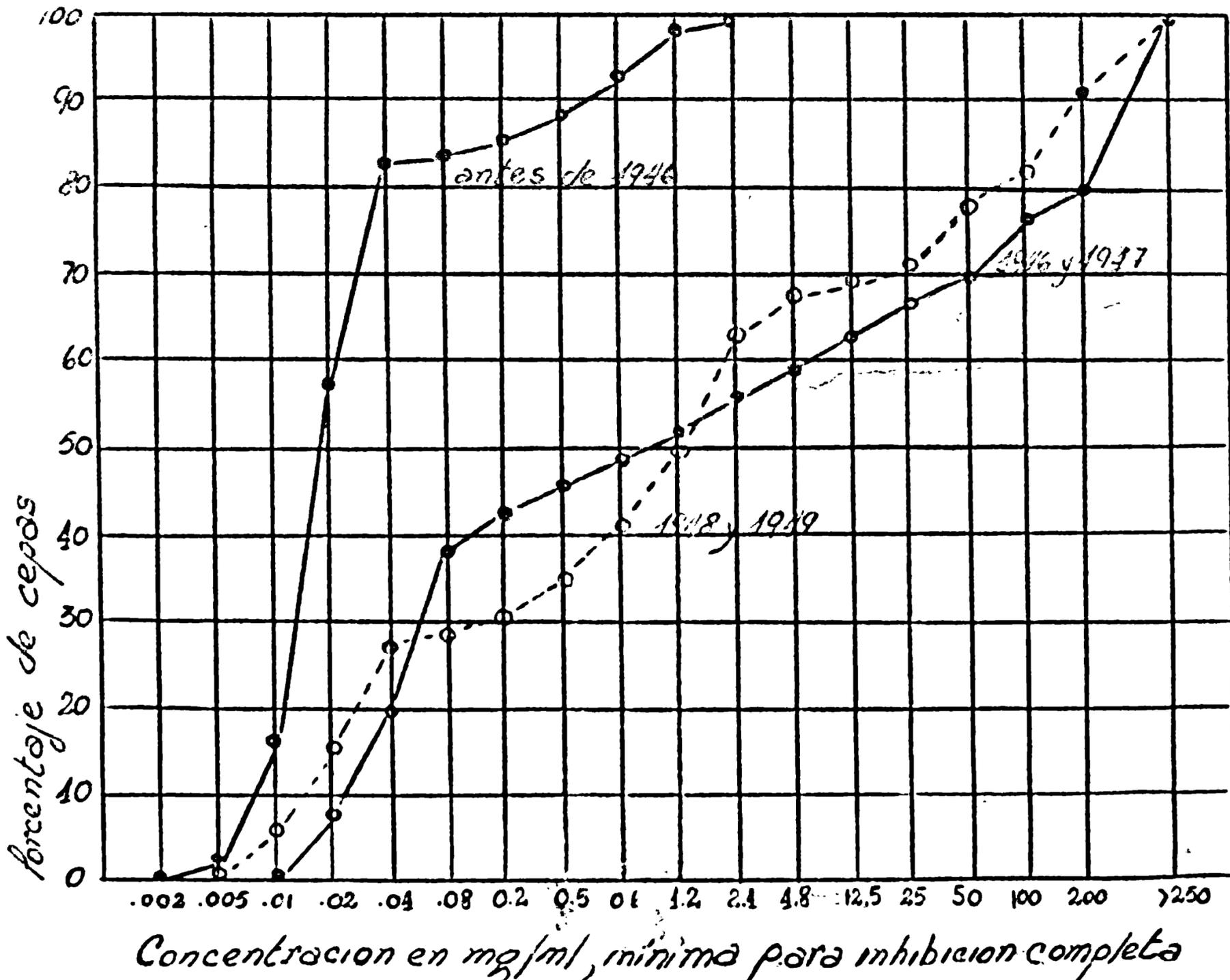
Resistencia bacterial adquirida hacia los antibióticos:

Un factor más bien de confusión en la antibióticoterapia ha sido la observación de la resistencia rápida y creciente de ciertas cepas de bacterias para los antibióticos primeramente conocidos; esto se ha visto especialmente en la resistencia del estafilococo a la penicilina, observado en los últimos años; este fenómeno ha sido señalado por muchos investigadores, como PHILIPPS y MAYER y JACOBSON entre otros. Como una medida de esta resistencia PHILIPPS, MAYER y JACOBSON han comparado la sensibilidad hacia la penicilina de numerosas cepas de estafilococos separados o aislados en períodos sucesivos en los últimos años. En el siguiente gráfico los datos son separados en tres períodos:

- 1) Cepas aisladas antes de 1946.
- 2) Cepas aisladas durante 1946 - 1947.
- 3) Cepas obtenidas entre el 1 de enero de 1948 y noviembre de 1949.

El porcentaje acumulativo del total de cepas resistentes a dosis crecientes de penicilina son comparadas.

La diferencia de sensibilidad con el transcurso del tiempo, es fácilmente observable en el gráfico.



MELIKSY, JOHNSON y TING han tabulado observaciones similares entre los años 1947-1951 que se pueden observar en el cuadro siguiente:

TABLA 3

Incremento de la resistencia a la penicilina del  
Stafilococcus aureo - Coagulasa-positiva.

<u>Año</u>	<u>Número de cepas</u>	<u>Porcentaje de resistencia</u>
1947-48	386	17,8
1949	323	29,1
1950-51 <sup>1</sup>	261	43,5
1951 <sup>2</sup>	293	43,0

1) : Fines de 1950 y enero de 1951.

2) : Julio- agosto- setiembre de 1951.

Los valores sugieren que este proceso debe llegar luego a una detención, pero como los casos vienen por tratamiento solamente, puede esperarse que la mitad, por lo menos, respondan a un tratamiento por la penicilina.

PULASKI presenta los siguientes datos de resistencia a la penicilina observados en sus experiencias, que se aprecian en el siguiente cuadro:

TABLA 4

Incremento anual sucesivo de la resistencia del  
Stafilococcus a la penicilina

<u>Año</u>	<u>Número de cultivos</u>	<u>Porcentaje de sensibilidad</u>
1947	239	81
1948	136	73
1949	263	62
1950 (5 al 12)	160	67

-----

DAVIDSON encontró en 1949, que los niveles de penicilina en sangre debían ser quince veces más altos, que en 1946, para inhibir el crecimiento de 81% de un coco Gram positivo encontrado en exudados nasales. Los resultados se aprecian en el cuadro siguiente:

TABLA 5

Cultivos de pus de nariz en casos de sinusitis supurativa crónica o aguda- Placas de agar sangre, tratadas con penicilina indicando el incremento de la resistencia a la penicilina.

Año	-	Número de cultivos	-	Cosos Gram positivos inhibidos por 0,2 U./cc de penicilina.
1945	-	19	-	80%
1946	-	44	-	32%
1947	-	33	-	60%
1948	-	46	-	26%
1949	-	48	-	12%

Así respecto a las infecciones estafilocócicas en general la utilidad de la bacitracina como antibiótico efectivo es de especial conveniencia. El rápido incremento en el desarrollo de la resistencia de varias cepas bacterianas especialmente gonococos y meningococos hacia la estreptomicina es conocida desde hace tiempo. MILLER Y DONOFF.-

Además, estos mismos autores han informado el aislamiento de variantes de meningococos no solamente resistentes a la estreptomicina sino capaces de desarrollarse en su presencia.

Requisitos para una antibioticoterapia adecuada

El advenimiento de los mas nuevos agentes quimioterápicos y de antibióticos han provocado un profundo cambio en el concepto de los tratamientos de las infecciones.

Mientras la medicina moderna en general ha mostrado, una tendencia hacia un tipo de medicación más específica, la aparición de un nuevo grupo de agentes terapéuticos mas nuevos, como los antibióticos por ejemplo, siempre provoca la tentación de un uso exagerado.

Cierto es, que muchas enfermedades son siempre acompañadas por síntomas reconocidos, y una medicación adecuada puede indicarse inmediatamente en base a esos síntomas; así, muchas infecciones leves y agudas sin complicaciones, responden prontamente a una administración empírica de antibióticos de uso general. Por otra parte, cuando se encuentra con una infección de origen bacteriano incierto, el clínico puede tratar de deducir el agente causal por los síntomas clínicos y administrar el antibiótico efectivo contra la mayoría de las cepas de este organismo.

Este procedimiento no es siempre efectivo por las causas siguientes:

- 1-) Muchas infecciones son causadas por una variedad de microorganismos con susceptibilidad quimioterápicas muy diferentes.
- 2-) Aun cuando las especies del agente causante pueden conocerse, copias individuales dentro de una especie simple, pueden mostrar variaciones notables e imprevistas en su susceptibilidad para algún antibiótico.
- 3-) La susceptibilidad cambia constantemente.

Dado que cada problema de población bacteriana es heterogénea, la exposición a un solo antibiótico puede dar por resultado la inhibición del organismo más susceptible y la supervivencia de las mutaciones más resistentes contra las cuales el antibiótico es ineficaz.

El uso adecuado del antibiótico requiere una guía bacteriológica. En muchas ocasiones, WHELAN ha recalorado la importancia de la cooperación entre el clínico y el laboratorio para el control de infecciones quirúrgicas.

Una editorial de J.A.M.A. del 1 de diciembre de 1951 sugiere que el máximo de eficacia en la antibioticoterapia puede obtenerse solamente por la determinación rutinaria *in vitro* de la sensibilidad de un organismo causante con un antibiótico susceptible. SPAULDING Y ANDERSON evaluaron el método del disco para la determinación de la susceptibilidad de microorganismos para los antibióticos, a fin de seleccionar la droga más efectiva para el tratamiento de ciertos tipos de infecciones. Ellos han encontrado que siempre que el organismo causante haya sido aislado los resultados obtenidos por el método del disco se corresponden con la experiencia clínica. El método tiene un cierto margen de tolerancia, dado que los resultados observados (diámetro de la zona de inhibición) pueden depender de:

- 1-) El tamaño del inóculo.
- 2-) Período de incubación
- 3-) Elección de la inhibición total o parcial como punto final.
- 4-) Variaciones en el medio.
- 5-) Difusibilidad del antibiótico.
- 6-) La concentración de la droga en el disco.

La correlación cuantitativa entre el ensayo in vitro y el dosaje requerido in vivo no es de valor fundamental, dado que lo que realmente importa es la naturaleza y gravedad de la infección.

Su mayor valor parece residir en la indicación de que el organismo aislado es o no sensible al antibiótico. Como regla general, aquellos que no muestran ninguna zona en el ensayo, es probable que no respondan clínicamente a aquel antibiótico.

Las bacterias que son ligeramente susceptibles, requieren, o grandes dosis de un solo antibiótico o dosis moderadas de dos o mas drogas en combinación, si esa ligera susceptibilidad vale también para otros antibióticos. Parece mas aconsejable administrar una combinación de drogas levemente inhibitorias en dosis moderadas, que incrementar la administración de una sola de ellas; esto se basa en la observación de que dos antibióticos que son solamente bacteriostáticos, cuando se presentan solos, pueden tener actividad bactericida cuando se hallan combinados, de acuerdo a los trabajos de JANETZ, GUNNISON Y COLEMAN.

Una de las mayores ventajas de los ensayos de sensibilidad, es su aplicación en el tratamiento de las infecciones que vuelven después de una mejoría clínica definida.

En muchos casos, el agente causante es susceptible al antibiótico empleado y desaparece, pero es reemplazado por un tipo diferente y resistente que puede producir cambios en el caracter de la infección. Resulta obvio así, que el ensayo de susceptibilidad es útil como una guía en las pruebas iniciales y como seguridad durante el tratamiento.

Una comparación de los varios métodos de determinación de sensibilidad de las bacterias para con los antibióticos in vitro, ha sido informado por JACKSON Y FINLAND. Como es de suponer, ocurren discrepancias entre el ensayo con discos y la subsiguiente respuesta clínica.

Muchos factores en el paciente, tal como la velocidad de absorción, difusión y excreción pueden intervenir, disminuyendo o aumentando la efectividad in vivo. Ha habido casos en que a pesar de que solamente se aislaron bacterias susceptibles no hubo mejoría, a pesar de usarse el antibiótico inhibidor in vitro, los factores responsables de tal cosa, pueden ser los siguientes:

- 1-) que el organismo causante no haya sido aislado.
- 2-) que las dosis hayan sido inadecuadas.
- 3-) que hayan aparecido cepas bacterianas resistentes.
- 4-) que la flora bacteriana original haya sido reemplazada por otra mas resistente.
- 5-) que un impedimento mecánico o anatómico limite el acceso de la droga al sitio de infección.

A estas conclusiones arribaron SPAULDING Y ANDERSON.

Se debe admitir que los microorganismos no son ordinariamente destruidos in vivo por drogas bacteriostáticas. El rol de tales drogas en la curación, es de inhibir el crecimiento y aumentar así la eficacia de la fagocitosis y otros mecanismos de defensa del organismo.

Historia de la bacitracina

La bacitracina fué descubierta por la señorita BALBINA A. JOHNSON en el laboratorio de investigaciones bacteriológicas del departamento de cirugía de la Universidad de Columbia, en Junio de 1943, mientras realizaba estudios sobre prevención de infecciones en heridas accidentales graves, bajo la dirección del Dr. FRANCIS L. HELENEY. Se había pensado, que en el conjunto de la flora bacteriana de esas heridas, sería posible demostrar cierto sinergismo o antagonismo bacterial. Así puede demostrarse cierta acción recíproca entre bacterias sobre placas de agar-sangre, cuando colonias de dos especies diferentes están en yuxtaposición.

El organismo que produce bacitracina es un bacilo Gram positivo aeróbico, productor de esporas, que se extrajo del tejido eliminado en una fractura expuesta de la tibia de una niña de siete años llamada MARGARITA TRACY, y es por ello precisamente que el antibiótico se denominó bacitracina.

Es un miembro del grupo *Bacillus subtilis* y mas tarde se lo clasificó con mayor exactitud como la variante *Bacillus licheniformis*, observándose que el filtrado de un cultivo de este organismo tiene un espectro antibacterial extenso. Luego, solicitóse al Profesor HANS CLARKE, de la cátedra de bioquímica del Colegio de Médicos y Cirujanos, que colaborara en un estudio mas amplio de este antibiótico, y el asignó al Dr. HERBERT ANKER la tarea de concentrar y purificar el principio activo; en breve plazo, se produjeron soluciones cien veces mas concentradas. Este producto era efectivo para combatir infecciones, tanto en animales pequeños como en el hombre sin mostrar signos de toxicidad.

El primer caso humano fué tratado el 11 de Octubre de 1943 por inyección del filtrado crudo en el centro de un forúnculo de la nariz, produciéndose una pronta resolución de la infección, y el primer informe publicado sobre el uso clínico de la bacitracina apareció en Octubre de 1945, por los Dres. JOHNSON, ANKER Y HELENEY/-

En enero de 1946 comenzó la producción de bacitracina, interesándose mucho en ella el ejército de los Estados Unidos.

Así, se hicieron convenios con unidades clínicas de Nueva York, Filadelfia, Nueva Orleans, Cincinnati, San Antonio, Rochester, Minnesota, Charlottesville y Baltimore, para lograr una valoración clínica de la bacitracina. Al mismo tiempo agregóse la ayuda de gran número de fabricantes farmacéuticos con experiencia en antibióticos para desarrollar métodos de producción en gran escala, de modo de poner lo mas pronto posible, cantidades suficientes de buen material para incrementar la investigación sobre el mismo.

Como hemos dicho, el primer paciente fué tratado en Octubre de 1943, y la investigación clínica progresó entonces rapidamente.

En marzo de 1947, los cien primeros casos tratados localmente con bacitracina constaron en informes de MELNEY Y JOHNSON. Así fué posible que los laboratorios de investigación industrial y la Administración de Alimentos y Drogas reunieran en Enero de 1948, los exámenes y ensayos de bacitracina. Especificaciones de pruebas respecto a potencia, estabilidad, solubilidad, toxicidad, efecto activante, deprimente y pirogénicas fueron aprobadas; por ejemplo: una potencia de 30 unidades por mg.; una solubilidad de 10.000 unidades por cc.; para la estabilidad del polvo liofilizado, un año a temperatura ambiente; para toxicidad intravenosa, una dosis letal cero ( $DL_0$ ) de 100 unidades para un ratón de 20 gs. y una dosis letal cincuenta ( $DL_{50}$ ) de 200 unidades.

En Enero de 1948, se dispuso de la primera bacitracina producida por el método en profundidad.

El 5 de Marzo de 1948, se realizó en el Hospital Presbiteriano de Nueva York, lugar de nacimiento del antibiótico, la primera reunión dedicada exclusivamente a la discusión sobre la bacitracina, asistiendo a ella representantes de diversas unidades clínicas. Esta reunión fué un acontecimiento histórico en el progreso del desarrollo de la bacitracina marcando la necesidad del estudio de este nuevo antibiótico, desde el laboratorio hasta la fase clínica de su evolución y demostrando claramente que la bacitracina era efectiva en el tratamiento de las infecciones humanas.

El Dr. HANS CLARKE del departamento de química del Colegio de Médicos y Cirujanos, describió estudios sobre extracción y purificación;

los Dres. L. C. CRAIG, G. T. BARRY y J. D. GREGORY, del Institute Rockefeller para la Investigación Médica, informaron sobre los constituyentes químicos del antibiótico.

El Dr. HARRY EAGLE del Laboratorio de Terapéutica Experimental de la Escuela de Higiene JOHN HOPKINS, presentó estudios experimentales sobre la eficiencia terapéutica de la bacitracina en casos de sífilis humana y en el conejo.

BALBINA A. JOHNSON, el Dr. REISNER y la Srta. M. SCUDY del Laboratorio para Investigación Bacteriológica del Departamento de Cirugía del Colegio de Médicos y Cirujanos, bosquejaron estudios sobre toxicidad letal en ratones mediante inyecciones subcutáneas repetidas. El Dr. JOHN LOCKE del Departamento de Oftalmología, describió su trabajo con infecciones experimentales en la cámara anterior del ojo, en conejos.

Los Dres. J. L. MILLER y M. SLATKIN y Srta. JOHNSON del Departamento de Dermatología y Cirugía, describieron estudios de la bacitracina en infecciones piógenas de la piel.

El Dr. A. BRALEY del Departamento de Oftalmología, informó sobre los resultados clínicos de la bacitracina en aplicaciones locales en infecciones de los ojos. El Dr. F. MELLENBY informó brevemente sobre 200 casos de infecciones quirúrgicas tratadas localmente con bacitracina por inyección de la solución en las infecciones profundas, y la aplicación de ungüento o solución en las infecciones superficiales; describieron las experiencias clínicas los Dres. ALFRED LONGACRE, de la Universidad del Estado de Louisiana, H. ZINTEL de la Universidad de Pennsylvania, R. NICHOLS de la Clínica Mayo y E. PULASKI del Hospital General BROOKS de San Antonio. Todos ellos coincidieron en que la bacitracina era eficaz en una variedad grande de infecciones y que su efectividad aumenta en razón directa a su concentración.

Los inhibidores de la acción de la bacitracina son escasos y las reacciones tóxicas secundarias con dosis clínicas efectivas son leves. La albuminuria que aparece en pacientes con dosis clínicamente efectivas es transitoria, salvo en casos excepcionales. Las manifestaciones alérgicas son mínimas y el desarrollo de la resistencia de la bacteria a la droga es muy bajo; finalmente, se ha evidenciado una acción sinérgica de bacitracina con penicilina.

Al analizar la Historia de la Bacitracina, se debe señalar la labor del Dr. F.L. MILLENY, quien encabezando un grupo de investigadores demostró mediante sus trabajos, la eficiencia de la bacitracina como antibiótico de primera línea y la impuso en el campo médico.

La bacitracina figura como antibiótico certificado en el acta de Alimentos, Drogas y Cosméticos, en Junio de 1949 en los Estados Unidos.

CAPITULO QUINTO

PRODUCCION EN LABORATORIO

La bacitracina es producida por un gérmen Grama positivo, un bacilo aerobio, perteneciente al grupo *Bacillus licheniformis*.

Mientras que la literatura original se refiere al bacilo como un miembro del grupo subtilis, el Dr. KEITH BURGON, de la Universidad Baylor, estudió las características culturales de este organismo y posteriormente lo clasificó como variedad *licheniformis*. Esta clasificación fué confirmada más tarde por W.R. SMITH, del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

El principio activo es segregado en cualquier medio donde crezca el organismo, pero la cantidad de antibiótico producido, depende de la composición de ese medio, de las condiciones del inóculo y de las circunstancias de incubación.

El organismo forma una gruesa película sobre la superficie del medio de cultivo, pero muy poco principio activo puede obtenerse de la masa bacteriana; este se encuentra en el filtrado o en el medio decantado, resultante del pasaje a través de un filtro bacterial.

NEUBER, JOHNSON, GOLDBERG, y WELLSY prepararon el siguiente medio sintético para el cultivo en superficie:

	<u>g/l.</u>
Acido l-glutámico	5,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,01
NaCl	0,01
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{CuSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01
$\text{Ca}(\text{PO}_4\text{H}_2)_2$	2 ml. de solución saturada en agua destilada.

El pH del medio se ajusta a 6,8-7,0 con NaOH y se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión durante 20 minutos.

Los inóculos pueden ser de tres tipos:

1-) Cultivo de 3 días en superficie de agar triptona.

2-) Cultivo de 3 días en caldo de triptona al 1%.

3-) Suspensión de esporas.

Los cultivos son incubados a 30°C durante 3 a 5 días.

El antibiótico se extrae por diversos métodos, del líquido separado por decantación del medio de cultivo, al que se filtra por super cel. La producción por cultivo superficial en medio sintético sin movimiento, da títulos bajos como para permitir su industrialización.

Dado que el crecimiento de los organismos es rápido y su actividad grande, cuando se lo aerea vigorosamente en cultivos en profundidad, se hicieron tentativas de producción con este tipo de cultivos, las primeras de las cuales fracasaron, pero actualmente se obtienen caldos crudos ricos en bacitracina. Esto ha llevado a industrializar este método de obtención.

Las condiciones generales y exigencias nutricias que se deben considerar para la obtención de bacitracina por cultivo en profundidad fueron estudiadas por DAVID HENDLIN.

#### Condiciones generales

Medio: HENDLIN ha utilizado una modificación del medio primitivo de AMER, JOHNSON, GOLDBERG y HELENY, que es la siguiente:

Acido l-glutámico	10,0	g.
Glucosa	5,0	g.
Acido cítrico	1,0	g.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	g.
NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	g.
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,2	g.
MnSO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0,01	g.
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,01	g.
Agua destilada	1000,0	cc.

El pH del medio (omitendo la glucosa) se ajusta a 6,8-7,0 con hidróxido de sodio, esterilizándose luego en autoclave durante 20 minutos, a una atmósfera de presión (15 libras).

Una vez efectuada la esterilización, se agrega asepticamente la glucosa en solución al 20 % previamente esterilizada.

Se procede en esta forma debido a que si se esteriliza en autoclave, la glucosa en presencia de fosfatos, se produce una caramelización excesiva, lo cual es tóxico para el crecimiento del germen, y como

consecuencia de ello se producen títulos bajos en bacitracina.

Todo el material de vidrio utilizado se lavó con solución ácida de dicromato de potasio y se enjuagó con agua destilada.

Inóculo: Los cultivos usados por HENDLIN en la preparación del inóculo, fueron mantenidos en un medio de agar nutriente Difco; sembrados oblicuamente fueron incubados durante 24-48 horas y almacenados en heladera hasta su uso.

Cada frasco de cultivo se inoculó con un mililitro de una suspensión de esporas, obtenida de un cultivo en agar inclinado, que contenía aproximadamente  $500 \times 10^8$  esporas por mililitro.

Incubación: Los recipientes inoculados se incubaron a 28°C y se agitaron con una máquina que producía un movimiento rotatorio de 200 revoluciones por minuto.

Determinaciones: El título de bacitracina se determinó por un procedimiento propio. Las células principales fueron determinadas turbidimétricamente.

La glucosa se determinó por una modificación del método de SOMOGGI.

El pH fué determinado potenciométricamente.

En el trabajo se hicieron varias experiencias, variando las condiciones ambientales.

El curso de la fermentación para la producción de bacitracina, puede apreciarse en el gráfico No. 1.

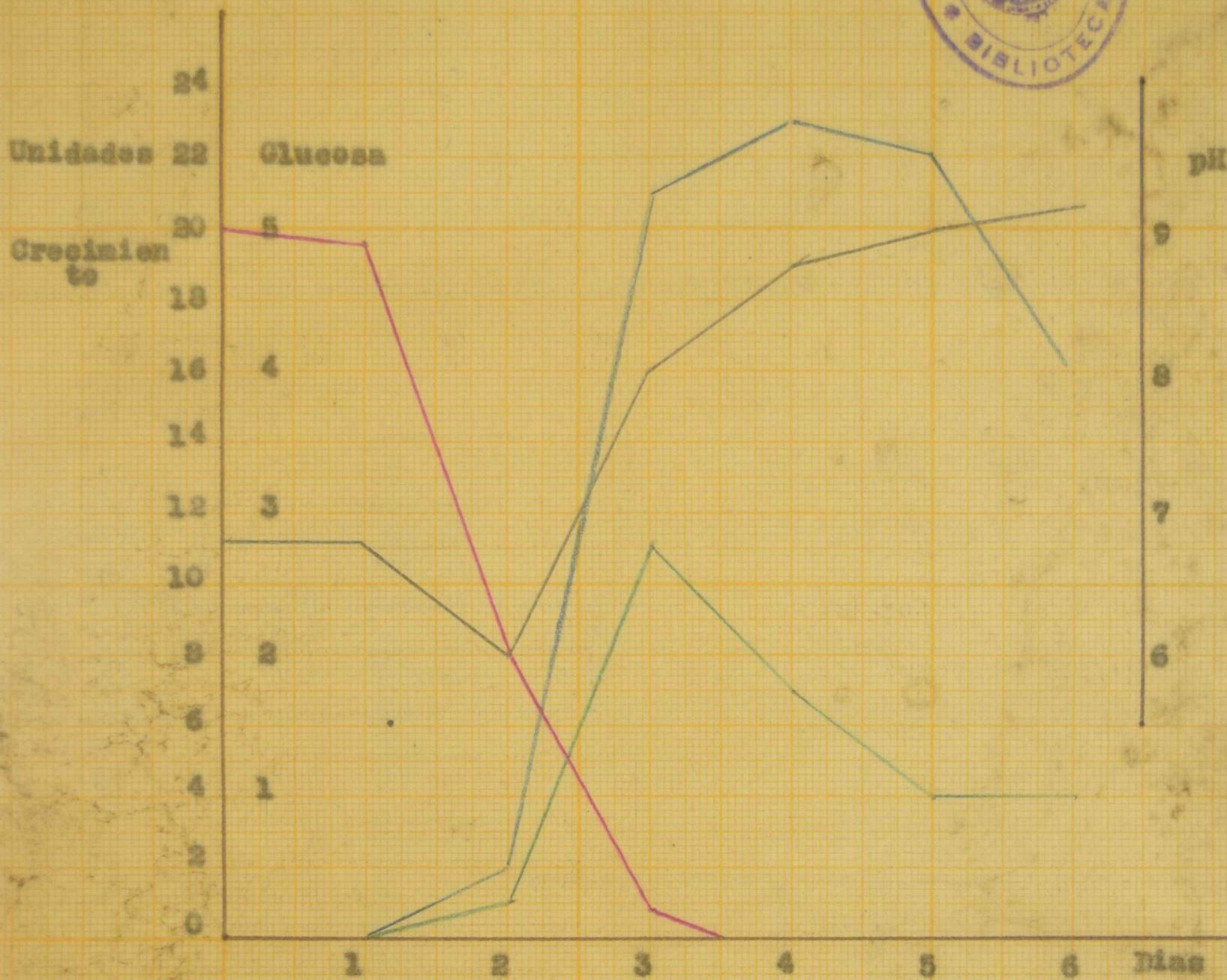
El desarrollo comienza entre el primero y el segundo día, alcanzando un máximo en el tercero, y luego en el cuarto día, decrece hasta aproximadamente la mitad del máximo.

Los títulos más altos fueron obtenidos en el tercero o cuarto día de fermentación, apreciándose después del quinto día un decrecimiento en el título de bacitracina.

El consumo de la glucosa es rápido una vez iniciado el desarrollo y se completa en el tercer día de fermentación.

El pH del medio de cultivo baja a 6,0 con la rápida utilización del glúcido, y luego sube también rápidamente al agotarse la glucosa, hasta alcanzar un valor de 9,0 a 9,5 en el cuarto día.

### Esquema general de la fermentación



- Glucosa mg/ml.
- pH
- Bacitracina unidades per ml.
- Crecimiento mg/10 ml.

## Factores Generales

Suplementación con citrato: El uso de fosfatos en presencia de iones metálicos lleva a la formación de sales muy insolubles, haciendo que dichos iones sean inservibles para el organismo. La adición de ácidos orgánicos tales como el cítrico, lleva a la formación de complejos coordinados solubles con los iones metálicos, haciéndolos útiles al microorganismo.

La adición de ácido cítrico al 0,1 % elimina la turbidez que se produce en el medio y permite una mejor reproducción del germen.

Las uniones metálicas como complejos cítricos no son útiles para algunos microorganismos, pero este no es el caso del *Bacillus subtilis*, puesto que en presencia de citrato no se produce en él ninguna deficiencia metálica.

Efecto de aereación: El efecto de aereación en la producción de bacitracina fué estudiado por HENKELIN variando las cantidades de medio en frascos Erlenmeyer de 250 cc. manteniéndose constantes las demás condiciones. Los frascos se tapaban con algodón y luego se esterilizan, obrando así el algodón como filtro estéril del aire y al variar la cantidad de medio se modifica la atmósfera de aire que mediante la agitación está en contacto con el cultivo. Se vió así que frascos con 20, 40 y 60 ml. de medio, mostraron crecimiento y producción de bacitracina, más rápido que frascos con 80 y 100 ml.

En la tabla 1 muéstrase el efecto de la aereación sobre la producción de bacitracina.

En dicha tabla y en las siguientes, los títulos de bacitracina están expresados en unidades por mililitro, entendiéndose por unidad la cantidad que diluida 1:10<sup>24</sup> en un conjunto de dos series de diluciones de caldo de carne a 20°C, inhibe completamente el crecimiento de una cepa de *Streptococo hemolítico* grupo A, cuando el inóculo usado para sembrar los tubos es 0,1 c.c. de una dilución de 10<sup>-2</sup> de un cultivo de una noche en caldo sangre.

La técnica de trabajo para esta determinación está descrita en el capítulo VII denominado Ensayos de Bacitracina.

T A B L A - 1 -

Volumen ml.	Crecimiento mg/ml. días			Título de Bacitracina unidades/ml. días			pH días		
	2	3	4	2	3	4	2	3	4
20	- 850-	840-	670	- 8,7-	22,2-	21,6	7,3-	9,1-	9,4
40	- 280-	1140-	800	- 2,0-	22,2-	24,2	6,0-	8,5-	9,2
60	- 174-	1170-	800	- 2,0-	20,8-	26,0	6,0-	8,2-	9,1
80	- 70-	780-	1010	- 2,0-	13,4-	23,4	6,3-	7,7-	8,9
100	- 45-	435-	1145	- 2,0-	10,5-	25,7	6,7-	7,5-	8,5

Las variaciones en el volumen del medio afectaban solamente la velocidad de crecimiento y producción del antibiótico, pero no tenían efecto apreciable sobre el rendimiento máximo de células y de bacitracina.

Temperatura de incubación: Mientras que los títulos máximos de bacitracina a 24°C, 28°C y 37°C en condiciones standard eran iguales, la rapidez de producción de bacitracina variaba directamente con la temperatura de incubación.

Como se indica en la Tabla 2, los títulos máximos se obtuvieron a los 1-2 días, 3-4 días y 4-5 días a 37°C, 28°C y 24°C respectivamente.

También se observó, que la pérdida de título era mas rápida a 37°C que a 28°C; así por ejemplo, de una producción máxima obtenida a 37°C en 12-24 horas, se observaba una pérdida del 50%, mientras que de una producción máxima obtenida a 28°C en un período de 24-48 horas, no se observaba pérdida apreciable..

T A B L A - 2 -

Temperatura	Crecimiento				- Título de bacitracina				pH						
	Grados C				unidades/ml.				Días						
	mg/ l. Días				Días				Días						
	2	3	4	5	2	3	4	5	2	3	4	5			
24	8-	25	-	400	-	700	2,0-	2,0-	9,8-	20,0	-	6,4-	6,2-	7,8-	8,5
23	108-	310	-	745	-	385	2,0-	9,6-	21,5-	22,3	-	6,0-	7,1-	9,1-	9,0-
37	950-	720	-	525	-	330	19,0-	9,0-	8,0-	5,3	-	8,6-	9,4-	9,6-	9,3-

Suplementación con factores de crecimiento: Mientras que el agregado de una mezcla de factores de crecimiento al medio de glutamato no tenía efecto en condiciones standard sobre el rendimiento total de células o bacitracina, reducía en cambio la fase retardada en 24-48 horas.

La composición de la mezcla de factores de crecimiento es la siguiente:

<u>Ingredientes</u>	<u>mg/ml</u>
Adenina	10,0
Guanina	10,0
Uracilo	10,0
Riboflavina	0,2
Acido pantoténico	0,2
Tiamina	0,2
Piridoxamina	0,4
Biotina	0,0002
Acido P-amino benzoico	0,04
Acido nicotínico	0,2
Acido fólico	0,002

pH inicial del medio: El *Bacillus subtilis* no se desarrolla a un pH inferior a 4,5 en condiciones comunes de trabajo. Ya a pH 5 se desarrolla pero muy lentamente, alcanzándose el crecimiento máximo al séptimo día.

También se observó que dentro de un rango de pH 5,4-8,3-, la velocidad de crecimiento no varía, y en lo que respecta a rendimiento, este es un 25% mayor a pH 7,4 y 8,3 que a 6,8 ó sea al pH a que se estabiliza el medio de cultivo al comenzar la fermentación.

Todo esto se muestra en la Tabla 3.-

T A B L A - 3 -

pH inicial del medio y producción de bacitracina

p H		Concentración máxima de células mg/. l		Actividad máxima unidades /ml.
4,5	-	0,0 <sup>a</sup>	-	0,0 <sup>a</sup>
5,0	-	1020,0	-	4,8 <sup>a</sup>
5,4	-	820,0	-	12,1
6,1	-	950,0	-	19,7
6,5	-	1030,0	-	21,6
6,9	-	910,0	-	18,0
7,4	-	900,0	-	27,3
8,3	-	920,0	-	27,9

a) Luego de incubar durante 7 días

Los otros datos fueron obtenidos en el tercer día de incubación.

Requerimientos minerales

El medio sintético de AMER y colaboradores contenía sales de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, sodio y potasio. Otras pruebas de ensayo mostraron que calcio y cobre eran innecesarios para el crecimiento y producción de bacitracina; mas aún, se demostró que los iones calcio y cobre si bien no afectaban el crecimiento del microorganismo, disminuían sensiblemente los títulos de bacitracina. Por lo tanto estas sales no se incluyen en muchos medios de cultivos

En la Tabla 4, se muestra la influencia de los iones fosfato, sodio y potasio sobre la producción de bacitracina.-

T A B L A - 4 -

Influencia de los Iones Fosfato, Sodio y Potasio sobre la producción de Bacitracina

Concentración- de fosfato(1)- mg/ml	Sal de Potasio		Sal de Sodio	
	Máxima concentra- ción celular mg/l	Actividad máxima unid/ml.	Maxima concen- tración celular mg/l	Actividad máxima unid/ml.
0,0(2)	0,0	3,0	0,0	menos de 2,0
0,1	145,0	4,0	75,0	" " 2,0
0,5	800,0	19,0	160,0	" " 2,0
1,0	700,0	19,0	160,0	" " 2,0
1,5	820,0	23,0	180,0	" " 2,0
2,0	800,0	22,9	200,0	" " 2,0
4,0	720,0	16,1	180,0	" " 2,0
8,0	800,0	16,1	180,0	" " 2,0
10,0	800,0	18,1	200,0	" " 2,0
20,0	720,0	18,9	200,0	" " 2,0
2,0(2)	800,0	21,0	850,0	21,2

(1)-Mezcla de fosfatos mono y dibásico a pH 7,0

(2)-KCl agregado ( 1,0 mg/ml )

HENDLIN llegó a la conclusión de que la adición de cloro de sodio era innecesaria dado que el hidroxido de sodio agregado para estabilizar el pH, proveía el ion sodio en cantidad suficiente.

El cloro no parece ser importante para la producción de bacitracina. En cambio el ion fosfato es fundamental; este se debe agregar como sal dipotásica pues si se lo hace como diatómica disminuye mucho el rendimiento, lo que evidencia que el ion potasio es esencial para el crecimiento del *Bacillus subtilis*.

Magnesio: El magnesio es también un elemento esencial para el crecimiento del *Bacillus subtilis*, aunque debe señalarse que la proporción óptima con que se lo incorpora al medio de cultivo, difiere si se trata del crecimiento del bacilo o de la actividad de la bacitracina producida

Manganeso: El manganeso se incorporó recientemente a la lista de iones necesarios para una producción máxima de bacitracina. En la Tabla 5 se pone en evidencia que no hay crecimiento significativo en ausencia de

manganeso, excepto cuando están presentes magnesio y hierro en grandes concentraciones.

Se observó que cantidades mínimas de manganeso tal como 0,01 microgramos, produjo casi máximo crecimiento de bacilo pero no bacitracina; en cambio con concentraciones de 0,1-0,5 se obtuvieron títulos máximos en bacitracina. Que este efecto del manganeso no se debe a impurezas en las sales del reactivo usado, se ha demostrado mediante la utilización de manganeso electrolítico.

También se observó en experiencias posteriores, que el magnesio no reemplazaba al manganeso en su acción sobre el crecimiento cuando se lo agregaba en concentraciones tan altas como 200 microgramos por mil litros, y además que la propiedad promotora sobre el crecimiento del magnesio, no podía compensarse con 50 veces la concentración óptima de manganeso.

Todo esto se puede apreciar en la Tabla 5.

Hierro: Se ha demostrado que el hierro es esencial que se halle presente en pequeñas cantidades para el crecimiento de varios microorganismos.

En varios casos se observó que el hierro agregado, si bien no afectaba significativamente el crecimiento del organismo, mejoraba los títulos de bacitracina en el medio óptimo. En este aspecto el hierro parece complementarse con el manganeso en la capacidad productora de bacitracina, pero es incapaz de reemplazarlo.

Sin embargo el manganeso, puede ser reemplazado por hierro y magnesio juntos, tal como se hizo en varios experimentos respecto al crecimiento.

También debe señalarse la circunstancia de que a pesar de obtenerse un máximo crecimiento en medios pobres en manganeso por agregado en el contenido de hierro y magnesio, no pudo hallarse bacitracina.

Algunos autores han purificado el medio de cultivo respecto al hierro; HENDLIN no lo ha hecho.

T A B L A - 5 -Concentración de Metales y Producción de Bacitracina

ug/ml.			pH final	Máxima concen- tración celular mg/ml	Actividad máxima unid/ml.
Zn	Pb	Mg			
0,0	2,5	20,0	8,6	230,0	0,0
0,01	2,5	20,0	9,3	725,0	0,0
0,03	2,5	20,0	9,4	530,0	5,5
0,05	2,5	20,0	9,4	830,0	10,5
0,07	2,5	20,0	9,4	900,0	12,9
0,1	2,5	20,0	9,4	1190,0	17,5
0,5	2,5	20,0	9,5	1010,0	20,8
1,0	2,5	20,0	9,5	1000,0	22,6
2,0	2,5	20,0	9,5	870,0	22,3
0,0	2,5	200,0	9,0	400,0	0,0
0,0	12,5	100,0	9,2	900,0	0,0
2,0	2,5	0,0	5,5	50,0	0,0
50,0	2,5	0,0	6,9	25,0	0,0

Otros metales: El agregado de zinc, molibdeno y cromo en concentraciones de dos y diez microgramos por ml. no tiene acción sobre los títulos de bacitracina o sobre el crecimiento del bacilo. En cambio, el agregado de cobre y níquel, si bien no tiene efecto en concentraciones de dos microgramos por ml., reduce los títulos de bacitracina en un 20% cuando alcanza concentraciones de 10 microgramos por ml, sin cambiar significativamente el crecimiento.

Necesidades de Carbono y de Energía: La cepa del *Bacillus subtilis* productora de bacitracina, es incapaz de desarrollarse en un medio que contenga amino ácidos como única fuente de carbono y energía.

En la Tabla 6 es dable apreciar distintas fuentes de carbono y su relación con la producción de bacitracina.

T A B L A - 6 -Fuentes de Carbono y Producción de Bacitracina

Fuentes de Carbono agregada(1)	Máxima concentración celular mg/l	Actividad máxima unid/ml
0,1% de citrato solo	500	9,0
Xilosa	1160	30,0
Ribosa	670	26,6
Arabinosa	1290	22,1
Rhamnosa	1260	36,2
Glucosa	1150	22,2
Manosa	1210	26,0
Galactosa	1230	28,7
Levulosa	1130	28,0
Maltosa	740	24,7
Sacarosa	1060	24,9
Trebalosa	560	29,0
Melibiosa. H <sub>2</sub> O	740	41,9
Celobiosa	680	24,4
Rafinosa	300	42,0
Inulina	770	23,5
Dextrina	810	25,2
Corbitol	960	25,4
Manitol	960	25,2
Inositol	1060	24,9

(1) Fuentes de Carbono en concentración del 0,5%

En medios que contenían d-arabinosa, sorbosa, lactosa, salicina, adonitol y dulcitol no se obtuvieron rendimientos significativos de bacitracina.

La glucosa y muchos otros hidratos de carbono así como ácidos orgánicos y alcoholes parecen ser rápidamente utilizados por este organismo. Conviene señalar que los hidratos de carbono se esterilizan aparte y se agregan al medio asépticamente para impedir la caramelización.

Las sales sódicas de los ácidos: acético, succínico, tartárico y glucónico, producen crecimiento y títulos de bacitracina equivalentes a la glucosa. Formiato y oxal-acetato de etilo no mantienen el crecimiento y en algunos casos aparecen como tóxicos mientras que el lactato produce títulos significativamente altos.

En la Tabla 7 constan los valores obtenidos en concentración de célula y actividad de bacitracina cuando se utilicen ácidos orgánicos como fuentes de carbono.

T A B L A - 7 -

Utilización de Ácidos Orgánicos

Fuente de Carbono agregada (a)	Concentración máxima de célula mg/l	Actividad máxima unid/ml
0,1% de citrato solo	500,0	9,0
Glucosa (control)	980,0	19,0
Formico	0,0	0,0
Acético	670,0	17,8
Láctico	1190,0	33,4
Oxálico	990,0	7,8
Succínico	935,0	19,9
Malónico	770,0	10,4
Cítrico	1150,0	21,3
Tartárico	760,0	15,3
2-ceto-glutámico (b)	740,0	14,0
Oxal-acético (c)	20,0	0,0

a)- Se agregaron los ácidos como sal sódica en concentraciones equivalentes a carbono en glucosa al 0,5%.-

b)- Agregado como sal de calcio.

c)- Agregado como sal sódica del ester etílico.

-Requerimientos de Nitrógeno: a- Nitrógeno Inorgánico. b) Aminoácidos

a- Nitrógeno Inorgánico: El *Bacillus subtilis* es capaz de utilizar amonio y nitrato como únicas fuentes de nitrógeno en el medio de sales y dextrosa; sin embargo, el crecimiento y título de bacitracina es bastante mas bajo que los de medios que contienen nitrógeno orgánico.

Así como de un medio con fosfato diamónico se obtuvieron 700 mg por litro de sustancia celular, solamente se produjeron 10 unidades por ml de bacitracina. En estas condiciones el pH es crítico.

Estos resultados se confirmaron posteriormente cuando se ensayaron sales de amonio. Así en un medio suplementado con fosfato, el fosfato diamónico era superior al sulfato de amonio respecto a crecimiento y actividad. Los valores bajos con sulfato de amonio pueden atribuirse a la acidez producida cuando se utiliza este.

b- Aminoácidos: Ácido l-glutámico, ácido d-l-aspartico, l-prolina y d-l-alanina son usados por el microorganismo para el crecimiento y producción de bacitracina, como únicas fuentes de nitrógeno. Esto puede observarse en la Tabla 8.-

Títulos de bacitracina de 25-40 unidades por ml. se obtuvieron con los dos ácidos dicarboxílicos, mientras que l-prolina y d-l-alanina solo rindieron 15-20 unidades por ml.

Los aminoácidos ~~mas~~ abajo citados no mantuvieron el crecimiento cuando se usaron como única fuente de nitrógeno; los mismos son: d-l-treonina, d-l-valina, glicina, d-l-leucina, d-l-isoleucina, d-l-norleucina, d-l-fenil alanina, beta alanina, l-lisina, l-hidroxi-prolina, d-l-triptofano, l-tirosina, d-l-metionina, l-cisteina y l-histidina.

T A B L A - 8 -

Utilización e Inhibición de Aminoácidos

Aminoácidos	Medio de glutamato (a)		Medio de sales (b)	
	Concentración celular mg/l	Actividad unid./ml	Concentración celular mg/l	Actividad unid./ml
d-l-alfa alanina	1160	12,2	830,0	13,5
d-l-ácido aspártico	1140	25,10	1020,0	23,0
l-prolina	1080	15,0	1160,0	18,0
d-l-leucina	680(c)	7,1	0,0	0,0
l-cistina	450(c)	7,3	0,0	0,0
d-l-norleucina	1360	5,3	0,0	0,0
d-l-valina	630	8,5	0,0	0,0
d-l-triptofano	0,0	0,0	0,0	0,0
Control	980	18,5	870,0	23,0

a) Aminoácido agregado en concentración del 0,5%.

b) Concentración de aminoácido equivalente a  $N_2$  en glutamato al 1%

c) Al cuarto día de incubación.

La suplementación del medio de ácido glutámico con ácido d-l-aspártico, alfa alanina o l-prolina no tenía efecto significativo sobre los títulos de bacitracina.

Cuando el medio de ácido glutámico se suplementa con cada uno de los aminoácidos no utilizables, en concentración del 0,5% no se observa cambio apreciable en el título de la bacitracina, salvo en el caso de los cinco aminoácidos siguientes: d-l-leucina, d-l-norleucina, d-l-valina y l-cistina, que reducen los títulos de bacitracina en un 50% o más; el agregado de triptofano inhibe por completo el crecimiento del organismo productor, (Tabla 8).-

De todo esto podemos sacar en conclusión, los factores que influyen principalmente en la producción de bacitracina y así se observa que el pH del medio, grado de aereación y temperatura de incubación afectan el rendimiento. El agregado de magnesio, manganeso, hierro, potasio y fósforo es esencial para el crecimiento del bacilo y producción de bacitracina, destacándose en su acción potasio y fósforo.

Como fuente de carbono y energía son necesarios diversos glúcidos, ácidos orgánicos y alcoholes.

Como fuentes de nitrógeno pueden utilizarse amonio y nitratos, ácido aspártico y glutámico, alfa alanina y prolina. Por último, la suplementación del medio básico con algunos factores tal como d-l-leucina, d-l-norleucina, d-l-valina, l-cistina y d-l-triptofano, provocan un gran decrecimiento en el desarrollo del germen y en los títulos de bacitracina.

CAPITULO SEXTO

Propiedades físicas y químicas de la bacitracina

La bacitracina tal como se la produce corrientemente, es un polvo gris claro, higroscópico y amargo. ANKER, JOHNSON, GOLDBERG y MCELLENEY, en 1943, realizaron estudios sobre la actividad de la bacitracina y encontraron que soluciones acuosas neutras o ligeramente ácidas, preparadas por concentración de un extracto de caldo de fermentación, parcialmente purificado, no mostraban cambios en su actividad después de 8 a 12 meses de conservación, cuando se mantenían en un intervalo de temperatura de 0 a 5 grados centígrados. Si la temperatura es la ambiente, en el término de 2 semanas se constató una pérdida de actividad que oscila entre 30 y 50 %. Si la temperatura se eleva a 35 -37° C, en el término de 2 semanas la pérdida de la actividad es total. Dicha solución al estado neutro, puede ser desecada sin pérdida de actividad a temperatura ambiente, conservando esa actividad si se la mantiene en recipientes al vacío.

BOND, HEMELICK y MAC DONALD en 1949 trabajaron también sobre los efectos de la temperatura en la bacitracina al estado seco, utilizando droga que contenía 25 unidades por miligramo. Vieron que la bacitracina es afectada por el calor, pero a temperaturas que podríamos considerar elevadas, ya que la experiencia nos dice que su actividad no disminuye después de almacenarse durante 15 meses a 37°C. Muestra una considerable estabilidad a temperaturas que oscilan en los 56°C y solo hay descomposición notable a las 48 horas de estar sometida a 80°C.-

ANKER, JOHNSON, GOLDBERG y MCELLENEY encontraron que soluciones de bacitracina (no indicaron concentración) eran estables en HCl N en un intervalo de temperatura comprendido entre 0 y 5 grados centígrados. En cambio a 37°C, dicha estabilidad se mantiene solo en HCl/N/100. Si el pH aumenta por encima de 9, la inactivación es total a ambas temperaturas.

En la tabla 1 se aprecia la estabilidad de la bacitracina en soluciones buffers. No está indicada la temperatura.

T A B L A -1-

pH	Actividad remanente %			
	23 hs.	71 hs.	120 hs.	143 hs.
2.4	53	37	18	-
4.4	94	83	70	-
5.9	90	73	-	45
7.9	83	56	-	31
9.0	80	27	27	-

BOND, HIEHLICK y MAC DONALD han efectuado intensos estudios sobre las variaciones que sufre una solución acuosa de bacitracina al variar el pH. y la temperatura. El uso de fosfatos en calidad de buffers no estabiliza las soluciones de bacitracina, mas que por lo que representa en su acción sobre el pH del medio.

En presencia de agua oxigenada se pierde completamente la actividad y SCUDI, CORET y ANTOPOLT en 1947 encontraron que el  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  produce solamente una inactivación parcial.

AMMER, JOHNSON, GOLDBERG y Meloney, en 1948 e IMKIEEP, BENETT, DUNLEY y SHEPARD en 1951 han suministrado datos sobre la solubilidad relativa de la bacitracina, que figuran en la tabla siguiente

T A B L A 2

Agua	:M S	Piridina	: L S
Alcohol metílico	: S	Eter	: N S
Alcohol etílico	: S	Cloroformo	: N S
" Isopropílico:	S	Benceno	: N S
" Butílico n :	S	Acetona	: N S
Ciclohexanol	: S	Acetato de etilo	: N S
Ciclohexanona	:L S	Acetonitrilo	: N S
Alcohol propílico:	L S	Nitrometano	: N S
" Isobutílico:	L S	Eter de petróleo	: N S

Referencias: M S: Muy soluble  
L S: Ligeramente soluble  
S: Soluble  
N S: No soluble

-Precipitación. Acción de los iones metálicos: La bacitracina es precipitada por sales de metales pesados. Esa precipitación es acompañada por una inactivación si se usan metales pesados que se encuentran en la zona inferior de la serie electroquímica. Por otra parte la acción de los iones Zn, que se encuentra en la zona superior de dicha serie no produce inactivación.

-Acción de los ácidos orgánicos: Ciertos ácidos orgánicos como el tánico, parasulfónico, tricloroacético, ácido benzoico, furoico y salicílico son capaces de precipitar a la bacitracina de sus concentrados y algunos de ellos hasta le quitan su actividad. El ácido salicílico de precipitados de alto título en bacitracina sin restarle actividad, lo que lo indica como método de separación. La bacitracina es también precipitada por soluciones acuosas concentradas de NaCl, acetona, sal de Reinicke y ácido mofídico.

Propiedades químicas. Estructura: Los antibióticos pueden ser groseramente clasificados desde el punto de vista químico, de la siguiente manera:

- 1-) Ácidos orgánicos, ej. penicilina.
- 2-) Bases orgánicas, ej. estreptomicina.

Amos forman sales fácilmente, lo que constituye la base del proceso de purificación.

- 3-) Polipéptidos: a) Pueden formar sales fácilmente.
- b) no pueden formar sales fácilmente-ej.: tirotricina.

La facilidad para formar sales es una consecuencia de la estructura fundamental de la molécula. Aquellos polipéptidos que poseen esa propiedad, puede suponerse que contienen grupos amino o carboxilos libres, u otros radicales capaces de formar sales. Dentro de esta clasificación no se ubica aun concretamente a la bacitracina.

Estudios de distribución en contracorriente, realizados por BARRY, GREGORY y CRAIG en 1948, demostraron en forma concluyente que la actividad del antibiótico se debía a uno o más polipéptidos, que daban fenilalanina, leucina, isoleucina, cistina (o cisteína), ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, lisina y ornitina, por hidrólisis total con HCl. -El principio activo es por lo tanto una sustancia de complejidad considerable, aunque MILENEY y JOHNSON en 1969, informaron que difunde rápidamente a través de una membrana de nitrocelulosa.

ARRIAGADA, HEATLY y SLANE (1949) y HILLS, BELTON y MATCHELY (1949) a partir de cepas del *Bacillus licheniformis*, obtuvieron un antibiótico que denominaron ayivina. Purificado por ARRIGADA, BELTON, SLANE y ARRIAGADA (1949) se demostró que estaba constituido por polipéptidos similares a los de la bacitracina y era semejante a ella en lo que respecta a las propiedades físicas y químicas. Mas tarde, ARRIGADA, BELTON, JENNINGS y WALL (1949) demostraron la semejanza de las propiedades biológicas. Todos estos estudios llevaron a la conclusión de que los constituyentes activos de la ayivina y bacitracina eran idénticos, por ello se propuso abandonar el nombre de ayivina.

Se han hecho muchos estudios para purificar la bacitracina y llegar a obtener una sustancia simple desde el punto de vista químico. Con el uso de mejores técnicas y equipos para fraccionar sustancias de esta clase, se ha querido llegar a obtener un producto cristalino, pero sin éxito hasta ahora.

CRILE, FISIGLIA, HANAUER y HERTZBERG, han trabajado con un método de distribución en contracorriente. La confiabilidad en este método como criterio de pureza, depende primeramente del número de transferencias que puedan aplicarse y de la selectividad de sistemas convenientes. Se trabajó con un conjunto de 220 tubos de vidrio, operado automáticamente y capaz de hacer miles de transferencias si fuera necesario. Como sistema de distribución ellos han elegido, teniendo en cuenta diversas razones técnicas, el formado por butanol-2 y ácido acético al 3 %. Utilizaron como carga bacitracina en cantidad de 6 g., cedida por la Commercial Solvents, y encontraron que el antibiótico comercial comprendía un componente principal que llamaron bacitracina A y cantidades variables de cuatro componentes menores, denominados bacitracina B, C, D, y E.

El componente C es un producto de transformación de la bacitracina A. La bacitracina E cristalizó fácilmente al evaporar el solvente, pero no fue muy estudiada dado que su actividad antibiótica es baja. En un principio se creyó que el componente C era idéntico a uno aislado por HERTON y ABRAHAM, pero como resultó ser distinto, lo han llamado bacitracina F.

Que la bacitracina B era un componente real, se demostró por hidrólisis total y cromatografía en papel del material del componente principal. En el diagrama cromatográfico, el componente B daba todos los puntos dados por el componente A, más otro punto adicional, cuya posición en el papel correspondía a la de la valina. Este punto valina, no es debido a este anti-

noñido; ha sido aislado en pequeña cantidad, pero hasta ahora no ha sido identificado.

Con el objeto de aislar mejor los componentes de la bacitracina, se han hecho estas corridas resolviendo las transferencias. Las bacitracinas D y E fueron eliminadas y luego de 300 transferencias se obtuvo un diagrama que presentaba un pico inconfundible conteniendo el componente B y además señalaba un mayor rendimiento en componente A esencialmente libre del B. Una parte de este material, tomado de los tubos 310 a 340, fue considerado por los autores como preparación estándar de bacitracina A. Para recuperarla, las soluciones se concentraron rápidamente en un evaporador rotatorio bajo presión reducida y una temperatura inferior a 25°C, hasta que la fase alcohólica se hubiera evaporado y la fase acuosa hubiese alcanzado aproximadamente los 200 ml. La solución entonces se liofilizó.

La análisis realizado sobre este material, dio los siguientes resultados:

Pérdida por secado a 100°C :	9,01 %
Carbono :	55,20 %
Hidrógeno :	7,30 %
Nitrógeno (total) :	15,30
Nitrógeno (Van Slyke) :	8,20 %
Nitrógeno (anidas) :	6,99
Azufre :	8,20 %

El material liofilizado se redistribuyó en el sistema de ácido acético y se obtuvo un diagrama que no indicaba transformación durante la aislación. Tampoco se observó cambio en el diagrama después de conservar el material a 6°C durante varios meses, lo que no sucedía en las experiencias realizadas con un preparado crudo.

El residuo contenía un exceso de ácido acético que se eliminaba disolviendo el producto en un pequeño volumen de metanol y precipitando el péptido por agregado de la solución a acetona. Después de 2 ó 3 precipitaciones se obtuvo un producto que parecía ser sólo levemente soluble en agua. Este tratamiento no influía en la actividad del antibiótico. Cuando se lo refería a peso seco (secado a 100°C y 0,2 mm. de presión) se obtuvieron regularmente valores que se aproximaban a las 50-60 unidades por miligramo. Sin embargo era previsible que este material perdiera su actividad gradualmente, debido a la formación espontánea de bacitracina C.

El rendimiento del material obtenido por liofilización, del corte de tubos 310 a 340, era aproximadamente de 2 gramos. Esta preparación standard ha sido estudiada ulteriormente en otros sistemas, incluyendo el formado por alcohol isomilico-n-butanol-fosfato buffer, que utilizaron en 1950 NEWTON y ABRAHAM. Los autores de este trabajo no han llegado a las mismas conclusiones respecto al efecto de este sistema.

Una corrida con 200 mg. de la preparación standard de bacitracina A, a las 106 transfluencias dió un diagrama en el que no parecía ninguna banda discontinua a la derecha, sino solamente un apéndice, que parecía ser típico de una distribución oblicua o de una transformación durante la corrida. Esta última posibilidad parece ser la responsable, dado que el material recuperado a partir de esa porción del diagrama, mostraba al ensayarlo, una actividad antibiótica baja, que era semejante a la de la bacitracina C. - WEISIGER demostró que si se deja bacitracina A a temperatura ambiente durante varios días en una solución de fosfatos a pH 7 o algo superior, se convierte parcialmente en bacitracina C. - En vista de estos resultados, los autores no consideran al sistema fosfato como adecuado para la caracterización precisa de la bacitracina A.

La bacitracina B no parece derivar de la A, dado que contiene un residuo de aminoácidos adicional, como se observa en la cromatografía en papel.

Que la preparación standard de bacitracina A de estos autores, se aproxima a un grado aceptable de pureza química, se ha visto confirmado por experimentos extensivos de hidrólisis y determinación cualitativa de los residuos de aminoácidos, y por estudio del peso molecular con el método de sustitución parcial de BATTERSEY y CRAIG (1952).

En este trabajo, los autores han realizado también mediciones del espectro de absorción. Todas las medidas se hicieron en el espectrofotómetro BECKMAN, de cuarzo. Una solución acuosa de la preparación standard, que contenía 1 mg por ml. en agua, dió una curva que

presentaba un máximo débil en la región de 250-255 milimicrones. Al continuar los trabajos resultó evidente que esta absorción característica, era causada por una disposición químicamente activa de uniones desconocidas, dado que casi todas las transformaciones demostrables por características de distribución, actividad antibiótica, etc., daban por resultado la pérdida de ese tipo especial de absorción. Así, si se disolvía bacitracina A en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M, en una concentración de 1 mg./ml. y se medía inmediatamente la absorción, se obtenía la misma curva que cuando el solvente era agua. Pero dejándola varios días a  $24^\circ\text{C}$  se obtenía una curva distinta, donde el máximo se eliminaba por completo.

La bacitracina C, en concentración de 1 mg/ml en agua, daba una curva en la cual el máximo se encuentra en la zona de los 200 milimicrones. Resulta así que la transformación que tiene lugar en el medio alcalino tal como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , es diferente de la que produce bacitracina C.

La bacitracina B daba una curva casi idéntica a la A en agua, pero la inflexión era mas baja. Esta intensidad menor es compatible con un residuo adicional en la bacitracina B y un peso correspondientemente mas alto. El espectro de absorción de la bacitracina comercial es compatible con el hecho de ser una mezcla de los tipos A, B y C.

Las bacitracinas A y B aparentemente tienen uniones muy reactivas para el metanal en solución acuosa a pH 7. Con un exceso de metanal se observó que la absorción de la bacitracina A se trasladaba rápidamente de la del péptido inalterado a una similar a la dada por una alteración producida en medio alcalino con carbonato de sodio. Este cambio se inhibía cuando el pH se reducía a 4.

Se ha sospechado que la potencia antibiótica de la bacitracina es afectada por la presencia de aldehidos o cetonas en los solventes usados para la extracción del péptido. La bacitracina C aparentemente no es afectada por el metanal, o si lo es, el espectro de absorción no se altera. Indó que la transición de A a C parece tener lugar con pérdida del punto cisteína, de acuerdo a lo que se observa al hacer la cromatografía en papel del hidrolizado, las uniones reactivas que rodean el átomo de azufre, son probablemente responsables del efecto del metanal y también probablemente, de la absorción característica de la bacitracina A.

Un análisis cualitativo y cuantitativo de los aminoácidos contenidos en la bacitracina A, por cromatografía de intercambio iónico, fue realizado por CRAIG, HAUSEMAN, y WEISIGER en 1952. Los resultados obtenidos fueron confirmados por una separación por distribución en contracorriente de todos los aminoácidos provenientes del hidrolizado de una preparación más cruda del antibiótico.

BANKY, GREGORY y CRAIG, en 1948, habían informado que la bacitracina parece contener uniones peptídicas que son fuertemente resistentes a la hidrólisis total. Además se forma un material coloreado después de la hidrólisis, dependiendo la cantidad de la concentración del péptido usado inicialmente. Una solución de 1 g de péptido en 200 ml de HCl 6 N parecía dar los mejores resultados. En estudios anteriores, con material no tan purificado, el calentamiento a reflujo durante 42 horas dio recuperaciones más bajas por cromatografía en almidón, para la mayoría de los aminoácidos, pero una recuperación considerablemente mayor del amoníaco que la que se obtenía cuando la duración de la hidrólisis era sólo de 18 horas. Esto indica una destrucción parcial de ciertos aminoácidos por algún producto hidrolítico del péptido. Se eligió finalmente para un estudio más ajustado, un periodo de hidrólisis de 24 horas a 110°C en un tubo al vacío esperando que los valores para los residuos de aminoácidos, fueran algo más bajos.

La bacitracina A más purificada, dio un hidrolizado practicamente sin color, en estas condiciones. El exceso de HCl se eliminó por evaporación a presión reducida y el residuo se disolvió en agua. Esta era la solución standard usada para análisis cuantitativo en la columna de intercambio iónico. Refiriéndolo al peso de péptido tomado y después de corregirlo por la pérdida de solvente por secado a 100°C a 0,2 mm. de Hg de presión, se encontró que el nitrógeno total (Kjeldahl) era de 15,8 %. El nitrógeno aminado (Van Slyke) era de 13,6 % y el nitrógeno carboxílico (ninhidrina) era de 12,76 %. Los aminoácidos se determinaron cuantitativamente por la técnica de intercambio iónico de MOORE y STEIN en un volumen de hidrolizado standard que correspondía a 2,7 mg de bacitracina A, referida a la base de peso seco.

CRAIG, HAUSEMAN y WEISIGER han confeccionado diagramas de los efluentes de las columnas intercambiadoras de iones dobles de apreciar en la fig. 1. En la fig. 1ª se muestra los resultados obtenidos con una columna Do-

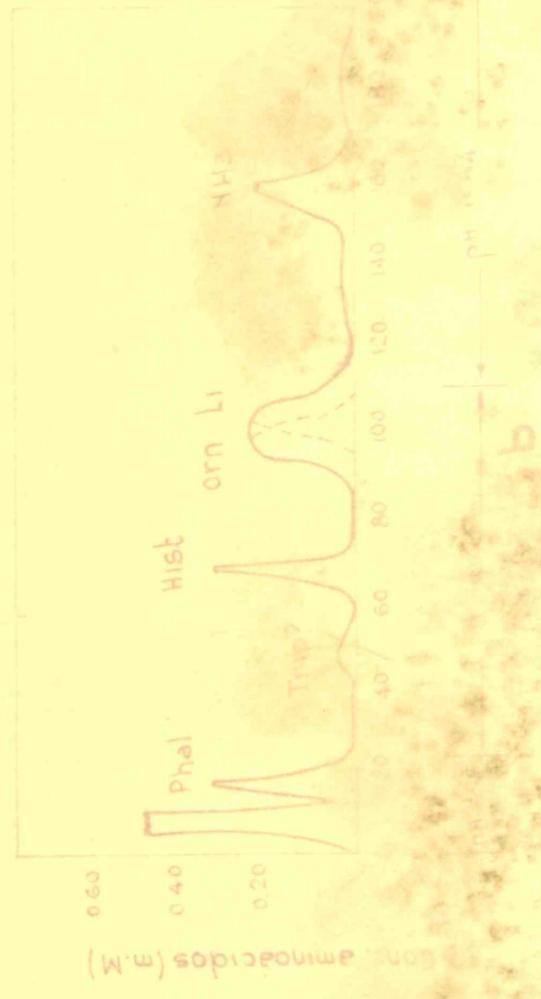
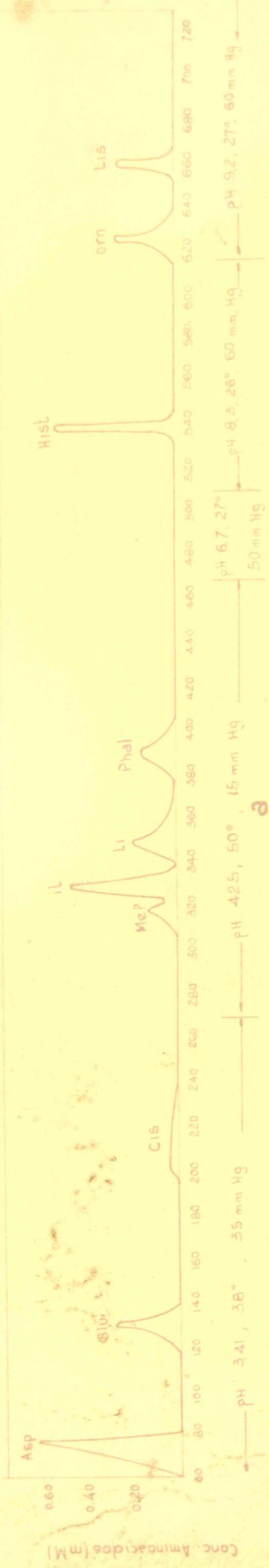


Figura 1. Diagramas de los aminoácidos presentes en el líquido cefalorraquídeo de un paciente con síndrome de Marfan. A: Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; C15: leucina; Me?: metionina; IL: isoleucina; Li: leucina; Phal: fenilalanina; Hist: histidina; orn: ornitina; Lis: lisina; NH<sub>3</sub>: triptófano.



wax 50 de 100 cm. de longitud. Dado que hay tres aminoácidos básicos, se hizo también una separación en una columna corta de 15 cm de longitud. El resultado obtenido con esta columna se aprecia en la fig. 1 "b". Los resultados cuantitativos obtenidos integrando las áreas limitadas por las curvas, se ven en la tabla 1. Se obtuvieron dos pequeñas bandas sin identificar como se ve en la figura 1, además de las diez bandas dadas en la tabla 1. Todas las de esta tabla se identificaron por un verdadero aislamiento, como veremos. Las dos bandas no identificadas, se encontraron en posiciones que correspondían a metionina y triptofano, sin embargo, ninguno de estos aminoácidos está involucrado, como lo muestra el hecho de que no aparezcan en los experimentos de aislamiento. La bacitracina A, no daba metoxilos en la determinación standard de estos, en cambio la metionina si. Las mediciones del espectro de absorción en la región del ultravioleta, hechas sobre el péptido intacto, no eran compatibles con la presencia de un residuo de triptofano.

La recuperación de los restos conocidos representaba solamente el 37,4 % del peso del péptido tomado. La recuperación de nitrógeno era del 90,7% de la cifra de nitrógeno total (15,8 %). Todos los aminoácidos han sido aislados en forma cristalina e identificados por los métodos de la química orgánica clásica. Con este propósito, se hidrolizó una muestra de 3 g de una preparación comercial; por distribución, se encontró que la misma, contenía solamente pequeñas cantidades de bacitracina B, D y C, y tenía alrededor de un 20% de bacitracina B. Se ha demostrado que la bacitracina B difiere de la A por tener un aminoácido adicional.

Después de eliminar el HCl en exceso, por evaporación a sequedad, el residuo sólido se distribuyó en el sistema HCl acuoso al 2% - fenol. Se usó solamente 5 ml de la fase acuosa en cada tubo. El diagrama de los pesos obtenidos después de 220 transferencias se observa en la figura 2 "a". La banda 1 contenía todo el material coloreado, probablemente correspondía a una o tal vez a ambas bandas desconocidas, en la separación por intercambio iónico. La banda que primero se sospechó que era triptófano, debiera estar en esta fracción, pero un examen posterior indicó que este no era el caso. La banda 2 era fenilalanina, que se aisló fácilmente con buen rendimiento, por agregado de eter etílico al sistema para eliminar el fenol de la fase acuosa. La solución acuosa se evaporó luego a sequedad, después de una extracción estereica final. La banda 3, contenía una mezcla de leucina e isoleucina, la cual se separó por distribución en el sistema, butanol 2- propanol n - acetato de amonio acuoso al 5% - conteniendo NH<sub>3</sub>

T A B L A 1

Resultado del análisis de aminoácidos

	N como % de N total	Aminoácido residual	Proporción
	-	-por 100g. de péptido-	-Molar (1)
Fenilalanina	- 6,5	- 10,8	- 1,03
Leucina	- 6,5	- 8,2	- 1,02
Isoleucina	- 11,4	- 14,6	- 1,83
Cisteína	- 6,4	- 7,4	- 1,00
Acido Glutámico	- 5,6	- 8,1	- 0,89
Acido Aspártico	- 11,3	- 14,7	- 1,77
Histidina	- 14,9	- 7,7	- 0,80
Lisina	- 11,2	- 8,1	- 0,89
Ornitina	- 10,1	- 6,5	- 0,80
NH <sub>3</sub>	- 6,8	- 1,3	- 1,08
Total	- 90,7	- 87,4	-

( 1 )-Basado en un peso molecular hipotético de 1411 -

al 1% en las proporciones de volumen 2:1:3, respectivamente. La banda de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  se eliminó a las 240 transferencias y la distribución se continuó luego, reciclado hasta alcanzar las 2037 transferencias. Esto dió el diagrama de la figura 2 b y permitió aislar cantidades adecuadas de ambos aminoácidos. La separación se confirmó por cromatografía en papel. La banda 4 de la figura 2 a se encontró que contenía el residuo extra de aminoácido presente en el componente B de la bacitracina comercial. La sustancia cristalizó cuando se evaporó la solución ácida pero era muy soluble en agua. La banda 5 probó ser cisteína, la cual podía recuperarse fácilmente como clorhidrato cristalino. La banda 6 es una banda grande que contiene los aminoácidos básicos y ácidos. Estos se recuperaron y fraccionaron por distribución en alcohol amílico terciario-ácido clorhídrico acuoso al 5%. A las 1425 transferencias se obtuvo el diagrama de la figura 2 c. La banda más alta a la izquierda que contenía todos los aminoácidos básicos, se eliminó y la distribución se continuó hasta las 2034 transferencias. Entonces se obtuvo el diagrama de la figura 2 d.

La cromatografía en papel mostró que la ubicación dada a las dos bandas teóricas, era correcta. El ácido glutámico se recuperó de la rama derecha de la banda ( tubos 320 a 340 ) y el ácido aspártico, de la izquierda ( tubos 255 a 275 ).

La mezcla de aminoácidos básicos proveniente del diagrama de la figura 2 c, se distribuyó luego en el sistema original,  $\text{HCl}$  al 2%-fenol. Los volúmenes de las fases usadas fueron de 5 y 10 ml respectivamente. A las 1150 transferencias se obtuvo el diagrama de la figura 2 e.

La reacción de la ninhidrina cuantitativa en solución ácida por el método de CHENARD para ornitina y el ensayo de PAULI para histidina, confirmaron la ubicación de las tres curvas teóricas. Luego fué fácil aislar los clorhidratos de aminoácidos cristalinos a partir de cortes apropiados del diagrama de la figura 2 e. La rama izquierda de banda 1 contenía  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pero esto no interfería con la cristalización del monoclorhidrato de la histidina monohidratada, proveniente del corte de tubos 870 a 900. La banda 3 era más alta que las otras dos, se encontró que esto se debía a la presencia de cistina, formada aparentemente por oxidación parcial de la cisteína encontrada en la banda 5 del diagrama de la figura 2 a.

Esta se eliminó fácilmente por ajuste del pH de la solución acuosa con piridina y filtración. La solución se concentró luego para cristalizar el

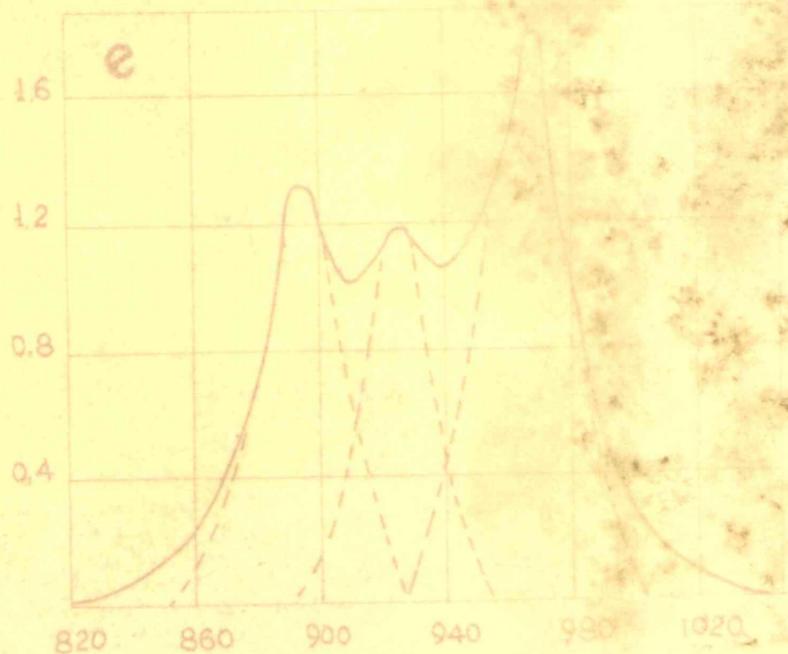
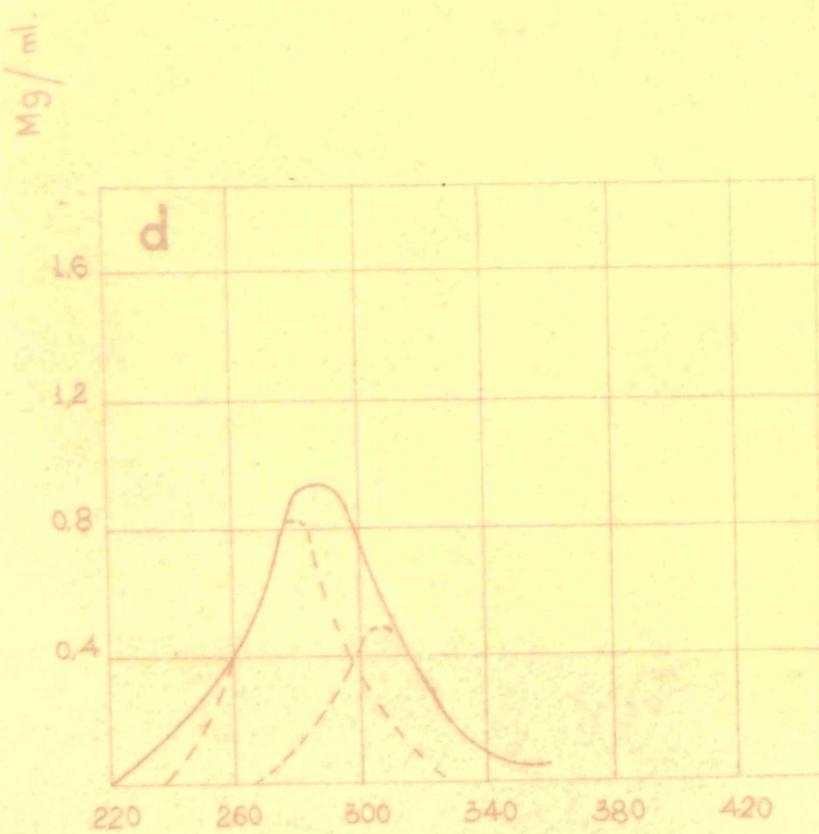
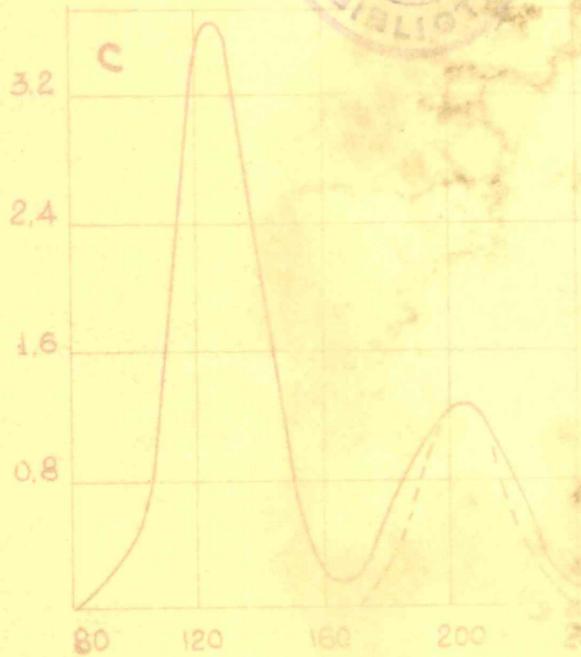
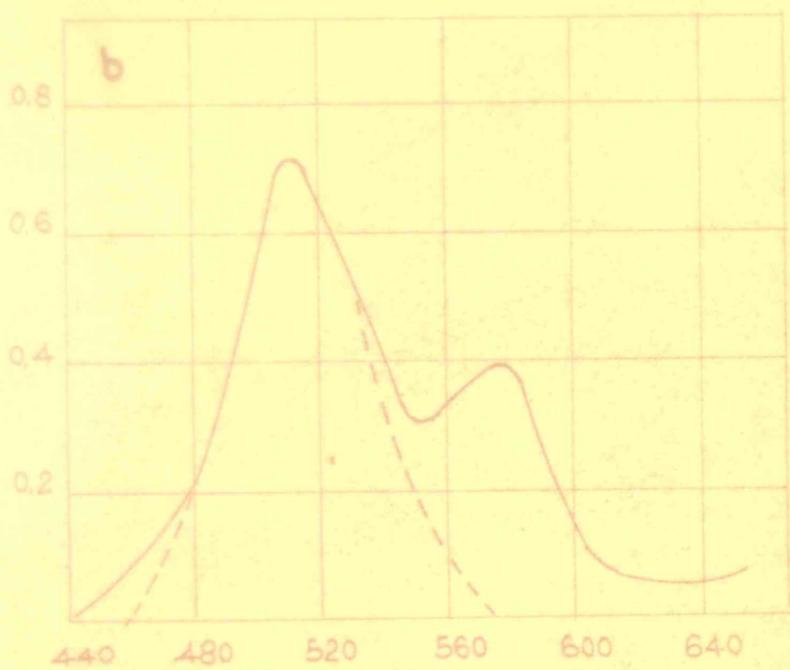
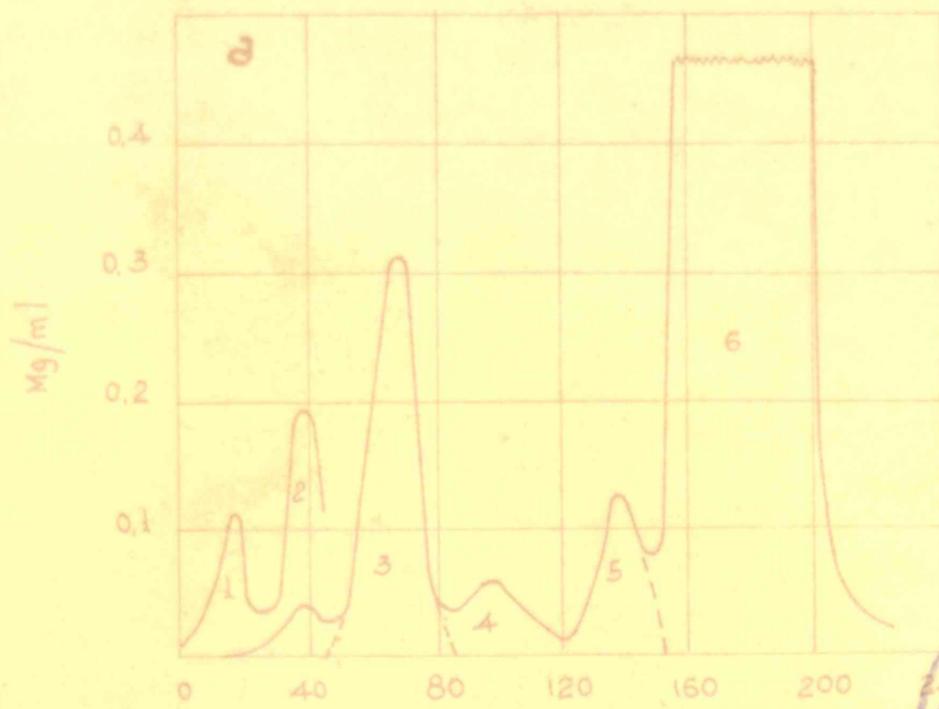


Figura 2: Diagramas de distribución para el aislamiento de aminoácidos.  
 Las líneas de puntos, son las curvas calculadas.

monoclorhidrato de ornitina; con este propósito se usó un corte de tubos 960 a 990. El monoclorhidrato de lisina se aisló de un corte de tubos 933 a 937. La tabla 2 da los datos analíticos para los aminoácidos cristalinos y su poder rotatorio. En esta tabla se informan datos para cistina. La posición de la banda 5 es la calculada a partir de la relación de partición del clorhidrato de cisteína, pero aparentemente se produjo cierta oxidación a cistina antes de cumplirse la cristalización, dado que no se tomaron precauciones para impedirlo. El residuo obtenido de la evaporación de las soluciones había permanecido expuesto cierto tiempo, antes de cristalizarlo directamente a partir del HCl. El poder rotatorio de los primeros cristales indicaba que la sustancia era principalmente cisteína, y además se obtuvo una reacción fuertemente positiva de nitroprusiato, para sulfhidrilo; sin embargo, los cristales obtenidos de los líquidos madres daban el dato analítico correcto para el diclorhidrato de cistina y el poder rotatorio, era solo levemente más bajo que el valor informado en la literatura. Probablemente una pequeña cantidad de cisteína permanecía con la cistina.

NEWTON y ABRAHAM (1953, a, b, ), de acuerdo a los resultados de titulaciones electrométricas y de reacciones con 1-fluor-2-4-dinitrobenceno (FDMB ) llegaron a la conclusión que la bacitracina A contenía un grupo delta amino libre, el cual era parte de un resto ornitina, y un grupo alfa amino libre, el cual era parte de un resto de leucina o isoleucina.

FORATH (1953) e INGRAM (1953), no pudieron demostrar la presencia de un aminoácido con nitrógeno terminal en la molécula.

LOCKHART, NEWTON y ABRAHAM, en 1954, confirmaron los resultados de experimentos anteriores, e informaron que el dinitro fenil derivado (DNP) de la bacitracina A, daba DNP-isoleucina por hidrólisis; sin embargo, establecieron que el rendimiento de DNP-isoleucina, era mucho menor que el que podía esperarse de un resto con nitrógeno terminal por molécula, y sin embargo prevaleció cierta duda respecto a la naturaleza de la estructura que llevan los grupos libres alfa amino, postulados.

Los análisis de los aminoácidos formados por hidrólisis con ácido, sugirieron primero que la bacitracina A contenía solamente dos residuos de isoleucina ( BARRY, GREGORY y CRAIG, 1948 ), pero los estudios sobre la secuencia de aminoácidos, mostraron que los restos de isoleucina, se encontraban en tres posiciones en la cadena peptídica, de acuerdo a los trabajos de CRAIG, HAUSMANN y WEISIGER en 1954; LOCKHART y ABRAHAM en 1954 a; HAUSMANN, WEISIGER y CRAIG en 1955 a; WEISIGER, HAUSMANN y CRAIG en 1955.

T A B L A 2

Datos analíticos de los aminoácidos aislados

	C	H	N	S	Cl	O	II	Actividad óptica ( ) D	Literatura (1)
	%	%	%	%				Grados	Grados
L-Fenilalanina	65,18	6,65	65,43	6,71	34	(en agua)		34	35,1
L-Leucina	54,88	9,69	54,93	9,79	13	(en HCl 6 N)		13	15,1
L-Isoleucina	55,13	9,63	54,93	9,99	34	(en HCl 6 N)		34	40,6
L-Istidina HCl	23,36	4,61	23,02	4,51	-198	(en HCl 1 N)		-198	-214
ácido glutámico HCl	32,59	5,27	32,70	5,49	25	(en HCl 1 N)		25	30
L-ácido aspártico HCl	28,43	4,62	28,30	4,72	0,00	(en HCl 1 N)		0,00	-
L-Istidina HCl en H <sub>2</sub> O	34,50	5,74	34,40	5,77	14	(en HCl 1 N)		14	13,8
L-Lisina monohCl	39,40	7,97	39,40	8,23	25	(en HCl 6 N)		25	25,9
β-Ornitina mono HCl	35,51	7,57	35,60	7,78	16	(en H <sub>2</sub> O)		16	11,0 (2)

(1)-Tomado de "Handbook of chemistry and physics" 35a. edición

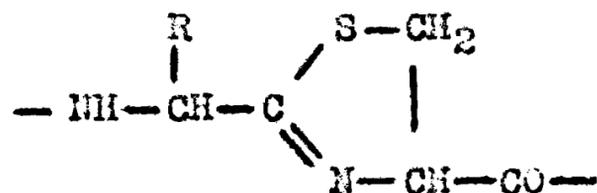
(2)-Para el L-mooolophidrato de ornitina, tomado de "The Loxck Index"- 6a. edición

Uno de los restos de isoleucina, aparecía parcialmente como allo-isoleucina, en hidrolizados ácidos ( PINZ, 1954 ). A la luz de experimentos anteriores, los resultados de la hidrólisis parcial, podían acomodarse mejor, suponiendo que la bacitracina A contenía un residuo de isoleucina con nitrógeno terminal, que estaba unido por su grupo carboxilo a un residuo de cisteína potencial; no obstante, el cuadro completo parecía ser más complicado. LOCHMART y ABRAHAM (1954, a) y HAUSEMAN y colaboradores (1955, a), sugirieron que el grupo amino de esta isoleucina estaba unido firmemente con un resto de fenil alanina o inter reaccio) naba con este último, durante la ruptura hidrolítica de la molécula. Se hizo esta sugestión porque varios péptidos que contenían la serie fenil alanina-isoleucina, parecían estar presentes en hidrolizados parciales.

La homogeneidad de por lo menos, algunos de los péptidos obtenidos por LOCHMART y ABRAHAM (1954, a), fue discutida, pero el derivado DNP de un péptido fenil alanina-isoleucina-cistina-SH-leucina, obtenido por HAUSEMAN y colaboradores (1955, a) parece haber sido bien caracterizado.

El átomo de S en la bacitracina A, está presente como un grupo tiol enmascarado, que aparece como parte de un grupo cisteína, por hidrólisis.

HEWTON y ABRAHAM (1953, b), sugirieron que la bacitracina A, contenía un anillo tiazólico:



Esta sugestión se hizo debido a la facil liberación de un grupo tiol en solución ácida caliente, y por el comportamiento de la bacitracina A en la hidrogenolisis. Después del tratamiento con Ni de Raney, se presentaba un resto alanina cuyo grupo alfa amino era libre, y se detectaban dos nuevas sustancias entre los productos de hidrólisis; una de estas sustancias se supuso que era un amino alcohol, porque los hidrolizados en los que estaba presente, daban amoníaco y un aldehido volatil, por tratamiento con peryodato. Los cambios producidos por hidrogenolisis podían interpretarse como la eliminación del átomo de S, seguida por la hidrólisis y reducción de un grupo resultante: —CH=N—.

El fragmento de isoleucina-cisteína, que se encuentra en hidrolizados parciales de bacitracina A, parece ser derivado de una estructura hasta ahora desconocida en polápéptidos. Se han hecho intentos para obtener información más precisa acerca de esta estructura mediante el uso de reac-

tivos para los grupos amino libres de los péptidos y por estudio ulterior de los productos de hidrogenolisis con el Ni de Raney.

HAUSELMANN, WISIGNY y CRAIG (1955, b) han llegado a la conclusión de que se forma un derivado del tiazol cuando la bacitracina A se convierte en bacitracina B, por oxidación al aire.

LOCKHART, ABRAHAM y NINTON, en base a estos antecedentes, trabajaron en este tema, durante el año 1955.

El análisis de los aminoácidos presentes, después que la bacitracina A había sido hidrolizada con HCl 6 N a 105°C durante 24 horas, indicaba que había dos moles de isoleucina y 0,5 moles de allo isoleucina por cada mol de leucina. La cantidad de isoleucina era algo mayor si la hidrólisis continuaba durante 90 horas.

El valor para isoleucina y allo isoleucina combinadas, el cual es más alto que el previamente registrado (HAUSELMANN y colaboradores, 1955, b) concuerda con la suposición de que la mezcla isoleucina-allo isoleucina en los hidrolizados, deriva de tres residuos en la molécula de bacitracina A.

HARENIST (1953) y HIRS, STRIN y MOORE (1954) señalaron que se requerían una hidrólisis prolongada para liberar toda la isoleucina de ciertos péptidos. Uno de los restos isoleucina de la bacitracina A aparece en hidrolizados parciales del péptido isoleucina-fenil alanina, y otro, de los péptidos isoleucina-lisina e isoleucina (aspártico)-lisina.

Se ha encontrado que todos estos péptidos son particularmente resistentes a una hidrólisis ulterior (HAUSELMANN y colaboradores, 1955, b ; LOCKHART y ABRAHAM, 1954, b); por lo tanto, sería comprensible que el rendimiento de isoleucina fuera menor que el teórico.

Suponiendo que la bacitracina A, no consista de dos péptidos con restos de nitrógeno terminal distintos, el valor 0,5 para el cociente: allo isoleucina/leucina, debe explicarse por la racemización del átomo de C alfa, ya sea de un resto de isoleucina o de un resto de allo isoleucina; sin embargo, sólo la primera explicación, sugerida por HAUSELMANN y colaboradores (1955, b), parece estar de acuerdo con los resultados de otros experimentos.

La densidad de color de la ninhidrina dada por la bacitracina A, la cual es 1,5 veces mayor por mol que la dada por la leucina, concuer-

da con la opinión de que la molécula contiene un grupo amino libre distinto al grupo delta amino de la ornitina. Entre los compuestos usados para la comparación, el ácido 6 amino hexanoico, mostró una densidad de color por mol que era casi tan alta como la mostrada por la leucina. Los valores correspondientes para los compuestos que contienen dos grupos amino libres eran mayores que el valor para leucina, pero menores que el valor para bacitracina A. Es posible que el color de ninhidrina dado por una molécula grande que contenga dos grupos amino libres, dependa en parte de la distancia de un grupo amino al otro.

No hay duda de que el derivado dinitrofenil de la bacitracina A, dé DNP-isoleucina y/o DNP-allo isoleucina, por hidrólisis. Los derivados de la isoleucina son los únicos productos identificados que pueden haber sido derivados de un resto con nitrógeno terminal, pero el rendimiento pobre en estos derivados, y el hecho de que la DNP-isoleucina estaba acompañada por material sin caracterizar, soluble en éter, indican que hay factores desconocidos en la formación o hidrólisis de los derivados DNP del polipéptido.

POWELL en 1954, ha establecido que las muestras de bacitracina comercial contienen isoleucina. Ha sugerido que esta última está presente aún en preparaciones de bacitracina A, y puede ser responsable de los informes de que la isoleucina se encuentra como aminoácido con nitrógeno terminal. Sin embargo, en el sistema solvente usado aquí para su aislamiento, la bacitracina A tiene un coeficiente de partición que es 10 veces mayor que el de la isoleucina. Por lo tanto no puede haber quedado una cantidad significativa de isoleucina en la banda a partir de la cual se aisló el producto final.

La reacción de la bacitracina A con ácido nitroso, la cual da un producto que no produce allo isoleucina por hidrólisis, parece evidenciar claramente que la allo isoleucina deriva de un resto con nitrógeno terminal. Este último probablemente es adyacente al resto potencial de cisteína, dado que LOCKHART y ABRAMSON (1954, b) informaron que los residuos de isoleucina en otras dos posiciones de la molécula permanes-

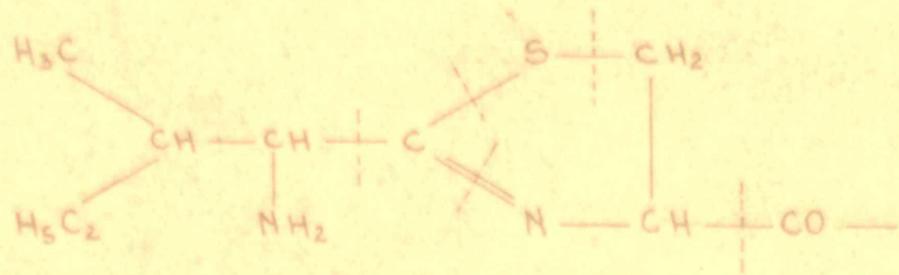
cían intactos en el producto desaminado.

Una posterior confirmación de esta opinión, proviene del estudio de los productos de hidrogenólisis de la bacitracina A. Experimentos preliminares mostraron que el alcohol aminado encontrado primero, en los hidrolizados de la bacitracina A desulfurada, podía ser isoleucinol, y que el aldehído formado por oxidación con perclorato, podía ser alfa metil butanal. Una indicación de que el amino alcohol era isoleucinol se obtuvo a partir de su comportamiento en papeles de cromatogramas bidimensionales, tratados primero con butanol-ácido acético, y luego con fenol en presencia de HCl 5 N. Esta opinión se reforzó cuando se mostró que la 2-4-dinitro fenil hidrazona del aldehído, tenía el mismo valor de  $R_f$  que el alfa metil butanal-2-4-dinitro fenil hidrazona, en los papeles de cromatograma (BURTON, 1954), y concordaba con el descubrimiento posterior de que la serie isoleucina-cistina S, se encontraba en la molécula. El trabajo de LOCKMANN, NEWTON y ABRAMSON, ha mostrado en forma concluyente que el isoleucinol es un producto de la hidrogenólisis de la bacitracina A, y también que el isoleucinol aparece en estado libre antes de la hidrólisis de la cadena péptidica con HCl. A partir de este comportamiento, es razonable llegar a la conclusión de que el isoleucinol deriva de un resto de isoleucina con nitrógeno terminal. El descubrimiento de que se forma 1-amino-2-metil-n-butano por hidrogenólisis, puede interpretarse en forma semejante.

Entre los restos de aminoácidos, que se sabe están presentes en la molécula, la isoleucina es la única fuente concebible de esta sustancia. Las reacciones que se supone que ocurren cuando se trata la bacitracina A con Ni de Raney, y cuando se la inactiva con ácido diluido caliente, se ilustran en el esquema adjunto (a). Las líneas puntuadas muestran las uniones rotas por hidrogenólisis. La formación de 1-amino-2-metil-n-butano y de etil amina, involucra la ruptura de uniones C-C. Esto se sabe que ocurre, en menor grado, durante la acción del Ni de Raney sobre la penicilina (KACZLA y FOLKERS, 1949).

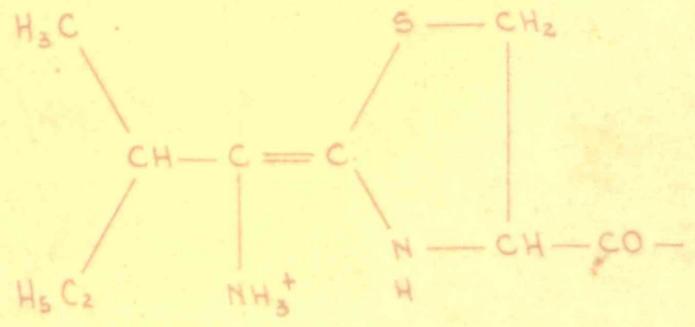
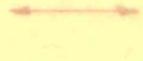
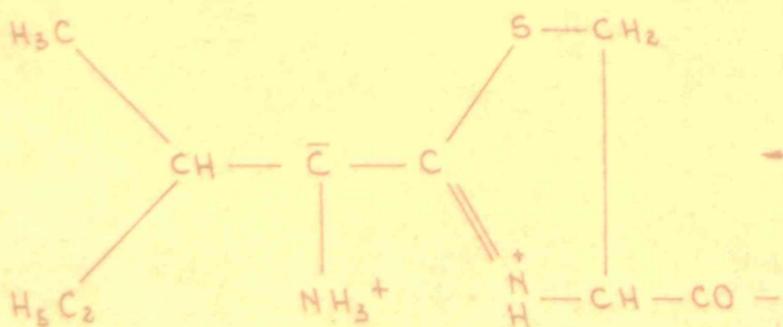
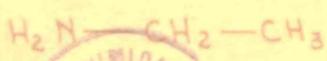
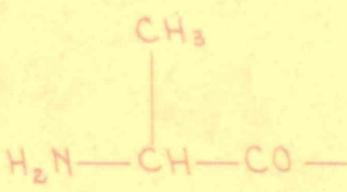
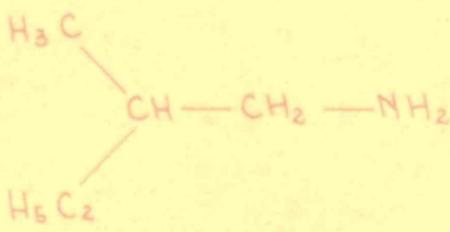
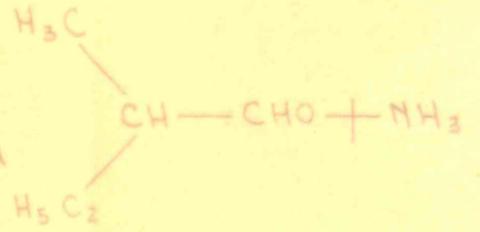
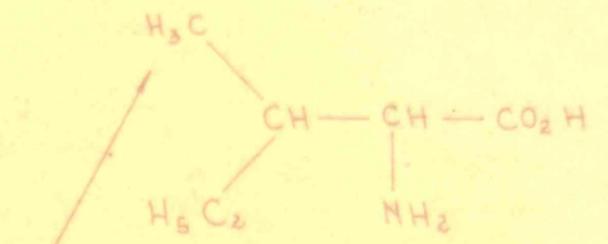
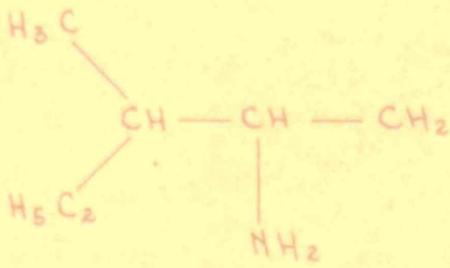
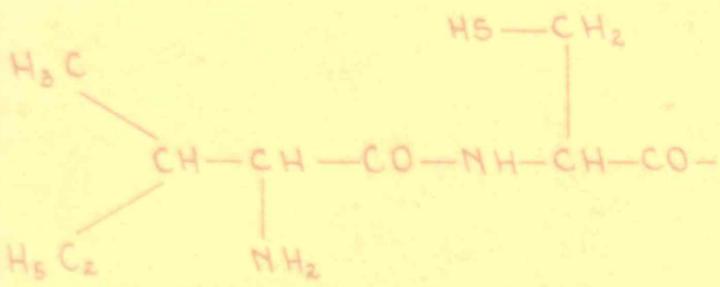
EMBLICH (1907) encontró que la l-isoleucina, daba una mezcla de l-isoleucina y d-allo isoleucina cuando se la calentaba con solución de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  a  $180^\circ\text{C}$ .

Suponiendo que la allo isoleucina encontrada en los hidrolizados ácidos de bacitracina A, se había formado por racemización a partir de



HCl N  
100°C

Ni de Raney



b

una isoleucina con nitrógeno terminal, se supuso que este cambio podía no tener lugar fácilmente durante la hidrogenólisis con Ni de Raney, y que el isoleucinol resultante podía por lo tanto llegar a obtenerse en una forma opticamente activa. Después de la oxidación del isoleucinol a isoleucina, los análisis en columnas de Dowox 50, hicieron posible determinar si la isoleucina era una mezcla de estereoisómeros. Los resultados mostraron que realmente se había producido una racemización considerable, pero que el producto principal era isoleucina y no allo isoleucina. Concordaban los resultados, con la suposición de que un resto de isoleucina ocupa la posición de nitrógeno terminal en la molécula intacta de bacitracina A, y que la allo isoleucina en los hidrolizados deriva de este residuo. Puede mencionarse que BROCCALINI, GRUBHOFFER, KASS y KALBE (1951), aislaron d-allo isoleucina de los productos de hidrólisis de la actinomicina C. En este caso sin embargo, la racemización no parece estar involucrada, dado que no se informó sobre la presencia de otro isómero de la isoleucina.

Se supone generalmente que la racemización de los alfa aminoácidos es una consecuencia de la ionización de un hidrógeno en el átomo de C alfa (NEUBERGER, 1948).

En la 2-(1 amino-2-metil-n-butil) tiazolina, que parece formar la parte terminal de la molécula de bacitracina A, la ionización del C que lleva el grupo amino debiera verse facilitada, en condiciones fuertemente ácidas, por las cargas positivas en los átomos de nitrógeno, y por la posibilidad de resonancia en la estructura resultante. En estas condiciones, la velocidad de racemización puede ser tan rápida como para competir con las reacciones que dan como resultado la ruptura del anillo tiazólico y la formación de una unión peptídica normal. Esto se puede apreciar en el diagrama adjunto (b).

La racemización de la isoleucina obtenida por oxidación del isoleucinol proveniente de bacitracina desulfurada, puede haberse producido parcialmente durante el proceso de aislación, pero en vista de que las condiciones empleadas eran relativamente suaves, parece más probable que haya tenido lugar durante la hidrogenólisis.

Sin embargo, no puede ignorarse la posibilidad de que se produzca cierta racemización durante la aislación de la misma bacitracina A, sin fisión del anillo que contiene S.

Los resultados que LOCKHART, ABRAHAM y NEWTON presentan en este trabajo, parecen explicarse mejor suponiendo que en la bacitracina A hay un anillo tiazólico; además, dos propiedades de la bacitracina A, cuya interpretación era anteriormente incierta, aparecen ahora como consistentes con la hipótesis tiazólica. La imposibilidad de detectar un grupo básico en la molécula que pudiera ser atribuido al nitrógeno de un anillo tiazólico (NEWTON y ABRAHAM, 1953, b), es comprensible si el tiazol se sustituye por un resto con nitrógeno terminal. La presencia de este resto, con un grupo amino cargado positivamente, agregado al CO de la unión amida, a través de la cual está unido el resto a la cadena peptídica, puede muy bien llevar el pK del nitrógeno tiazólico, por debajo del rango que cubría la titulación electrométrica. El decremento en el coeficiente de extinción molecular a los 254 milimicrones, que se produce cuando se inactiva la bacitracina con ácido (NEWTON y ABRAHAM, 1953, b), es similar al coeficiente de extinción molecular que han informado KUHN y DRAWERT (1954) para la 2-metil tiazolina en esta región.

Sin embargo, existen indudablemente propiedades de la estructura tiazólica, que necesitan ser investigadas. Las razones para los valores bajos, obtenidos cuando el resto con nitrógeno terminal se evidencia con el uso de FMB, continúan inciertas. Por lo menos un producto que aun no ha sido identificado, parece formarse durante la hidrogenolisis con Ni de Raney. El mecanismo por el cual el grupo amino del resto con nitrógeno terminal puede interaccionar con un resto de fenil alanina en la cadena peptídica, y la posibilidad, mencionada por HAUSMANN y colaboradores (1955, a), de que la migración del grupo acilo entre S y N juega una parte en la química de la bacitracina A, están entre otros problemas interesantes para la investigación futura.

## CAPITULO SEPTIMO

### Ensayos de bacitracina

Los primeros trabajos para la valoración de bacitracina fueron realizados por ANKER, JOHNSON y MELENEY, quienes describieron un método para determinar la potencia de la bacitracina basándose en que se entiende como Unidad, la cantidad que diluida 1:10<sup>24</sup> en un conjunto de dos series de diluciones de caldo de carne a 20° C, inhibe completamente el crecimiento de una cepa de *Streptococo hemolítico grupo A*, cuando el inóculo usado para sembrar los tubos es 0,1 cc. de una dilución de 10<sup>-2</sup> de un cultivo de una noche en caldo sangre.

Mas tarde, ANKER, JOHNSON, GOLDBERG y MELENEY describen posteriormente el ensayo por el método de diluciones seriadas. Puede usarse un caldo de infusión de corazón de vaca estabilizado con fosfato monosódico o un caldo de infusión de corazón de vaca y 2% de glucosa-peptona. El ensayo se hace por triplicado usando diluciones de la muestra 1:3, 1:4 y 1:5 en los primeros tubos de cada una de las tres filas de tubos de dilución, y a partir de ellos se hacen diluciones por duplicado de modo que cada fila cubra los límites de potencia. Los tubos se siembran entonces con 0,1 cc. de una dilución de 10<sup>-2</sup> de un cultivo de una noche de *Streptococo hemolítico* en caldo de sangre. Las series son incubadas a 37° C y las lecturas se hacen después de 24, 48 y 72 horas de incubación. El punto final es, la mayor dilución para la cual el crecimiento se inhibe por completo; así un punto final de 1:512 significará que la muestra ensayada contenía 0,5 unidades por ml. y un punto final de 1:40, 0,04 unidades por ml.-

Si se desea mayor aproximación en la lectura que la que es posible con este tipo de dilución, deben hacerse series de diluciones adicionales intermedias en la vecindad del punto final primeramente determinado.

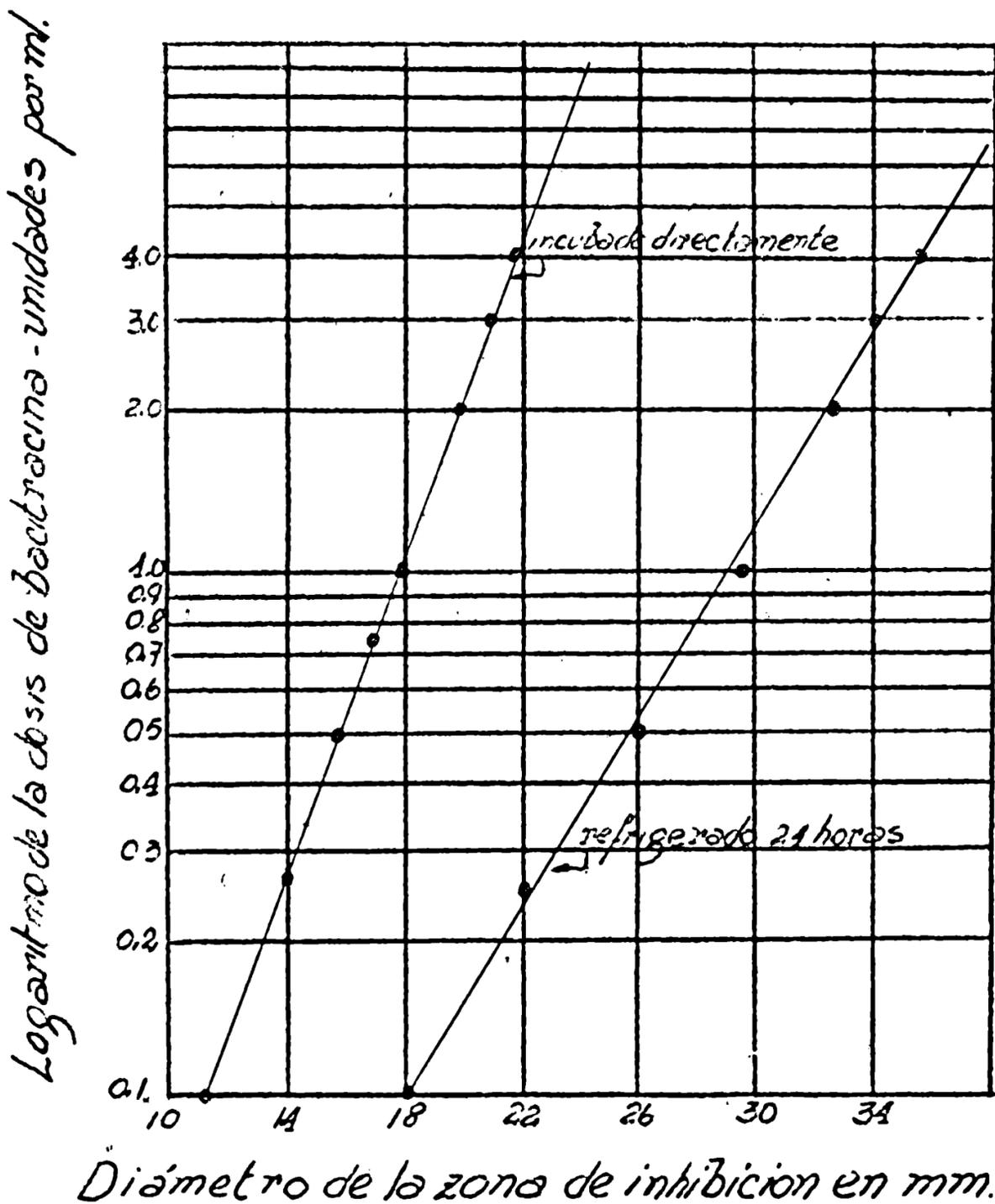
Un método de ensayo como el de "Cilindros" es aconsejable ya que no sufre alteración por una contaminación bacteriana leve. Para su realización bastan los conocimientos de manipuleo rutinario y lleva menos tiempo que otros métodos.

Un método con esta técnica, para la bacitracina, es descrito por HOFF, BENNET y STANLEY. Como germen se recomienda al *Micrococcus flavus* en lugar del *Streptococcus hemolítico* usado inicialmente por JOHNSON, ANDER y MELENEY. Se vió que el *Micrococcus* era mejor debido a lo liso y uniforme de su crecimiento y a los bordes netos de su zona de inhibición.

La compatibilidad de los resultados logrados por este método se indica en la figura 1, en la cual se han trazado dos curvas standar mostrando la respuesta a dosis graduadas de bacitracina. Cada zona por nivel de dosaje se basa en el promedio de 100 lecturas.

Figura 1

Ensayo de cilindros para la bacitracina



BOND y NOCK han informado sobre un método de ensayo en placa que permite la determinación de hasta 0,02 unidades de bacitracina por c.c. de fluido del organismo humano.

DARKER, BROWN, FREE, BIRD y GOOGLY compararon dos procedimientos: uno turbidimétrico y otro de placas cilíndricas, para el ensayo de bacitracina. Estos métodos incluyen una discusión de la relación matemática que existe entre la concentración de antibiótico y la zona de inhibición.

HOVE hizo una comparación entre el método de dilución en series de tubos y el de discos de papel de filtro. Encontró que los niveles de sensibilidad de la droga por el método del disco eran generalmente varias diluciones en series más bajas, que los niveles obtenidos por dilución en tubo.

En Abril de 1951, la Comisión de Alimentos y Drogas de Estados Unidos, publicó reglamentos corregidos para las pruebas, métodos de ensayo y certificados de antibióticos incluyendo la bacitracina y productos que la contienen.

## CAPITULO OCTAVO

### Usos y ventajas de la bacitracina

Un resumen de algunas de las propiedades y ventajas del uso de la bacitracina, se enuncian a continuación.

La bacitracina in vitro, es efectiva contra los estreptococos hemolíticos de mayor poder patógeno, estreptococos no hemolíticos, estafilococos, meningococos, gonococos, meningococos, bacilo diftérico, coccis anaeróbicas en general, varios clostridios de gangrena gaseosa, espiroquetas bucales, treponemas pálidos de la sífilis y los actinomicos. Tiene poca o ninguna acción sobre bacilos de grupo aeróbico, Gram negativos y no esporulados. Una representación en diagrama de la acción de 7 de los antibióticos mas usados, se indica en cuadro aparte.

La acción antibacteriana de la bacitracina y algunos otros antibióticos sobre especies individuales de bacterias, se comparan en la Tabla No. 1.-

La concentración necesaria para que la bacitracina produzca in vitro una inhibición completa sobre el desarrollo bacteriano, se puede apreciar en la Tabla No. 2.

Las especies de organismos que demostraron ser relativamente resistentes a la bacitracina, la vemos en la Tabla No. 3.-

Aureomicina - Cloromicetina - Terramicina			
Bacitracina - Tirotricina			
Penicilina			
Streptomycin			
Rickettsias virus largos	Bacterias Gram Negativas	Bacterias Gram Positivas	Meningococos
Tifus Influenza Poliomielitis	Fiebre tifoidea Pertussis Fiebre ondulante	Neumonía Erisipela Conjuntivitis	Meningitis
		Gonococos	Bacilo de Koch
		Gonorrrea	Tuberculosis

Superposición de la acción de los antibióticos in vitro

Espectro antibacterial comparativo de bacitracina-cloromicetina-aureomicina-ponicilina-terramicina y estreptomicina

Especies de organismos	-bacitracina-	-cloromicetina-	-aureomicina-	-ponicilina-	-terramicina-	-estreptomicina-
Actinomyces bovis	X	-	X	X	-	X
Staphylococcus aureus	X	-	X	X	-	X
Staphylococcus aureus	X	-	X	X	-	X
Bacillus diptheriae	X	-	X	X	-	X
Bacillus pseudodiphtheriae	X	-	X	X	-	X
Clostridium histolyticum	X	-	X	X	-	X
Clostridium oedematiens	X	-	X	X	-	X
Clostridium septicum	X	-	X	X	-	X
Clostridium sordellii	X	-	X	X	-	X
Clostridium tetani	X	-	X	X	-	X
Clostridium welchii	X	-	X	X	-	X
Edwardsia histolytica	X	-	X	X	-	X
Gonococcus	X	-	X	X	-	X
Streptococcus haemolyticus	X	-	X	X	-	X
Meningococcus	X	-	X	X	-	X
Streptococcus non haemolyticus	X	-	X	X	-	X
Pneumococcus	X	-	X	X	-	X
Staphylococcus albus	X	-	X	X	-	X
Staphylococcus aureus	X	-	X	X	-	X
Streptococcus viridans	X	-	X	X	-	X
Treponema pallidum	X	-	X	X	-	X

T A B L A N°2

Concentración de bacitracina, necesaria para producir inhibición completa ( In vitro)

Organismo	Sensibilidad para la bacitracina Unidades
Actinomyces bovis	-
Actinomyces israeli	+ 0,005-0,075
Streptococcus haemolyticus anaerobius	+ 0,001-0,01
Staphylococcus anaerobius	+ -
Bacillus diphtheriae	+ -
Bacillus pseudodiphtheriae	+ -
Clostridium histolyticus	+ 0,004-0,025
Clostridium novyi	+ -0,01
Clostridium oedematiens	+ -
Clostridium septicum	+ 0,002-0,01
Clostridium sordelli	+ 0,005-0,01
Clostridium sporogenes	+ -
Clostridium tetani	+ 0,006-0,01
Clostridium welchii	+ 0,002-0,025
Coryne bacterium diphtheriae	+ 0,004-0,126
Coryne xerosis	+ 0,003-0,005
Endamoeba histolytica	+ -
Flavobacterium	+ -0,0025
Gaffkya tetrágona	+ -
Gonococcus	+ -
Streptococcus beta haemolyticus A-B-C-G-F	+ 0,0009-0,025
Streptococcus beta haemolyticus D	+ 0,008-0,062
Neisseria meningitidis B	+ -0,63
Meningococcus	+ -
Micrococcus flavus	+ 0,008-5,0
Neisseria gonorrhoeae	+ -0,006
Streptococcus non haemolyticus	+ 0,007-3,0
Pasteurella pestis	+ -
Pneumococcus	+ 0,002-0,4
Sarcina flava	+ -
Sarcina lutea	+ -
Staphylococcus albus	+ -
Staphylococcus aureus	+ 0,2-1,7
Streptococcus pyogenes	+ -0,008
Streptococcus viridans	+ 0,135-1,02
Treponema pallidum	+ -0,004

T A B L A 3

Especies de organismos que son relativamente resistentes  
a la acción de la Bacitracina

---

- Especies de organismos

---

- *Aerobacter aerogenes*
  - *Aerobacter cloacae*
  - *Bacillus alkaligenes*
  - *Bacillus proteus*
  - *Bacillus subtilis*
  - *Cryptococcus hominus*
  - *Escherichia coli*
  - *Haemophilus ducreyi*
  - *Klebsiella pneumoniae*
  - *Monilia albicans*
  - *Neocardia asteroides*
  - *Pasteurella multocida*
  - *Pseudomonas aeruginosa*
  - *Salmonella typhosa*
  - *Shigella*
- 
-

Una de las ventajas que implica su uso, radica en que es sólo leve-mente absorbida, si es que se absorbe, después de su aplicación como un tópico sobre la piel, o por el tracto intestinal si se efectúa un tratamiento por ingestión oral. Esta leve absorción es también caracte-rística del tracto respiratorio, aunque debe señalarse la posibilidad de una excepción en casos de ciertas afecciones.

Estas propiedades permiten altas concentraciones de la droga en estas regiones particulares, permitiendo intervalos entre dosis más amplios que si se empleara penicilina. Además los tratamientos pueden ser repe-tidos debido a que no produce sensibilidad como así tampoco irritación en el sitio de inyección, y si por excepción se produce es insignifican-te y transitoria, conceptos que se hacen extensivos a los pocos casos de respuestas alérgicas observados.

La bacitracina no es inactivada en presencia de las enzimas conocidas hasta ahora, así como tampoco es inhibida por los tejidos necróticos, pus, exudados, secreciones, suero sanguíneo y semejantes. Por ello es efectiva en áreas de infección que requieren acción antibiótica.

La penicilina puede ser reemplazada por bacitracina en dosis terapéu-ticas cuando se produce o existe sensibilidad hacia aquella, además la actividad no se ve afectada por la presencia de organismos producto-res de penicilinasa. Actúa sinérgicamente con penicilina, tirotricina, estreptomocina y polimixina. Tiene acción bactericida contra ciertas especies y cepas que son resistentes a la penicilina y estreptomocina y su espectro de actividad antibiótica contra los cocos Gram positivos, es más amplio que el de la penicilina, como así también su acción contra la estreptococcia no hemolítica. Pasa rápidamente al fluido cerebro es-pinal por medio de la sangre, cuando los tejidos meninges están lesio-nados, a igual que otros antibióticos.

La bacitracina puede administrarse en dosis terapéutica por vía intra-cerebral e intramuscular, sin causar síntomas cerebrales molestos, mien-tras que la penicilina (excepto en dosis por debajo de las 5.000 unidades) estreptomocina y sulfenamidas, por las mismas vías e iguales dosis, sue-len producir convulsiones.

Su efectividad contra los microorganismos sensibles, está en razón di-recta con su concentración. Una de las particularidades de este antibió-

tico, que llama poderosamente la atención, es su eficiencia en el tratamiento de diversas enfermedades en que de acuerdo a las condiciones patológicas, su aplicación no sería específica. Esto se ha comprobado en casos de infecciones dérmicas piógenas, infecciones oftálmicas y heridas quirúrgicas abiertas, cuando se la aplica como tópico.

El uso cada vez más amplio que se le da como agente terapéutico de aplicación local en el tratamiento de infecciones vaginales, es una prueba más de la bondad de su utilización en el control de muchas infecciones comunes. La bacitracina por su acción tanto bactericida como bacteriostática, es segura y efectiva como medida profiláctica oral, previa a la cirugía abdominal o posterior a otros procedimientos quirúrgicos.

Diversos casos de amebiasis agudas y crónicas, refractarias a otros tratamientos, han mostrado una completa y pronta remisión de los signos clínicos, al administrarse tabletas de bacitracina. La curación de lesiones y esterilización de deyecciones se producirá al cabo de 8 a 10 días.

Los resultados obtenidos en el tratamiento de la disentería bacilar, han demostrado la efectividad de la bacitracina contra distintas cepas del *Bacillus dysenteriae*, pero son necesarios todavía mayores estudios para ubicar correctamente al antibiótico en los tratamientos para este tipo de infecciones. El uso parenteral de la bacitracina con control sanitario adecuado, está autorizado en los reglamentos de la división de antibióticos, de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos. En tales condiciones es una droga salvadora de vidas, en casos de infecciones producidas por invasión de estafilococos, estreptococos y neumococos; la dosis generalmente se limita a 100.000 unidades diarias, y debe mantenerse una cuidadosa observación para evitar enojosas consecuencias. Hoy en día, no se recomienda tanto para inyecciones intramusculares o endovenosas, y sí en pomadas, soluciones nasales, tabletas orales y polvos para preparar soluciones.

Un sinergismo entre la bacitracina y otros antibióticos, cuando se emplean en tópicos y por vía parenteral, ha quedado establecido en muchas pruebas clínicas y ensayos sobre organismos aislados. La aplicación de bacitracina en combinaciones poliantibióticas, es una consecuencia lógica de esos resultados favorables, permitiendo un control rápido de infecciones con dosis más bajas que si se la usara sola, disminuyendo así la probabilidad del desarrollo de una cepa resistente. De este modo, en casos en los que no se había logrado respuesta con penicilina, aureomicina y estrepto-

tonicina, se aseguró el control de la infección por la asociación con cantidades relativamente pequeñas de bacitracina. Esto demuestra la bondad del sinergismo en la antibioticoterapia.

Uno de los aspectos mas nuevos de la producción de antibióticos, es el uso de esos productos como factores promotores del crecimiento de animales. Ensayos preliminares han demostrado que la bacitracina tiene probabilidades excepcionales en este campo y la Commercial Solvents, está produciendo bacitracina con este propósito, utilizando fermentadores de unos 200 mil litros de capacidad, en Peoria, Estados Unidos. Además estimula la aplicación de la bacitracina en este nuevo campo, el hecho de que si bien la producción es similar a la destinada para uso farmacéutico, la etapa de recuperación es menos compleja. La particularidad de su acción se manifiesta en favorecer el crecimiento y reducir la mortandad, hecho que se ha comprobado en aves de corral y cerdos. El producto comercial contiene aproximadamente, 10 g. de bacitracina por Kg. El suplemento para las comidas mas acabadas es de 1 Kg. mas o menos por tonelada de alimento.

Futuro: Es difícil sino imposible predecir con seguridad el futuro de un nuevo agente químico terapéutico. La bacitracina, igual que otros productos químicos del comercio, sobrevivirá sólo si puede permanecer en posición competidora desde el punto de vista del costo y utilidad. Para mantener esta posición la investigación actual se dirige por tres caminos: fermentación, recuperación y estudio de sus aplicaciones.

El estudio de la fermentación involucra la investigación de muchos medios posibles con la finalidad de aumentar la cantidad de bacitracina producida en un volumen dado, o de usar materias primas de menor costo para un igual rendimiento en antibiótico. Como una prueba de la influencia de estos factores podemos señalar que el perfeccionamiento de uno de ellos, la fermentación, permitió incrementar en sumo grado la producción de penicilina. La recuperación de bacitracina del caldo fermentado, debido a que es un proceso múltiple, ofrece muchas oportunidades de mejoras conducentes a lograr un mayor rendimiento total. En lo que respecta a los métodos de recuperación, el mejoramiento de algunas etapas de esta operación, permite afirmar que se llegará a un producto de mayor pureza. Respecto a las aplicaciones terapéuticas de este producto, podemos agregar a lo consignado, que serán necesarios nuevos y prolongados ensayos clínicos para agotar sus posibilidades.

## CAPITULO NOVENO

### Esquema de una producción en escala industrial

Los antecedentes de la producción industrial de bacitracina, tienen origen en las investigaciones efectuadas por los Laboratorios Ben Venue en 1945 en su planta de Bedford, Ohio. Ya en 1946 producían apreciables cantidades del antibiótico en un equipo que se usaba con anterioridad para la producción de penicilina en cultivo superficial.

A pesar de que el proceso de Ben Venue era decididamente una operación en pequeña escala, se usaban botellas de vidrio como recipientes para la fermentación, la cantidad obtenida era suficiente para su aplicación terapéutica ya conocida y para ensayos con el objeto de estudiar la extensión de su espectro antibacterial.

A fines de 1946 la Commercial Solvents Corporation encaró por sí misma el problema de la producción de bacitracina e intentó realizarlo en condiciones sumergidas. La probada economía de la producción de penicilina en estas condiciones, hizo aparecer al proceso como el más conveniente. Así el trabajo de laboratorio mostró que los títulos obtenidos con cultivos sumergidos, podrían ser iguales o más altos que los obtenidos con iguales medios en cultivo superficial. De ahí que en Junio de 1947, Commercial Solvents completó un convenio de investigación y licencia con Ben Venue y realizó el proceso de obtención de bacitracina para ellos, hasta que su propia planta piloto para producción sumergida, estuvo en operación hacia fines de ese año. Commercial Solvents, utilizando las instalaciones de fermentación existentes en la planta de Terre Haute produjo bacitracina en escala semi-comercial hasta fines de 1950 en que su nueva planta de antibióticos se puso en marcha.

La descripción detallada de la misma muestra la importancia de la combinación de microbiología, química e ingeniería bioquímica para que el diseño y operación de una planta de antibióticos sea un éxito.

Descripción: Una condición fundamental en cualquier proceso industrial de fermentación aerobia, es la provisión de una cantidad ade-

cuada de aire comprimido estéril; este no presentaba nuevos problemas para la organización de la Commercial Solvents dado que había operado con un proceso aeróbico para penicilina desde principios de 1944. Realmente el aire para la nueva planta de bacitracina lo provee el mismo sistema central que lleva aire para la planta de penicilina adyacente. Aun antes de construir la planta de penicilina Commercial Solvents había puesto en marcha otra fermentación aerobia para la producción de riboflavina.

Sistema de aire: Los compresores son del tipo recíproco de una sola etapa movidos por motores sincrónicos. Antes de completar la nueva planta de bacitracina, se aumentó la capacidad de la unidad central agregando un compresor centrífugo de seis etapas movido por turbina a vapor. La capacidad del nuevo compresor es de 11.320 litros (4.000 pié<sup>3</sup>) de aire por minuto, con una presión de descarga de 2,857 atm. (42 lb/pulg.<sup>2</sup>). Dos razones para la selección de este tipo de compresor son:

- 1- Consideraciones de espacio indicaban que cualquier otro tipo requeriría un agregado al edificio existente.
- 2- La demanda de vapor exhausto de la turbina, mostraba las ventajas de este tipo de compresor desde el punto de vista económico.

El aire que viene de los compresores pasa a través de refrigerantes del tipo tubular (shell and tube); del refrigerador el aire pasa a través de una trampa de la cual se extraen periódicamente la humedad condensada y el aceite usado.

Uno de los problemas que encontraron los ingenieros al diseñar la nueva planta, era la selección de un método efectivo y económico de esterilización de aire. Les ha indicado que muchos métodos se han usado con éxito en la industria; estos son:

- 1- Exposición a altas temperaturas.
- 2- Luz ultravioleta o precipitación eléctrica.
- 3- Lavado con soluciones caústicas, ácidos o soluciones desinfectantes y filtración a través de columnas rellenas con algodón, lana de escorias, lana de vidrio o carbón activado.

Las columnas rellenas con carbón activado se seleccionaron

finalmente como el equipo más aconsejable para esterilizar el aire para la nueva planta de bacitracina. La experiencia ha mostrado que es esencial que el aire comprimido bruto, que pasa a través de torres rellenas de carbón, debe calentarse por encima del punto de rocío para asegurar una provisión de aire esteril; por esta razón se instalaron pequeños precalentadores accionados a vapor del tipo tubular, en la línea de aire, inmediatamente antes de que entraran al fondo de los esterilizadores de carbón para aire. La temperatura alcanzada, no podía tenerse en cuenta para la diferencia en esterilidad del aire obtenido, dado que estaba en el rango de 40 a 60 °C. Se consideraba que sin calentar penetraban en el lecho de carbón gotitas de agua que se formaban, al enfriarse el aire por debajo del punto de rocío, por causa de la expansión a través de la válvula de control de entrada. Estas gotitas evidentemente, arrastraban bacterias y esporas, desde la superficie del lecho de carbón al medio de fermentación.

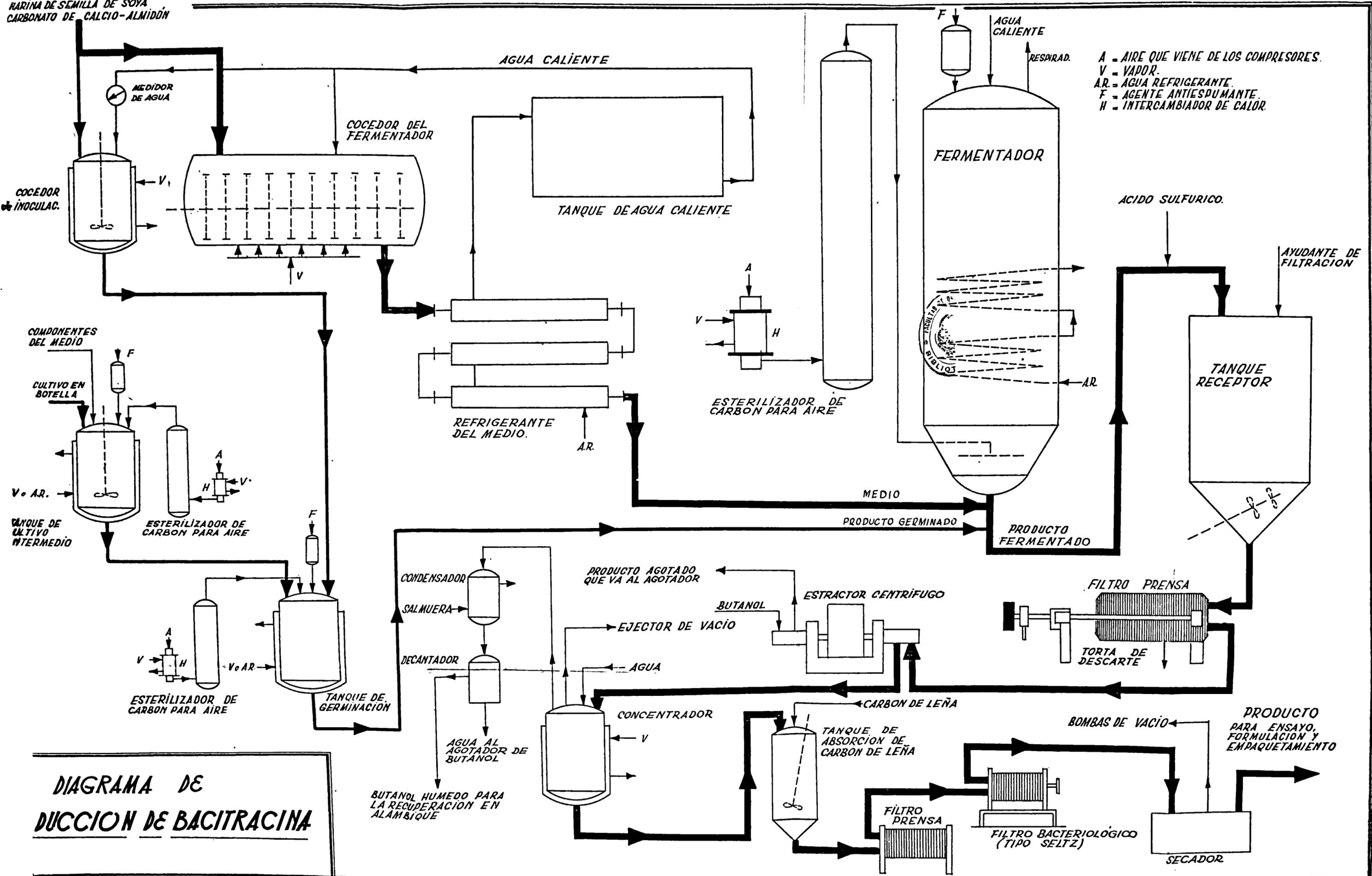
Cada tanque de cultivo intermedio, tanque de alimentación y fermentador, tiene su esterilizador de carbón para aire y precalentador propio. Esto se puede observar en el Diagrama de Operación que se adjunta.

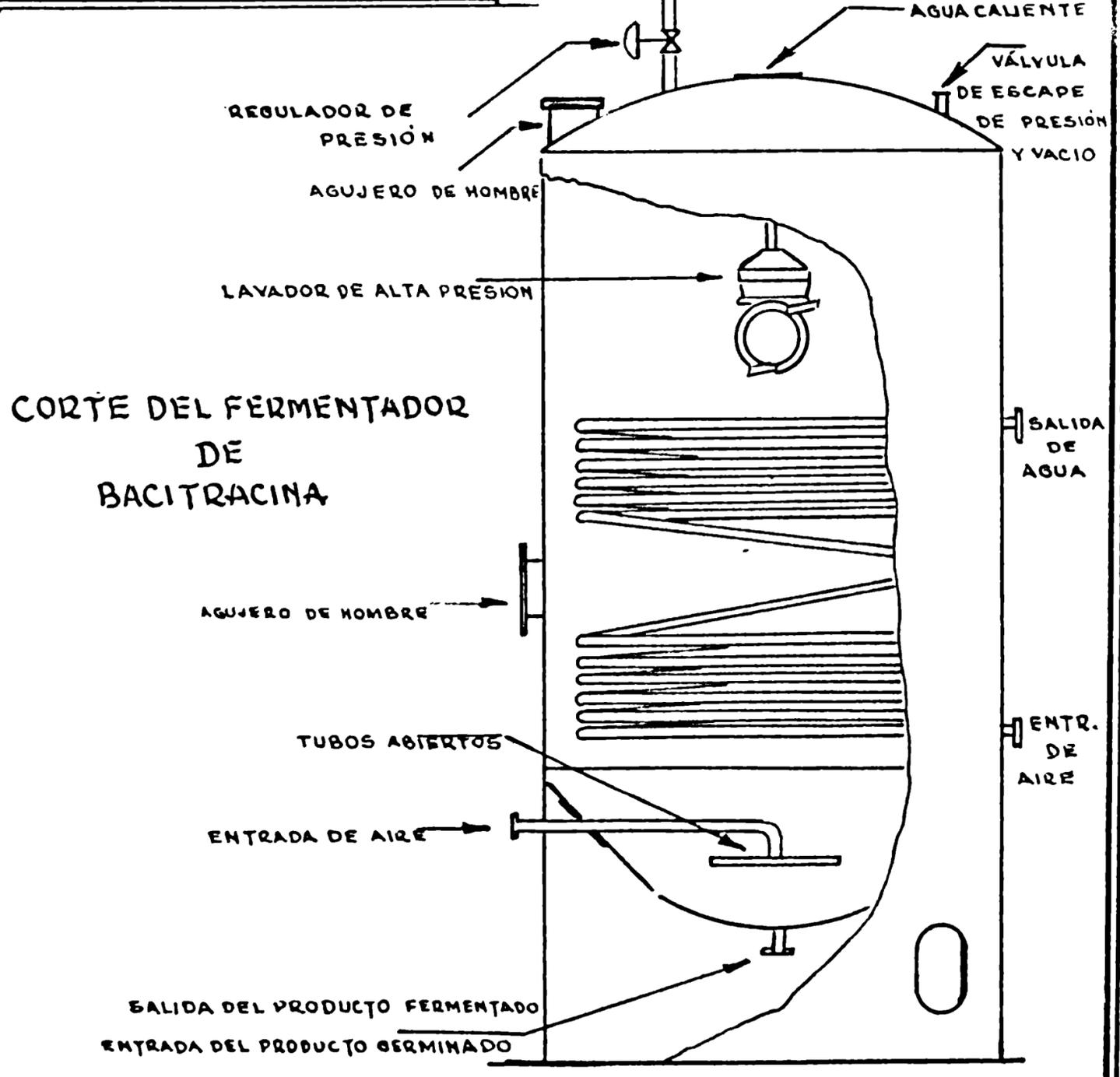
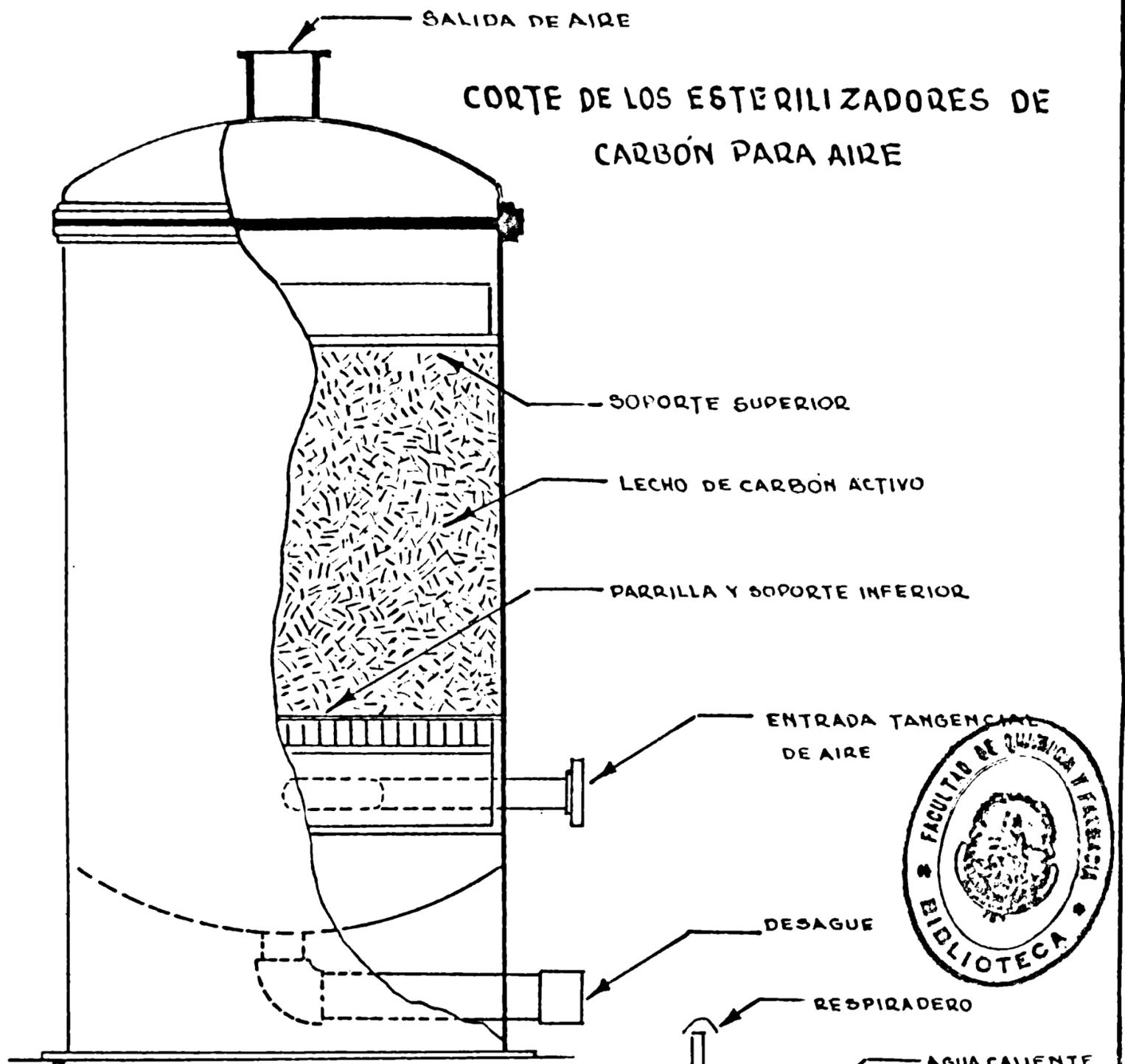
Los esterilizadores para aire son de tamaño variable, dependiendo del volumen de aire que se manipulea. El diseño es el mismo en todos los casos: el aire entra por la base de la torre y pasa a través de un lecho de carbón activado (U.S. Standard No. 8 a No. 14) y abandona luego la torre por el tope, quedando así libre de bacterias y en consecuencia apto para la fermentación. Un diseño de esterilizador de carbón para aire, se observa en la figura que se acompaña.

Las torres de carbón se esterilizan con vapor vivo cada vez que se realiza igual operación en el tanque de cultivo, tanque de alimentación o fermentador. En otras instalaciones similares se han usado torres de carbón durante varios años sin reemplazar los lechos. La pérdida de actividad es muy pequeña o nula como consecuencia del uso.

Desarrollo del cultivo y fermentación: El procedimiento general para la producción microbiológica, es hacer crecer el *Bacillus subtilis* Tracy sobre agar o mantenerlo en estado de spora, seco en tierra esterilizada. Una pequeña cantidad de esa tierra se transfiere asepticamente a un frasco agitador de 4 litros de caldo de peptona.

HARINA DE SEMILLA DE SOYA  
CARBONATO DE CALCIO-ALMIDÓN





Después que el frasco ha estado en el agitador de 18 a 24 horas a temperatura controlada de 37 grados centígrados, el cultivo queda listo para utilizarlo como inóculo en el tanque de cultivo intermedio, que está hecho de acero inoxidable y tiene una capacidad de 570 litros ( 150 galones N.A. )

Los componentes del medio se esterilizan por medio de vapor mientras se agita con un mezclador vertical; luego se enfría con agua que circula por la misma camisa que condujo el vapor utilizado en la esterilización. El cultivo contenido en el frasco se introduce a través de una conexión de manguera de goma que también se ha esterilizado con vapor; después de inocular se pasa aire estéril a través del tanque de cultivo durante 6 horas. Para ese entonces, ya ha tenido lugar un crecimiento apreciable y el conjunto se insufla con aire estéril, dentro de un tanque de germinación cargado previamente con medio de cultivo y enfriado a 37 grados C.

El tanque de germinación es de un diseño similar al tanque de cultivo intermedio, pero su capacidad es de unos 4.600 litros ( 1.200 galones N.A. ). Está construido de acero inoxidable y equipado con una camisa utilizable para enfriar o calentar. Se introduce aire estéril dentro del tanque de germinación, hasta que el ciclo de crecimiento ha llegado al máximo de reproducción. Luego, el contenido del tanque se insufla con aire estéril dentro de un fermentador que previamente ha sido cargado en parte con medio adecuado. El proceso de llenado del fermentador se completa después de la inoculación.

Los fermentadores son recipientes verticales de acero inoxidable con soldadura y de una capacidad de 90 a 95 mil litros. Cada fermentador está provisto de fondo cónico y la mitad inferior del aparato se enfría por medio de serpentines de acero inoxidable de 5,08 cms. de diámetro ( 2 pulgadas ).

La temperatura se controla automáticamente regulando el caudal de agua a través de los serpentines; el aire estéril se envía por hileras de tubos de acero inoxidable que tienen una abertura de 2,54 cms. ( 1 pulgada ) en su extremo situado cerca del fondo del fermentador y el caudal se mide a través de un orificio, del lado interno

del filtro de carbón, y está regulado por una válvula de control situada en ese mismo lugar. El medio queda sometido a una sobrepresión de  $1/3$  de atmósfera aproximadamente, la que se regula con una válvula de control, situada en la línea de ventilación.

Los fermentadores están colocados fuera de la edificación y cada uno se llena, inocula y desagota a través de una válvula que poseen en la base.

A medida que avanza la fermentación se aprecia un aumento gradual en el pH y uno más pronunciado en la velocidad de producción de bacitracina. Dado que no es posible realizar un ensayo inmediato sobre el título de bacitracina del medio, el tiempo óptimo de fermentación se determina en experiencias anteriores. Es observable a menudo, durante el ciclo de fermentación la producción de espuma. Esta es controlada por medio de un agente antiespumante, esterilizado por calentamiento. Generalmente se utiliza una mezcla en partes iguales de un aceite mineral y un agente químico sintético.

Equipo para la preparación del medio: El medio se prepara en tanques apropiados llamados cocedores. En la planta de bacitracina hay dos tipos de cocedores:

- 1- Cocedores para el medio de germinación, de unos 4.600 litros de capacidad.
- 2- Cocedores para el medio de fermentación de unos 45.500 litros de capacidad.

Los primeros están contruidos de acero al carbono revestidos en forma similar a los tanques de germinación. El agregado de agua se realiza a través de un regulador que corta el caudal cuando se alcanza el volúmen necesario. Los ingredientes del medio que son: harina de soya, carbonato de calcio y almidón en pequeña cantidad, se agregan por medio de un transportador mecánico. La capacidad de carga de cada cocedor es de 3.000 litros. El contenido se calienta por medio de vapor que circula por la camisa y se agita mediante un dispositivo que penetra por la parte superior. Luego del cocimiento, la masa caliente se insufla al tanque de germinación por medio de vapor a presión, donde se enfría hasta la temperatura de fermentación. Previamente, el tanque se esteriliza con vapor vivo.

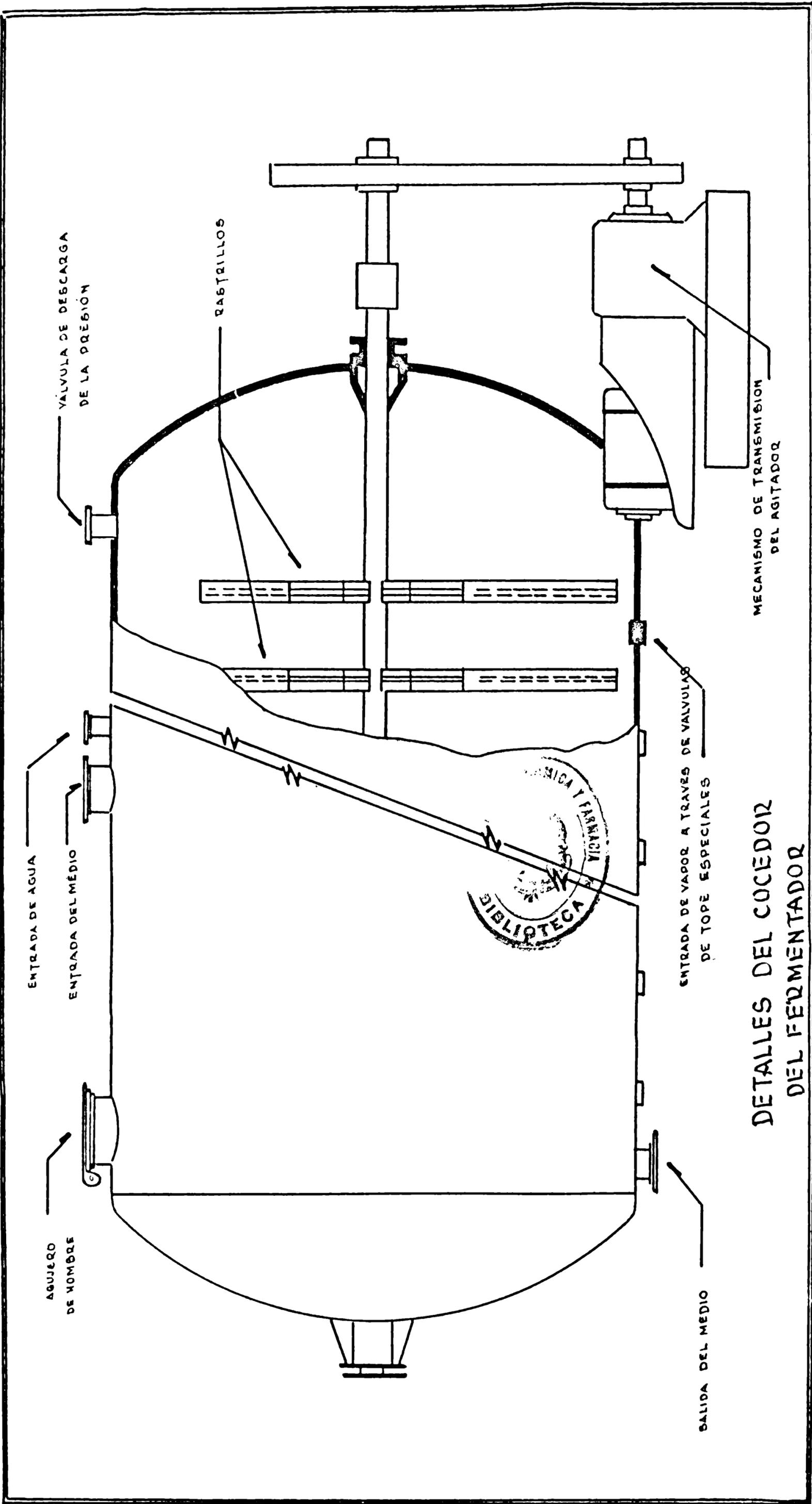
El cocedor para el medio de fermentación es un recipiente es un recipiente horizontal de acero al carbono, equipado con un agitador de acero inoxidable tipo rastrillo. El cocedor se carga con 35.000 litros de agua, que se miden con un manómetro de vidrio de nivel líquido, y con los ingredientes secos, traídos por transportador mecánico. La proporción de dichos componentes en este medio, es igual a la del medio de germinación.

El contenido se calienta con una lluvia de vapor vivo a través de 15 válvulas de retención, especialmente diseñadas y distribuidas regularmente a lo largo del fondo del cocedor. La masa se calienta a 100 °C, con la válvula de salida abierta para desplazar el aire. Esta válvula, se cierra luego y se eleva la temperatura a 121 °C, manteniendo la misma durante 60 minutos. En el transcurso de todo el período de cocimiento, se hace funcionar el agitador.

Luego de este tiempo, la masa caliente se bombea por medio de una bomba centrífuga de una sola etapa e impulsor abierto, a través de un enfriador, hacia el fermentador. El enfriador del medio es del tipo de tubo doble, donde la masa caliente pasa a través de los tubos internos y el agua, a través del espacio anular. Los tubos internos son de acero inoxidable y las camisas son de acero al carbono. El agua que sale de las camisas del enfriador se encuentra a una temperatura cercana a los 65°C y se la recolecta en un tanque de almacenamiento de agua caliente, de 90 a 100 mil litros de capacidad. Se la usa para cargar otros cocedores y también para lavar los fermentadores vacíos.

Recuperación: La recuperación o extracción de la bacitracina de la masa fermentada, se muestra esquemáticamente en el Diagrama de Operación que se adjunta.

Al completarse la fermentación, la masa se bombea a un tanque de recepción de unos 90 mil litros de capacidad, construido de acero inoxidable con fondo cónico. El pH de la masa fermentada se disminuye introduciendo ácido sulfúrico en la corriente, después que ésta abandona el fermentador. El ácido se bombea con una bomba dosificadora tipo pistón, y se mezcla con la masa por medio de ángulos agudos, en la línea de tubos que van al tanque de recepción. Después que se ha vaciado el fermentador, se lo limpia con un lavador rotativo tipo pistón,



DETALLES DEL COCEDOR DEL FERMENTADOR

dedicado originariamente a la limpieza de tanques de aceite; para ello se bombea agua a una presión de 13 a 14 atmósferas, por medio de una bomba centrífuga de dos etapas, desde el tanque colector de agua caliente hasta el limpiador. Se bombean aproximadamente de 650 a 700 litros por minuto. Después de un lavado de 12 minutos con agua caliente, el fermentador se esteriliza con vapor a una presión de una atmósfera, durante 6 a 12 horas.

La masa acidificada se agita en el tanque receptor, por medio de un agitador lateral de dos velocidades, instalado en la parte cónica, lo más bajo que sea posible. La velocidad del agitador se controla con instrumentos de nivel líquido. Cuando el líquido alcanza en el tanque un nivel determinado, el agitador comienza a funcionar a baja velocidad; ya a un nivel más alto, se conecta automáticamente una velocidad mayor, para compensar el aumento de volumen, y al vaciarse el tanque, se invierte el proceso. Desde un depósito y por medio de un transportador mecánico, se agrega al tanque de recepción, un coadyuvante de filtración en el momento en que la agitación es más intensa. La proporción óptima es de un litro de coadyuvante por cada 20 litros de contenido, pero está supeditada a la naturaleza del caldo fermentado. El conjunto se bombea a través de un filtro prensa de placa y marco, de 91,44 cm. (36 pulgadas), provisto de placas y marcos de aluminio. Las prensas están equipadas con artefactos hidráulicos para abrir y cerrar, accionados a motor. La torta prensada, que contiene el coadyuvante de filtración y las células bacterianas, se separa, mientras que el filtrado claro, fluye a un tanque. Al principio no se usaba la torta como subproducto vendible. Pero la semejanza de este proceso con el de la penicilina, hizo pensar en la posible obtención de suplementos para la alimentación de animales, sometiéndola a procedimientos adecuados de purificación y secado. Actualmente, eso se ha logrado y la Commercial Solvents posee en Teoria, una planta de bacitracina, cuya producción se destina a ese fin.

Desde el tanque que lo contiene, el filtrado se bombea a una batería de extractores centrífugos con solventes en contracorriente, extrayéndose la bacitracina con butanol. La relación de líquido a butanol es aproximadamente de 4 a 1. La velocidad de alimentación de líquido a cada uno de los extractores, es de 15 a 20 litros por minuto.

Los extractores son de acero inoxidable y el rotor trabaja a una velocidad aproximada de 2.000 revoluciones por minuto.

Podemos señalar que el butanol y el líquido a extraer pasan en contracorriente por un conducto en espiral ubicado en el rotor del extractor. El contacto íntimo entre el solvente y la capa acuosa determina la extracción de la bacitracina por el butanol.

Un diagrama de la sección transversal del rotor de un extractor, que es dable apreciar en la figura que se acompaña, indica esquemáticamente el principio de la operación. El espacio entre las vueltas de espiral está muy aumentado con el fin de facilitar su entendimiento.

Un extractor individual opera normalmente en forma continua durante 3 horas y luego se lo desconecta de la línea para hacerle un lavado de 1 hora con ácido fosfórico diluido, aunque en algunas oportunidades suele emplearse solución caliente de carbonato de sodio.

El butanol en el líquido que descarga de los extractores se recupera en un sistema simple de destilación que usa una columna con platos perforados como agotadora, con redestilación subsiguiente en un alambique provisto de una columna con campanas de burbujeo y decantador. La solubilidad del solvente es de, aproximadamente 34 lts. (9 galones) por cada 330 lts (100 galones) de líquido agotado, de ahí que es interesante su recuperación. El butanol que contiene la bacitracina proveniente de los extractores se reúne en un tanque de reserva y luego se carga en un concentrador vidriado de unos 2.300 lts. (600 galones) de capacidad provisto de un eyector de vacío de 3 etapas.

Una mezcla de butanol y agua, estando en franca ebullición, se evapora a 40 mm. de mercurio y 28 grados C condensándose los vapores en un recipiente cerrado enfriado con calmuera.

El destilado pasa a un decantador donde la mezcla butanol-agua sale hacia el agotador y el butanol húmedo se reúne, para cargar con él, el alambique anteriormente citado. La operación de concentrado es semi continua en el sentido de que el butanol se carga intermitentemente junto con pequeñas cantidades de agua hasta que el volumen total de butanol proveniente de un fermentador, cerca de 15.000 lts. (4.000 galones) ha sido elaborado. En ese momento queda en el concentrador un residuo acuoso de 380 a 570 lts. (100 a 150 galones) apro-

RECINTO DEL ROTOR

ROTOR

JIROS DE ESPIRAL

PRODUCTO FERMENTADO  
ACIDIFICADO

ALIMENTACION DE BUTANOL

BUTANOL QUE VA AL  
CONCENTRADOR

PRODUCTO AGOTADO QUE VA  
A LA RECUPERACION DE BUTANOL



VISTA ESQUEMÁTICA DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL  
DEL ROTOR EN LOS EXTRACTORES CENTRIFUGOS

zinadamento.

El concentrado nuevo se trata con carbón en medio ácido durante 30 minutos en un tanque de acero inoxidable de unos 760 lts. (200 galones) de capacidad provisto de agitador. Este tratamiento con carbón permite decolorar y desodorizar el concentrado; la proporción del mismo es de 225,5 gramos (0,5 libras) por cada 3,785 lts. (1 galón) de concentrado. Esta suspensión se filtra por filtro de prensa de placa y marco de 30,48 cm. (12 pulgadas), cuyas placas y marcos han sido recubiertos especialmente para evitar picaduras en el hierro. El filtrado pasa luego por filtro de Seitz para eliminar cualquier bacteria que pudiera haber desarrollado durante el proceso.

El concentrado libre de bacterias va luego a un secador a granel, de bandeja, que opera a una presión de 100 a 200 micrones y una temperatura de 65° C-75° C. Después que se ha eliminado el agua, el polvo que queda casi blanco, está listo para su utilización en farmacia.

Fuente en marcha de una nueva planta:

Se ha diseñado un sistema centralizado de controles automáticos para la planta; cuando esté completamente instalado, el sistema proveerá una acción remota y coordinada de casi todas las válvulas importantes en la unidad de fermentación; así por ejemplo, será posible establecer todas las válvulas implicadas en la inoculación de un fermentador, simplemente eligiendo una posición de la válvula piloto de puerta múltiple colocada en un panel y unida al sistema de acción neumática.

Una instalación de este tipo es de valor especial en fermentación dado que la posibilidad de contaminación proveniente de malas guarniciones en las válvulas, se eliminaría.

La instalación final de los controles automáticos se demoró debido a dificultades técnicas secundarias y escasez de artículos esenciales del equipo. En un principio y por estas mismas razones, muchas de las operaciones que debían cumplirse automáticamente, debieron efectuarse a mano, como la carga de los cocedores.

En todo proceso microbiológico la higiene es condición esencial; por ello, previamente a cada operación debe asegurarse la misma mediante una limpieza total de los tanques, cañerías y otros equipos, con una solución caliente de soda cáustica y de carbonato de sodio

en solución también caliente. Los cocedores del fermentador, cocedores de germinación, tanques de germinación y fermentadores deben inspeccionarse en busca de materias extrañas. El sistema íntegro debe someterse a una esterilización con vapor a 1 atmósfera de presión.

Para asegurar que la temperatura de las líneas de conexión a los sifones y de las secciones de conducción y válvulas es la que corresponde a la de esterilización, se emplean lápices indicadores que se fabrican con ceras especiales.

Antes de iniciar el proceso, deben realizarse una serie de operaciones de carácter exploratorio para asegurarse de la eficacia de cada una de las partes que componen la planta.

Control: Con la planta en operación y ya en escala de producción comercial, el control químico, físico y bacteriológico es particularmente importante. Estos conceptos sobre control se aplican igualmente a la producción de cualquier otro antibiótico.

La temperatura de cada fermentador, tanque de germinación y cocedor, se indica en un registrador circular de temperatura; las presiones se registran en la misma forma.

Periodicamente se extraen muestras de cada fermentador en forma aseptica para determinar el título, pH, contaminación con bacterias extrañas y ocasionalmente otras determinaciones especiales. Las muestras, normalmente se extraen con un intervalo de 12 horas, sin embargo para procesos especiales o etapas en las que se sospeche contaminaciones, se lo hace con mayor frecuencia.

Antes de inocularse se toma una muestra para comprobar si el medio a sembrar posee la esterilidad requerida; para ello se siembra una pequeña cantidad del medio en línea sobre placa de agar y se cultiva durante un tiempo igual al requerido para el desarrollo de la fermentación en el tanque de germinación o aún en el mismo fermentador. El registro que dan estas muestras es esencial para determinar la fuente de cualquier contaminación que pudiera desarrollarse.

Al contrario de lo que ocurre en los procesos químicos, el trabajo microbiológico no admite grados de pureza; la esterilidad es una condición absoluta.

Mientras que el proceso químico se realiza casi siempre en presencia de moléculas extrañas a los reactivos en juego, el proceso micro-

biológico generalmente no puede realizarse si hay una sola célula extraña, ya que tal célula o espora puede en cuestión de horas multiplicarse extraordinariamente e inhibir la fermentación.

En el caso de la bacitracina, la contaminación es particularmente seria ya que le afecta hasta el grado de detener una producción ulterior, y a menudo, destruir la que se hubiere producido hasta el momento de la contaminación.

Laboratorio: La planta descrita posee un laboratorio adecuadamente equipado, con dos habitaciones destinadas al controlador y una para siembras.

Las habitaciones de incubación están provistas de agitadores que oscilan a 100 ciclos por minuto y un recorrido de 0,63 cm. ( $\frac{1}{4}$  de pulgada). La temperatura que oscila en un rango de 24°C-40°C, se precia en mas menos 1°C.-

La habitación destinada a la siembra, está forrada con plástico de superficie opaca, lo cual permite una mayor limpieza y evitar el brillo debido a la luz ultravioleta. La habitación se lava frecuentemente con soluciones desinfectantes y se la rocía por completo antes de trabajar en ella, para asentar cualquier partícula de polvo.

II • PARTE EXPERIMENTAL

### A.- EQUIPO FERMENTADOR

La fermentación sumergida tiene especial interés industrial, ya que permite un gran ahorro de espacio por la calidad de los elementos utilizados, a la vez que resulta superior, con respecto a otro tipo de fermentación, el aprovechamiento del medio, pues el germen sumergido en la masa del mismo y mediante una adecuada agitación, consigue un contacto íntimo y total.

En nuestro caso, en que trabajamos con un germen francamente aerobio, debe proveerse además al sistema de fermentación, de una aereación forzada.

Se utilizó como fermentador un balón de vidrio Pyrex de 5.000 cc. de capacidad provisto de tres bocas; el aire inyectado a presión que llega al seno del balón por su boca central, lo provee un compresor impulsado por un motor eléctrico trifásico de cinco H.P. y 1425 revoluciones por minuto, que puede alcanzar una presión máxima de 200 libras.

El aire es conducido por un caño de hierro de  $\frac{1}{2}$  pulgada de diámetro. A la salida del compresor tiene un filtro de paredes de hierro, relleno de lana mineral y algodón para impedir el arrastre de cualquier cuerpo extraño. Inmediatamente después de este filtro, posee un manómetro que nos permite mantener constante el caudal de aire compensando la pérdida de carga. Luego continúa un tubo de hierro provisto de varios grifos que permiten la toma del aire; de uno de estos grifos por medio de un tubo de goma, llevamos el aire a un frasco de burbujes para saturarlo de humedad e impedir así la evaporación excesiva del medio de cultivo. Después continúa un filtro de paredes de vidrio, relleno de algodón, esterilizado, y cuyo objeto es esterilizar a su vez el aire a inyectar.

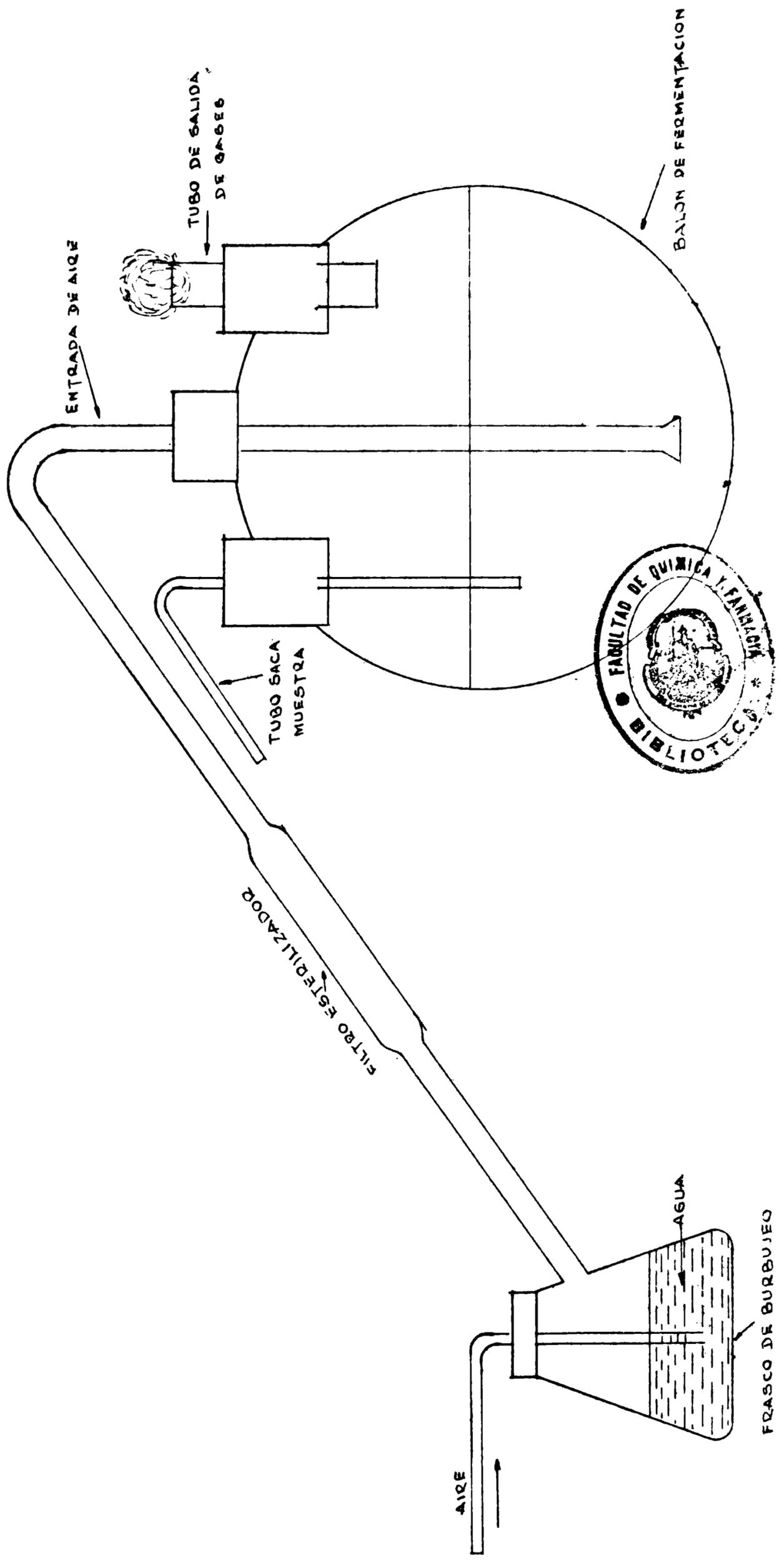
La boca central del balón se obtura con un tapón de goma perforado atravesado por un tubo de vidrio, uno de cuyos extremos se conecta al tubo de goma que conduce el aire, y el otro, introducido en el balón casi hasta el fondo, tiene un ensanchamiento en forma de embudo, que recubierto con un trozo de gasa permite una mejor distribución del aire inyectado.

Una de las bocas laterales está obturada con un tapón de goma perforado y atravesado con un tubo de vidrio recto de un diámetro de 12 milímetros. El extremo que se halla en el interior del balón no debe tocar el medio, y el externo se tapona flojamente con algodón envuelto en gasa. Este tapón penetra aproximadamente tres centímetros en el tubo de vidrio y su fijación se asegura con un pequeño trozo de tela adhesiva. Este tubo permite la salida del aire y el agregado del inóculo y de sustancias antisépticas.

La boca lateral restante se obtura también con un tapón de goma perforado y atravesado por un tubo de vidrio acodado en ángulo agudo, uno de cuyos extremos se encuentra en el interior del balón y llega aproximadamente al fondo del mismo. El extremo exterior tiene adaptado un trocito de tubo de goma cerrado por una pinza de Mohr.

Este dispositivo nos permite, aprovechando la sobrepresión que se crea en el balón al obturar momentáneamente el tubo de salida de aire, obtener muestra. El diámetro de este tubo debe ser reducido para que la cantidad de medio a desechar en la toma de muestra sea pequeña. La cantidad que se desecha es la que se halla en el interior del tubo en el momento de extraer la muestra, ya que evidentemente, no representa el estado del medio en ese momento.

Los detalles del aparato fermentador son dables de apreciar en el dibujo adjunto.



B.- GÉRMIN PRODUCTOR

El germen productor es una copa número 166 de *Bacillus subtilis* Tracy, de los Laboratorios "Ocefa". Este germen es mantenido en agar vitamínico inclinado de la siguiente composición:

1.- Caldo común compuesto por:	1.000 cc.
a) Peptona de carne	10 g.
b) Extracto de carne	10 g.
c) NaCl	2,5 g.
d) $\text{Na}_3\text{PO}_4$	1,5 g.
e) Agua destilada c.s.p.	1000 cc.
2.- Extracto de tomate	30 cc.
3.- Extracto de levadura	2 g.
4.- Glucosa	5 g.
5.- Hígado 1:100	2 g.
6.- Jarabe polivitamínico	2 cc.

Se ajusta el pH a 6,8-7,0 y se agrega al medio 15 gramos de agar agar. Se hierve 30 minutos, se lleva a un litro, se filtra por algodón en caliente y se reparte en tubos. Estos se esterilizan en autoclave a una atmósfera de presión durante 30 minutos.

Se dejan enfriar en pico de flauta (agar inclinado) y en ellos se replica el germen con ansa de platino o catal. Se incuban a 37 grados C durante 48 horas y se conservan en heladera.

Es necesario replicar el germen cada 6 meses.

La fórmula del jarabe polivitamínico utilizado es la siguiente:

Extracto hepático titulado en vitamina	
$\text{A}_{12}$ ( 25 $\mu\text{g/g}$ ) y ácido fólico	12,5 g.
Vitamina $\text{B}_1$	0,02 g.
Vitamina $\text{B}_2$	0,01 g.
Vitamina $\text{B}_6$	0,005 g.
Vitamina C	0,05 g.
Nicotinamida	0,10 g.
Acido glutámico	1,00 g.
Sacarato de hierro	5,00 g.

Ca HPO <sub>4</sub>	1,00 g.
CuSO <sub>4</sub>	0,01 g.
MnSO <sub>4</sub>	0,005 g.
MgSO <sub>4</sub>	0,05 g.
CoSO <sub>4</sub>	0,0005 g.
ZnSO <sub>4</sub>	0,0065 g.
KI	0,001 g.
NaCl	0,80 g.
Sacarosa	60,00 g.
Acido benzoico	0,20 g.
Agua destilada c.s.p.	100,00 cc.

**C.- INOCULACIÓN Y PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO:**

Para inocular el germen al medio de cultivo, debe prepararse un inóculo el que se hace en caldo vitamínico de la siguiente composición :

1.- Caldo común compuesto por :	1000 cc.
a) Peptone de carne	10 g.
b) Extracto de carne	10 g.
c) NaCl	2,5 g.
d) $\text{MgSO}_4$	1,3 g.
e) Agua destilada c.s.p.	1000 cc.
2.- Extracto de tomate	30 cc.
3.- Extracto de levadura	2 g.
4.- Glucosa	5 g.
5.- Hígado 1:100	2 g.
6.- Jarabe polivitamínico	2 cc.

Este jarabe polivitamínico, es el mismo que utilizamos al preparar el agar vitamínico y cuya fórmula detallamos anteriormente.

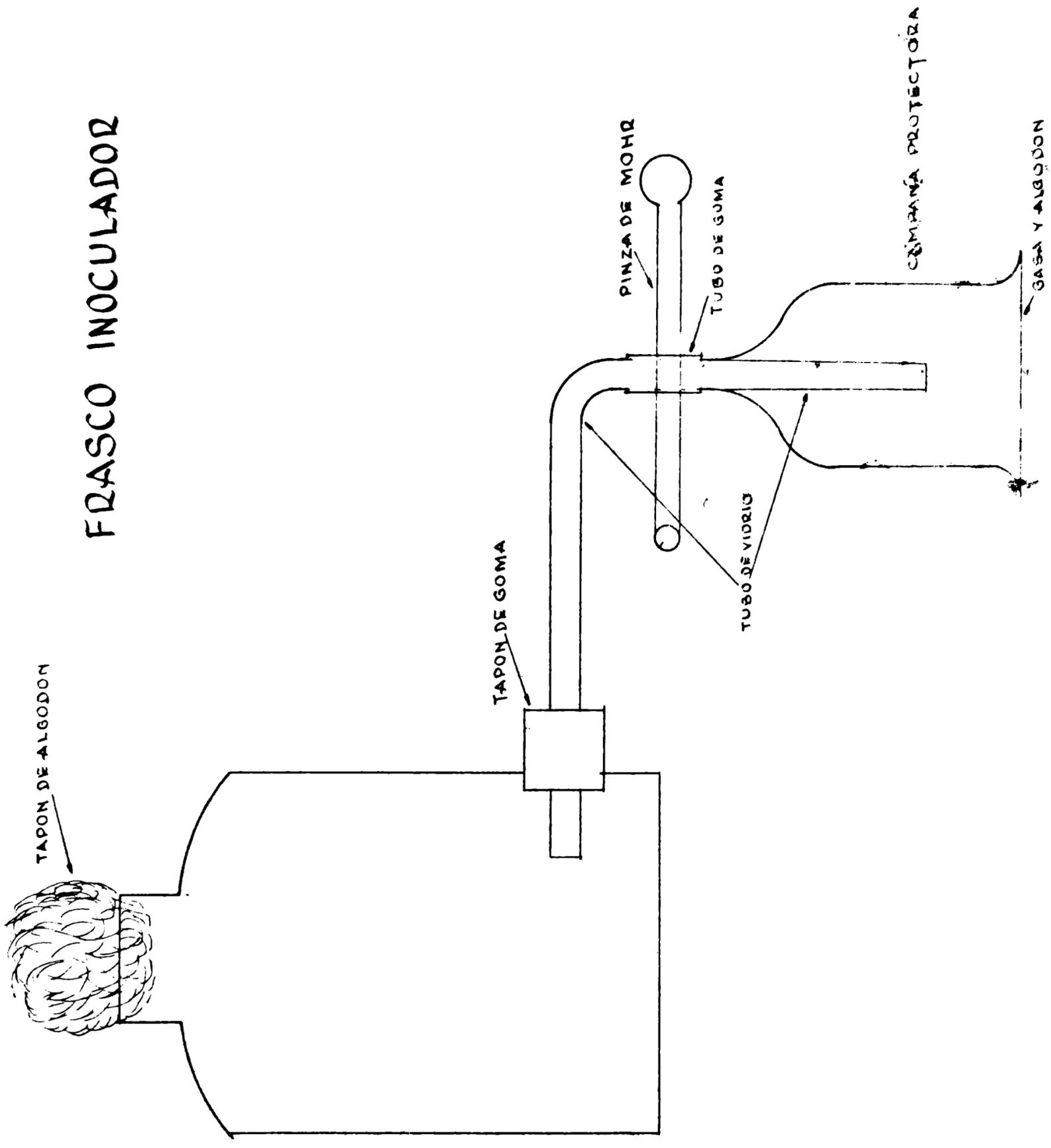
El caldo así preparado se hierve durante treinta minutos para facilitar la disolución de los componentes. Luego se filtra por algodón, se ajusta el pH a 6,8 - 7,0 y se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión, durante media hora.

El medio se coloca en un frasco de Mariotte cuya abertura inferior está obturada por un tapón de goma atravesado por un tubo de vidrio acodado en ángulo recto, uno de cuyos extremos penetra en el interior del frasco, y el exterior, se conecta mediante un trozo de tubo de goma a otro de vidrio que posee un extremo afinado, cubierto por una campanita invertida. Esta campana se cubre con algodón y luego con gaza. Una pinza de Mohr toma el tubo de goma que une los tubos de vidrio.

Este dispositivo nos permite efectuar la inoculación al balón de fermentación en condiciones de asepsia.

Colocado el medio de inóculo en el frasco de Mariotte, cuya boca superior se obtura con un tapón de algodón, se esteriliza

# FRASCO INOCULADOR



a una atmósfera de presión durante 30 minutos. Una vez frío el medio, procedemos a la siembra del mismo. Para ello podemos emplear dos métodos: uno consiste en transferir mediante el asa, desde el agar inclinado donde se ha cultivado el germen, una partícula de éste al interior del frasco de Mariotte, en condiciones de asepsia.

El otro método consiste en agregar al tubo de agar inclinado donde se cultiva el germen, 1 cc. de agua destilada estéril, se agita luego el tubo y se transfiere mediante pipeta estéril y en condiciones de asepsia, al frasco de Mariotte donde se halla el medio, la suspensión del germen que se ha logrado por la agitación.

Una vez sembrado se lo mantiene en estufa a 37 grados C durante 48 horas. Desarrolla el germen en ese tiempo y tenemos así preparado el inóculo.

Es necesario ensayar la cantidad de inóculo que debe agregarse a una cantidad dada de medio de cultivo, a fin de obtener un buen desarrollo del germen, en un período relativamente breve, observable por la masa del mismo y que se mantenga sin lisarse durante 10 a 12 días por lo menos, pues en ese término, según experiencias anteriores, se alcanza la producción máxima de antibiótico.

Para ensayar la cantidad adecuada de inóculo utilizamos como medio de cultivo el siguiente:

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	1 g.
3.- Peptona de carne	10 g.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $Fe SO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada	1000 cc.

Este caldo se hierve durante 30 minutos para facilitar la disolución de los componentes.

Se lleva al volumen primitivo y se filtra por algodón.

Se ajusta el pH a 6,8-7,0 y se colocan tres litros del mismo en el balón de fermentación que se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión durante 30 minutos. Una vez frío se agrega asepticamente, la cantidad necesaria de glucosa en solución estéril al 50%. Se debe emplear esta técnica para el agregado de glucosa, debido a que si se la esteriliza en presencia de fosfatos, se produce una caramelización muy pronunciada, que resulta perjudicial para el crecimiento del germen.

La esterilización se hace sobre el conjunto integrado por el balón, el filtro de algodón y las uniones de goma, que deben ser de latex para evitar deterioros por acción del calor. Estas se obturan mediante pinzas de Hoffman para evitar acumulaciones de caldo en las mismas.

Como el *Bacillus subtilis* Tracy necesita aereación forzada, debemos ensayar también el caudal adecuado de aire, o sea aquel que produzca una agitación efectiva del medio, sin ser excesivamente tumultuosa, y que permita obtener mayores rendimientos de antibiótico.

Para estos ensayos se utilizaron tres balones de fermentación, conteniendo 3 litros de medio cada uno. Estos balones se inocularon con 75 cc., 100 cc. y 150 cc. de inóculo respectivamente, y se hicieron tres series de fermentaciones, pasando en la primera un caudal de  $\frac{1}{2}$  litro de aire por litro de Medio de cultivo, por minuto; en la segunda se pasó un litro de aire por litro de medio de cultivo, por minuto; y en la tercera serie, 2 litros de aire por litro de medio, por minuto. El caudal de aire se mide con un medidor de gases.

La técnica de agregado de inóculo es la siguiente: se quita el tapón de gasa y algodón que obtura el tubo de salida de gases del balón y se lo flamea con la llama de un mechero. Simultaneamente se quita la cubierta de gasa y algodón que recubre la campana adosada al frasco Mariotte, se la flamea y se hace coincidir el pico de descarga del frasco inoculador, que está protegido por la campana, con el tubo de salida de gases.

Una vez frías las partes flameadas, se abre la pinza de Mohr, penetrando así el inóculo en el balón. La campanita protege de cualquier peligro de contaminación, y además se hace circular aire por el balón, lentamente, para asegurar mas aún, las condiciones de asepsia de esta operación.

Finalizada la misma, retiramos el frasco de Mariotto, volvemos a flamear el tubo de salida de gases y colocamos nuevamente su tapón de algodón. Ya estamos en condiciones de iniciar la fermentación, la que se realiza a una temperatura de 29-30 grados centígrados. Para ello se utiliza una estufa de las siguientes características: su base y esqueleto son de madera y sus paredes y techo de cartón prensado. Posee miradores de vidrio y está aislada con planchas de amianto. El sistema de calentamiento está constituido por una resistencia de alambre, desarrollada uniformemente en la base y convenientemente aislada. La temperatura es regulada mediante un termorregulador de dilatación, manejable desde afuera y provisto de lámpara piloto. Orificios practicados y dispuestos adecuadamente, permiten la introducción de los tubos de goma que conducen el aire.

Un inconveniente que se presenta en esta fermentación es la formación de espuma, que se produce al desarrollar el germen por efectos del pasaje de aire. Para obviar el mismo pueden utilizarse diversos agentes anti-espumantes, entre los que podemos citar los siguientes: aceite de semilla de soya; aceite de manteca de cerdo; aceite de manteca de cerdo con 1% de alcohol octadécilico; alcohol etílico de 95 grados con 1% de alcohol octadécilico; etc.-

El utilizado en nuestro trabajo es una emulsión de silicones en agua, que además de sus propiedades anti-espumantes, presenta la ventaja de ser inerte con respecto al germen cultivado. Esta emulsión se esteriliza en autoclave a la presión de una atmósfera durante 15 minutos, y en caso de separarse una pequeña fase acuosa, se la agita fuertemente para homogeneizarla.

Por el tubo de salida de gases, previamente flameado, se agrega con pipeta estéril, la cantidad necesaria para lograr la desaparición de la espuma.

Cada 24 horas se observó la marcha de la fermentación y se extrajo muestra, determinándose su contenido en antibiótico por el método que se describe en el capítulo siguiente. Se continuó así durante 10 días.

La cantidad de inóculo óptima, conforme a los requisitos ya consignados es de 100 cc. para 3 litros de medio de fermentación.

En cuanto al ensayo del caudal de aire, se observó que con el menor de ellos se lograron rendimientos bajos. Con los otros dos, se obtuvieron

mayeres e iguales rendimientos, pero como el de dos litros por litro de medio, por minuto, produjo agitación violenta del medio con salpicaduras inconvenientes, se elige como caudal adecuado el de un litro de aire por litro de medio de fermentación, por minuto, ya que el mismo provoca una agitación apropiada.

Como consecuencia de estos ensayos, para todas las fermentaciones que se realizarán en el presente trabajo, la relación de inóculo-medio de fermentación, será de 100 cc. por cada tres litros, y el caudal de aire de un litro por litro de medio de fermentación, por minuto.

## D. - TÉCNICA DE VALORACIÓN DEL ANTIBIÓTICO

Para valorar la bacitracina producida, utilizamos un método biológico que se basa en la apreciación de la acción inhibitoria que ejerce sobre un germen "test", el antibiótico contenido en la muestra que se valora. Como germen "test" puede utilizarse el *Staphylococcus albus*, *Streptococcus fecalis*, etc. Como término de comparación se usa una solución patrón de bacitracina, que se agrega en cantidad y diluciones conocidas, en las mismas condiciones de trabajo a que sometemos la muestra a valorar.

Para hacer la solución patrón se utilizó una bacitracina en polvo de la Penick Brand (E.E.U.U.), llamada Penitracin. Este antibiótico tiene 54 unidades por miligramo y está controlada con el número 163-L.J.F.. La técnica de valoración es la siguiente: la preparación de la solución patrón de bacitracina se realiza así:

- 1) Se disuelven 500 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en unos 80 ml. de agua destilada.
- 2) Se agregan 100 mg. de bacitracina.
- 3) Se ajusta el pH a 6 con NaOH al 1%.
- 4) Se enrrasa a 100 ml. con agua destilada.

Preparada la solución, se la guarda en heladera bajo toluol, habiéndose probado que la misma posee una estabilidad de dos meses por lo menos.

Las diluciones necesarias para la valoración las hacemos en caldo Moyer, cuya fórmula es la siguiente:

1.- Peptona de carne	100 g.
2.- Extracto de levadura	30 g.
3.- Extracto de carne	30 g.
4.- Glucosa	20 g.
5.- NaCl	70 g.
6.- Buffer	
a) $\text{KH}_2\text{PO}_4$	26,30 g.
b) $\text{K}_2\text{HPO}_4$	73,70 g.
7.- Agua destilada	10 litros.

En tubos de ensayo de igual diámetro, se colocan 5 ml. de este caldo en cada uno. Se taponan con algodón y se esterilizan en autoclave durante 30 minutos a una atmósfera de presión.

La preparación del material se realiza en la siguiente forma: se toma 1 ml. de cada muestra y se lo agrega a un tubo con 5 ml. de caldo Moyer. Este tubo se calienta luego a 100°C durante 5 minutos utilizando para ello una olla a presión sin colocarlo la válvula y con poca cantidad de agua, de manera de calentar a vapor fluente.

El calentamiento tiene por fin matar gérmenes y eliminar el toluol que tiene el material, ya que las muestras, hasta el momento de la valoración, se guardan en heladera bajo toluol.

Esta operación se repite con la solución control, es decir que a un tubo que contiene 5 ml. de caldo Moyer, se le agrega 1 ml. de solución control y se lo calienta a 100°C durante 5 minutos en olla a presión. Luego hacemos con la solución control y las muestras a valorar, las siguientes series de diluciones:

<u>Tubo</u>	<u>Caldo</u>	<u>Cantidad de muestra</u>		<u>Dilución</u>
1	5 ml.	1,0 ml.	} del tubo 1	1:6
2	"	1,0 ml.		36
3	"	0,5 ml.		66
4	"	0,3 ml.		108
5	"	0,2 ml.		156
6	"	1,0 ml.	} del tubo 2	216
7	"	0,5 ml.		396
8	"	0,3 ml.		648
9	"	0,2 ml.		936
10	"	0,00 ml.		testigo

También en el tubo No. 10 se puede agregar 1 ml. del tubo No. 3 y tendremos así una dilución 1:1296; lógicamente dejaríamos otro tubo como testigo.

El germen "test" por nosotros utilizado, es una cepa No. 82, de *Estafilococo albus* de los Laboratorios "Coefa", que se acondiciona para su empleo de la siguiente manera: de un cultivo en agar vitamínico inclinado, hacemos un repique en 5 ml. de caldo Moyer y lo incubamos en estufa a 37°C durante 24 horas.

De este tubo se toman 2 gotas con pipeta estéril y se suspenden en otros 5 ml. de caldo Moyer, se agita y de esta suspensión se agregan 2 gotas, también con pipeta estéril y en condiciones de asepsia, a cada uno de los tubos que conforman la serie de diluciones.

Estos tubos se cultivan en estufa a 37° C durante ocho horas, al cabo de las cuales se hace la lectura; la misma consiste en ver en cual de los tubos de la serie de diluciones de la muestra problema, comienza a desarrollarse el *Estafilococo*, lo que indica que a esa dilución, la concentración de bacitracina existente, no es suficiente para inhibir el crecimiento del germen.

Lo mismo hacemos en la escala patrón y deducimos el número de unidades o concentración de bacitracina mediante el siguiente razonamiento: la escala patrón usada tiene como concentración máxima 54 unidades (1 mg./ml.), la que corresponde al tubo inmediato anterior que muestra desarrollo; luego, en la escala de diluciones problema, al tubo inmediato anterior en que apreciamos desarrollo, le corresponderán  $x$  unidades. Ejemplo:

Tubo de escala patrón: No.6 ; dilución: 1:216

Tubo de escala problema: No.4 : dilución: 1:108

216..... 54 u.

108..... x u.

$$x : \frac{108 \times 54}{216} : 27 \text{ unidades.}$$

El doctor Oscar MÜHLL, fundándose en esto, confeccionó una tabla que permite leer directamente el número de unidades, tabla que se adjunta.

T A B L A


---

-Tubo control	- 1 -	2-	3-	4 -	5 -	6 -	7 -	8 -	9 -	10 -	-
-Dilución:	- 6 -	36-	66-	108-	156-	216-	336-	698-	936--	1296	-
-Cantidad:	-1,0-	1,0-	0,5-	0,3-	0,2-	1,0-	0,5-	0,3-	0,2 -	1,0	-
<hr/>											
Tubo muestra:	1 -	-	-	3	-2,07-	1,8-	0,8-	0,5-	0,5 -	-	-
"	"	2 -	-	23,4-	15 -	12 -	9 -	5 -	3 -	2 -	-
"	"	3 -	-	54-	33 -	23 -	16 -	9 -	5,5-	4 -	-
"	"	4 -	-	-	54 -	37 -	27 -	15 -	9 -	6 -	-
"	"	5 -	-	-	78 -	54 -	39 -	21,5-	13 -	9 -	-
"	"	6 -	-	-	108 -	75 -	54 -	30 -	18 -	12,5-	-
"	"	7 -	-	-	-	-	92 -	54 -	33 -	22,5-	-
"	"	8 -	-	-	-	-	162 -	88 -	54 -	33 -	-
"	"	9 -	-	-	-	-	234 -	127 -	78 -	-	-
"	"	10 -	-	-	-	-	324 -	177 -	-	-	-

---

### B.- Empleo de distintos medios de cultivo.

Describiremos las fermentaciones realizadas en este trabajo. El propósito que perseguimos en el mismo es encontrar un medio de fermentación con un sustrato proteico asequible a nuestra industria, que reemplace al ácido l-glutámico del medio de fermentación empleado por ANKER, JOHNSON Y MELENEY y por HENDLIN en los trabajos que se han tomado como guía de éste.

De cada una de estas fermentaciones se extrajo muestra cada 24 horas efectuando sobre las mismas una determinación colorimétrica de pH y una valoración biológica del antibiótico producido.

#### a.-Primera serie de fermentaciones:

Se utilizó como fuente de nitrógeno proteico, una peptona de carne cuyo porcentaje de nitrógeno total es de 6,93 g.- Como la misma reemplazará al ácido l-glutámico, sustrato proteico empleado por ANKER, JOHNSON Y MELENEY y por HENDLIN, que posee un porcentaje de nitrógeno total igual a 9,52 g., debemos agregar a nuestro medio una cantidad de peptona que equivalga al nitrógeno del ácido l-glutámico. Agregando la cantidad de 10 gramos de peptona por litro de medio, cumplimos sobradamente con este requisito.

El medio de fermentación tiene la composición siguiente:

1.-Glucosa	5 g.
2.-Acido cítrico	1 g.
3.-Peptona de carne	10 g.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g.
9.-Agua destilada	1000 cc.

Este caldo se hierve durante 30 minutos, se filtra por algodón, se ajusta el pH a 6,8- 7,0, se colocan tres litros del mismo en el balón de fermentación y se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión durante 30 minutos, junto con el filtro de aire

que se adosa ya definitivamente.

Una vez frío, por las razones ya expuestas, se adiciona la glucosa en solución estéril al 50% en condiciones asépticas. Luego se inocular el medio de cultivo con el aparato y la técnica ya descrita. Se pasa un caudal de aire de 3 litros por minuto que se mide en un contador de gases a palata.

Teniendo en cuenta la época del año que nos permitía mantener en el laboratorio una temperatura que oscilaba alrededor de los 24 grados C, este primer conjunto de fermentaciones en el cual se ensayaron nueve sustratos proteicos, se realizó a temperatura ambiente.

Iniciada la fermentación que se prolongó durante 10 días, ya que en ese lapso de acuerdo a la teoría, debe lograrse la producción máxima de bacitracina, dato ratificado por la experiencia, fué necesario agregar repetidas veces el agente antiespumante.

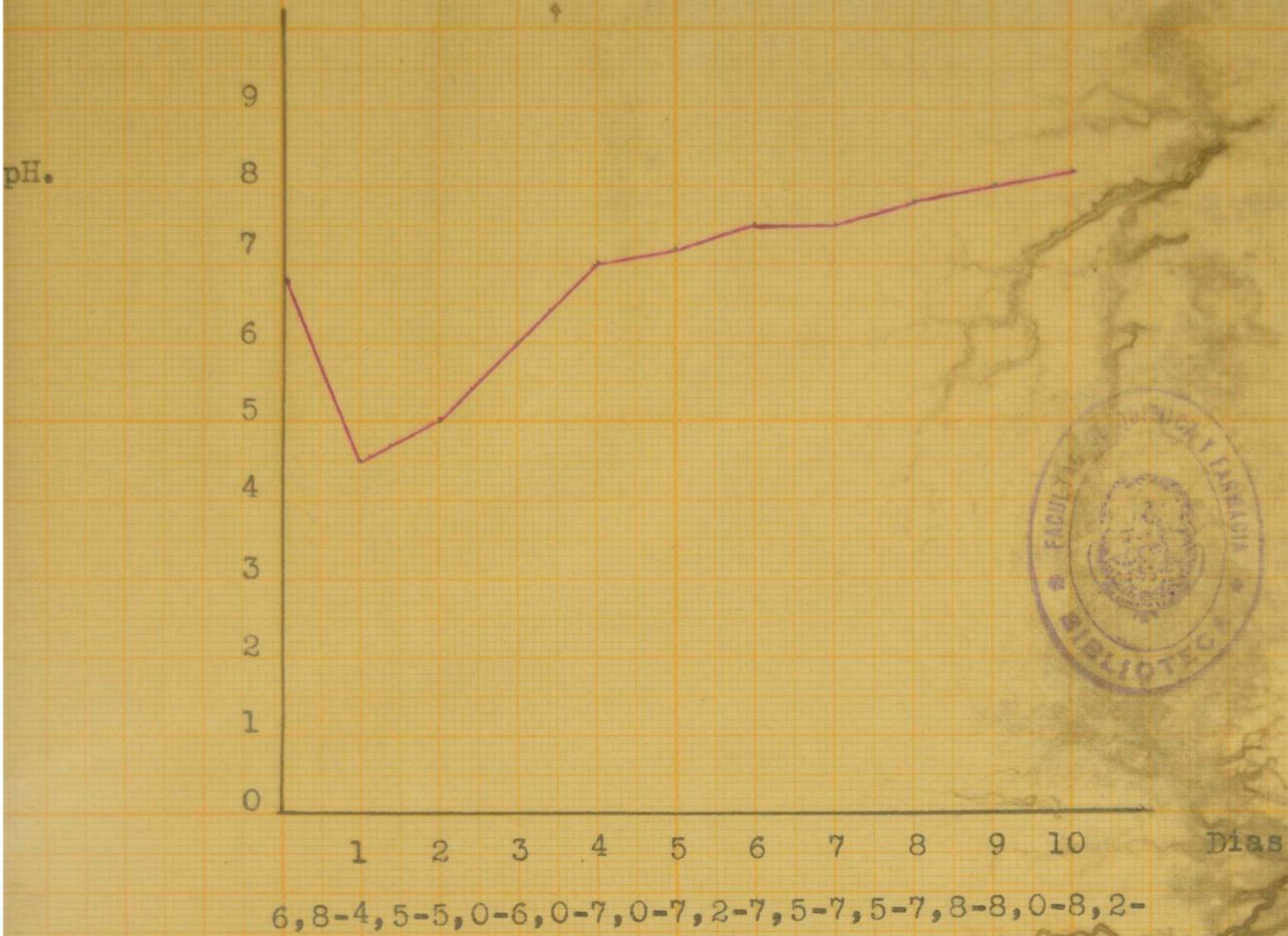
La emulsión de silicones se agregó mediante pipeta estéril, por el tubo de salida de gases previamente abierto y flameado con un mechero. Dicho agregado se inició a las 24 horas de incubación suspendiéndose al séptimo día, pues la producción de espuma había disminuido casi totalmente.

Cada 24 horas se extrajo muestras de los 3 balones en que se realizaba la fermentación. La extracción se hizo siguiendo la técnica mencionada anteriormente. En cada muestra se determinó el pH y concentración del antibiótico.

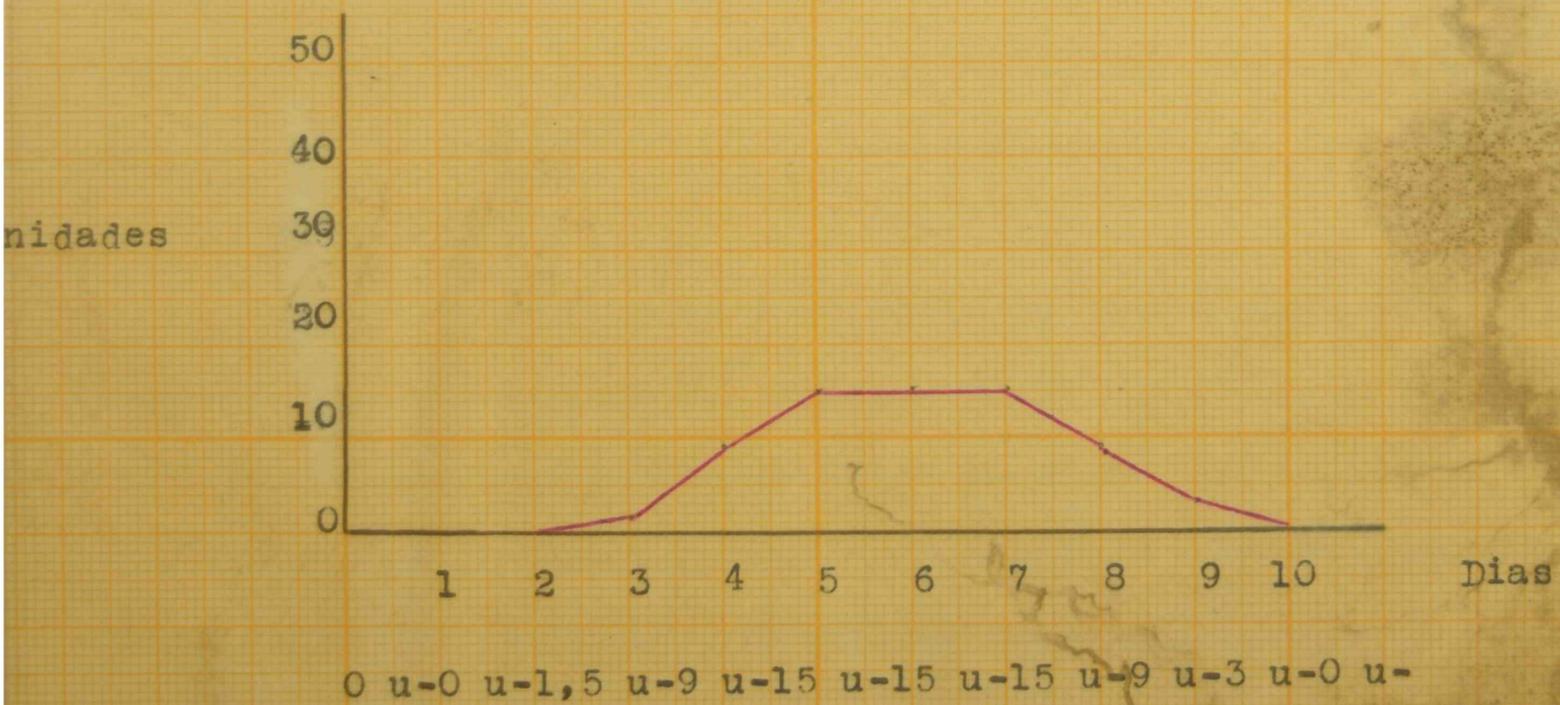
Con estos valores se han construido los siguientes diagramas:

Primera serie de fermentaciones

Curva de pH.



Curva de rendimiento



2. Segunda serie de fermentaciones.

Como fuente de nitrógeno orgánico, se utilizó un "Corn steep" producido por Refinerías Argentinas de Maíz que nos fuera cedido gentilmente por los "Laboratorios Squibb", cuya riqueza en nitrógeno es de 4,92 g.%. Para mantener la equivalencia en nitrógeno con respecto al ácido l-glutámico del medio tipo, se deben utilizar 10 cc. de este "Corn steep" por litro de medio de fermentación.

La composición del medio empleado es la siguiente:

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	2 g.
3.- "Corn steep"	10 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada c.s.p.	1000 cc.

Debido a la mayor cantidad de materias minerales que contiene el "Corn steep", se aumenta a 2 gramos la cantidad de ácido cítrico empleado. Este ácido permite un mejor aprovechamiento de los metales al formar complejos solubles, que de lo contrario con los fosfatos, forman sales muy poco solubles. HENDLIN comprobó que con este agregado favorecía el aprovechamiento de los metales por el microorganismo.

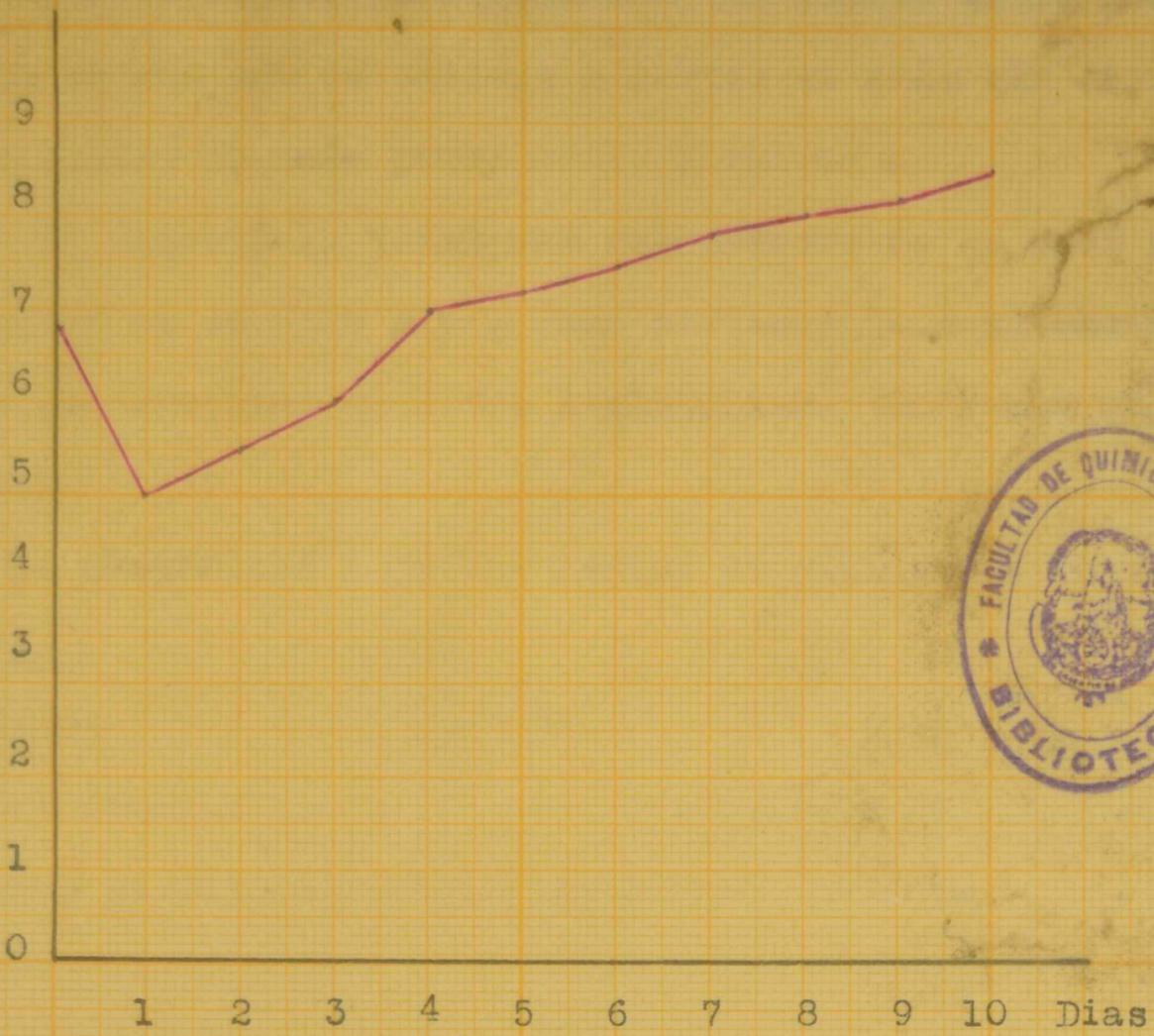
La técnica de trabajo en lo que respecta a la conducción de la fermentación, extracción de muestras, determinación de pH y valoración del antibiótico, es la misma que empleamos en la fermentación anterior. En cuanto al agregado de antiespumante se inició a las 24 horas de incubación, suspendiéndoselo al sexto día.

La variación del pH y los rendimientos en bacitracina, figuran en los gráficos siguientes:

Segunda serie de fermentaciones

Curva de pH.

pH.



6,8-5,0-5,5-6,0-7,0-7,2-7,5-7,8-8,0-8,2-8,5-

Curva de rendimiento

unidades



0 u-0 u-3 u-9 u-16 u-16 u-9 u-3 u-0 u-0 u-

-. Tercera serie de fermentaciones:

Como fuente de nitrógeno proteico se emplean dos tipos de "licor de Corn steep", es decir un "Corn steep" sin concentrar obtenido en el laboratorio con técnicas que se describen en el capítulo correspondiente. La diferencia que existe entre los dos tipos, consiste en que uno se obtiene a partir de maíz sin germinar, y el otro, a partir de maíz previamente germinado.

La riqueza en nitrógeno del primero es de 0,65 g. % y la del segundo es de 0,88 g. %. Para mantener la equivalencia en nitrógeno con respecto al ácido l-glutámico, tendremos en cuenta estos datos.

La composición de los medios de cultivo es la siguiente:

Medio A

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	2 g.
3.- "Licor de Corn steep" (sin germinar)	75 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada c.s.p.	1000 cc.

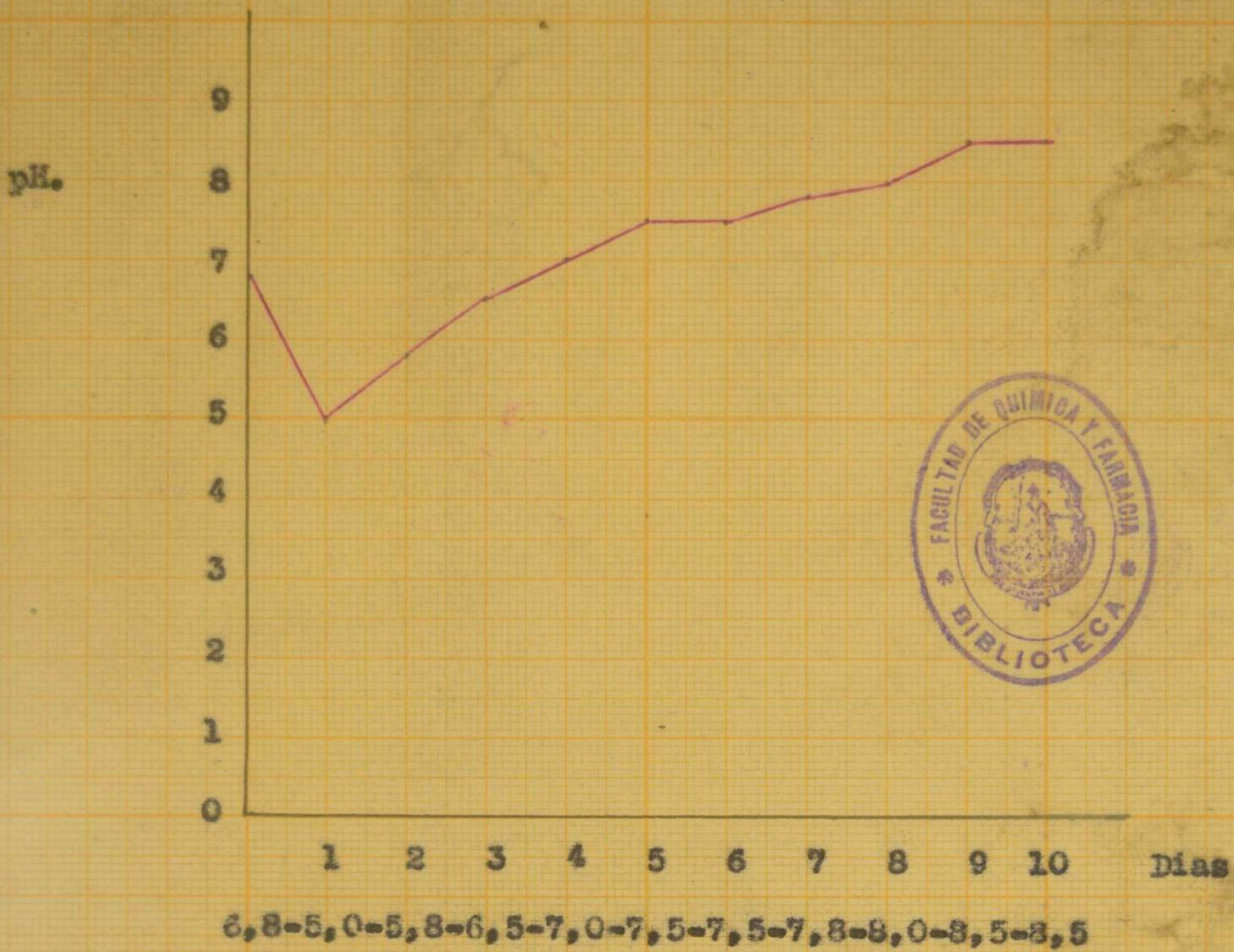
Medio B

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	2 g.
3.- "Licor de Corn steep" (germinado)	55 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada c.s.p.	1000 cc.

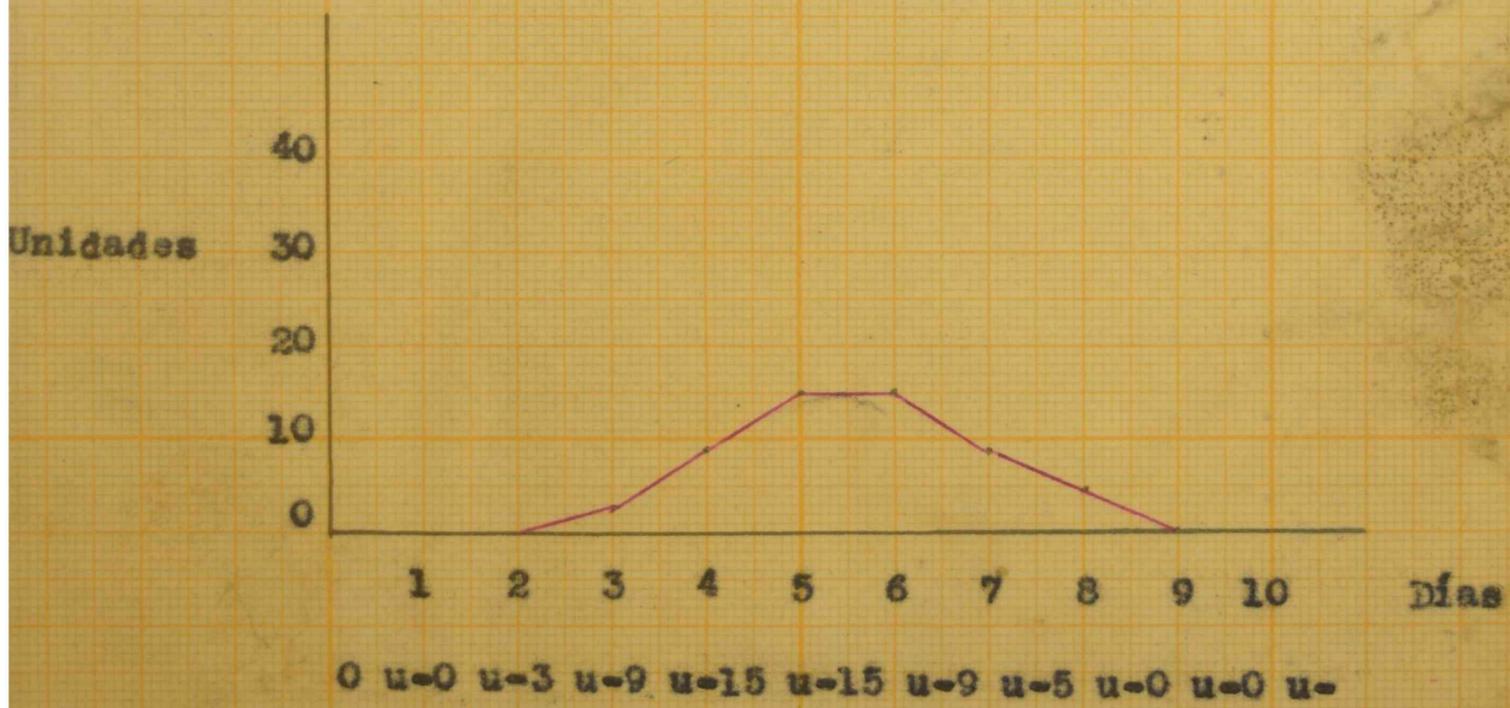
Las condiciones de trabajo fueron las mismas que en fermentaciones anteriores. Con los resultados se han hecho los siguientes diagramas: en cuanto al agregado antiespumante se inició a las 24 horas de incubación, suspendiéndolo al sexto día.-

Tercera serie de fermentaciones- Medio A.-

Curva de pH.

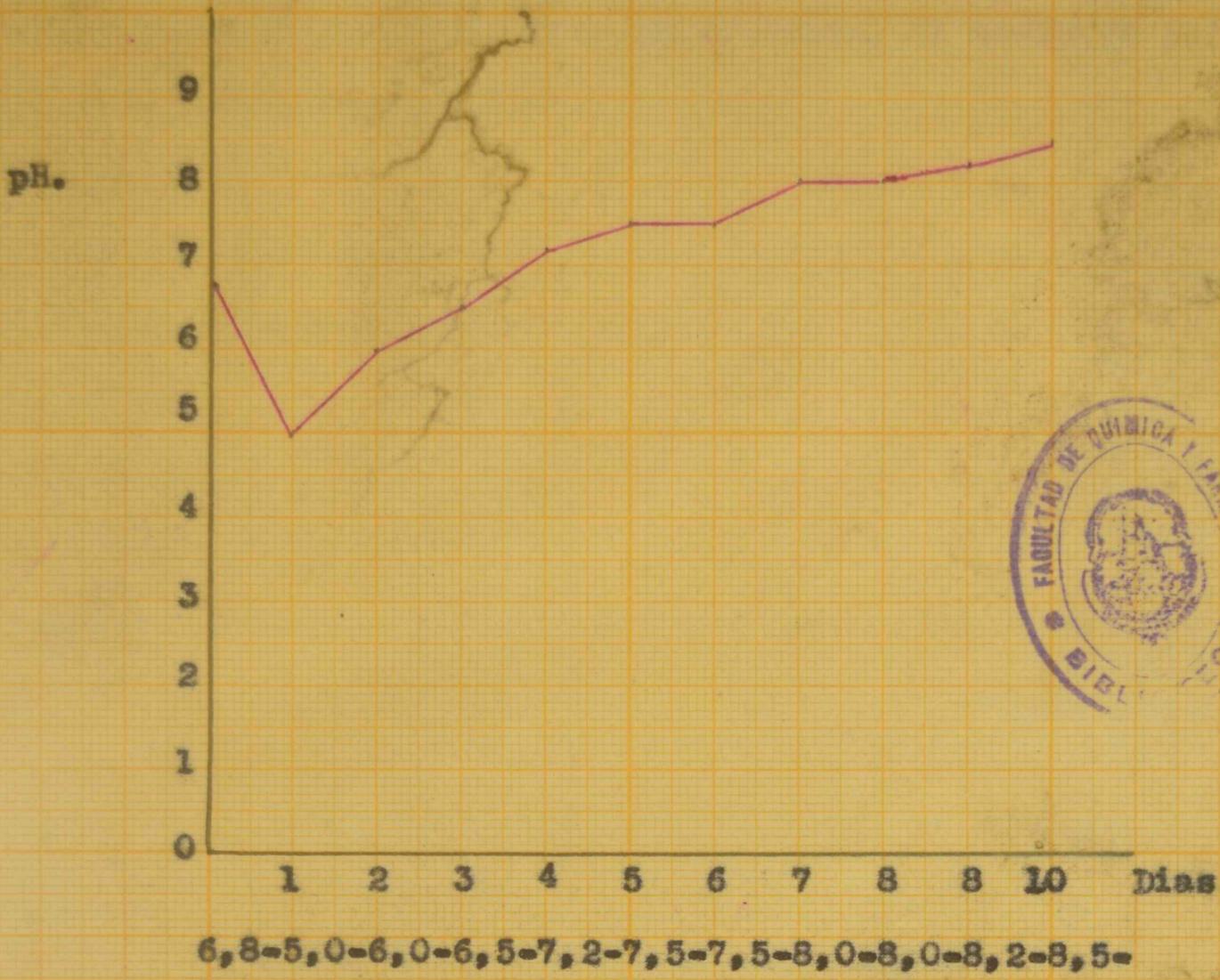


Curva de rendimiento

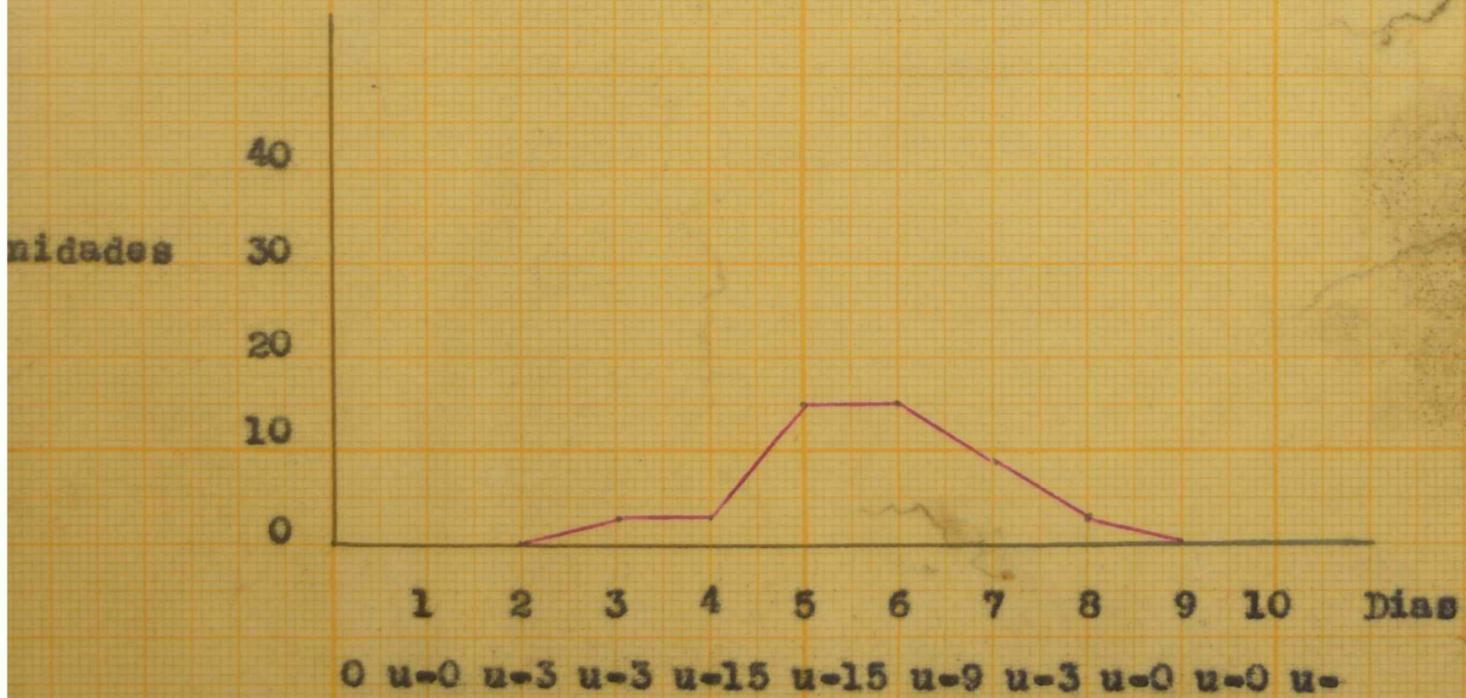


Tercera serie de fermentaciones- Medio B.-

Curva de pH.



Curva de rendimiento



#### 4. Cuarta serie de fermentaciones:

Se utiliza como fuente de nitrógeno orgánico un hidrolizado péptico de hígado, cuyo porcentaje en nitrógeno es de 8,53 g.-

Para lograr la proporción de nitrógeno que hemos fijado se utilizan 6 gramos de este hidrolizado. El medio de cultivo tiene la siguiente composición:

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	1 g.
3.- Hidrolizado péptico de hígado	6 g.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g.
7.- $LiNO_3 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada	1000 cc.

Se trabaja en iguales condiciones que en las fermentaciones anteriores.

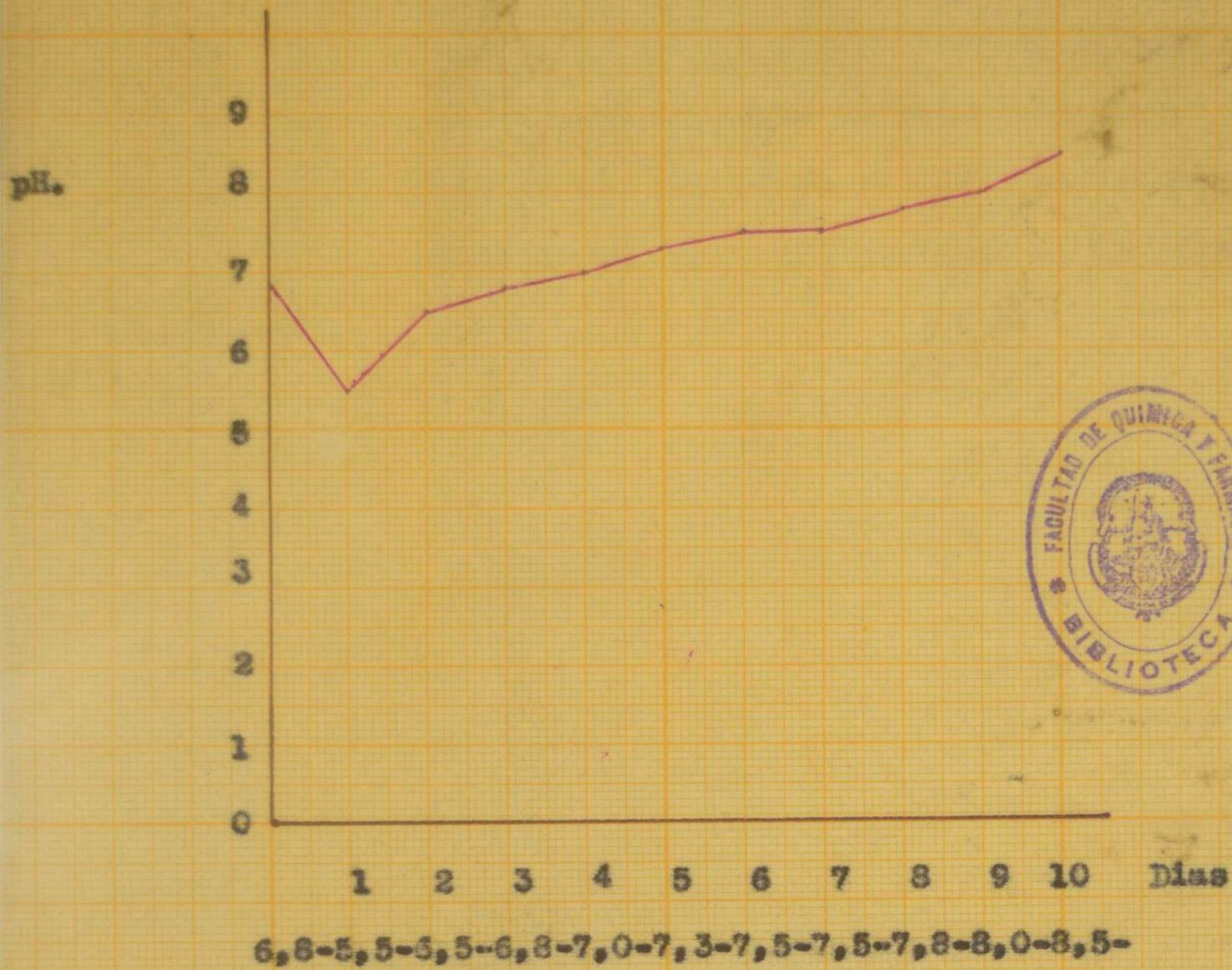
El método de obtención y análisis sumario del hidrolizado péptico de hígado figura en capítulo aparte.

El agregado antiespumante se inició a las 24 horas de incubación, suspendiéndosele al octavo día.

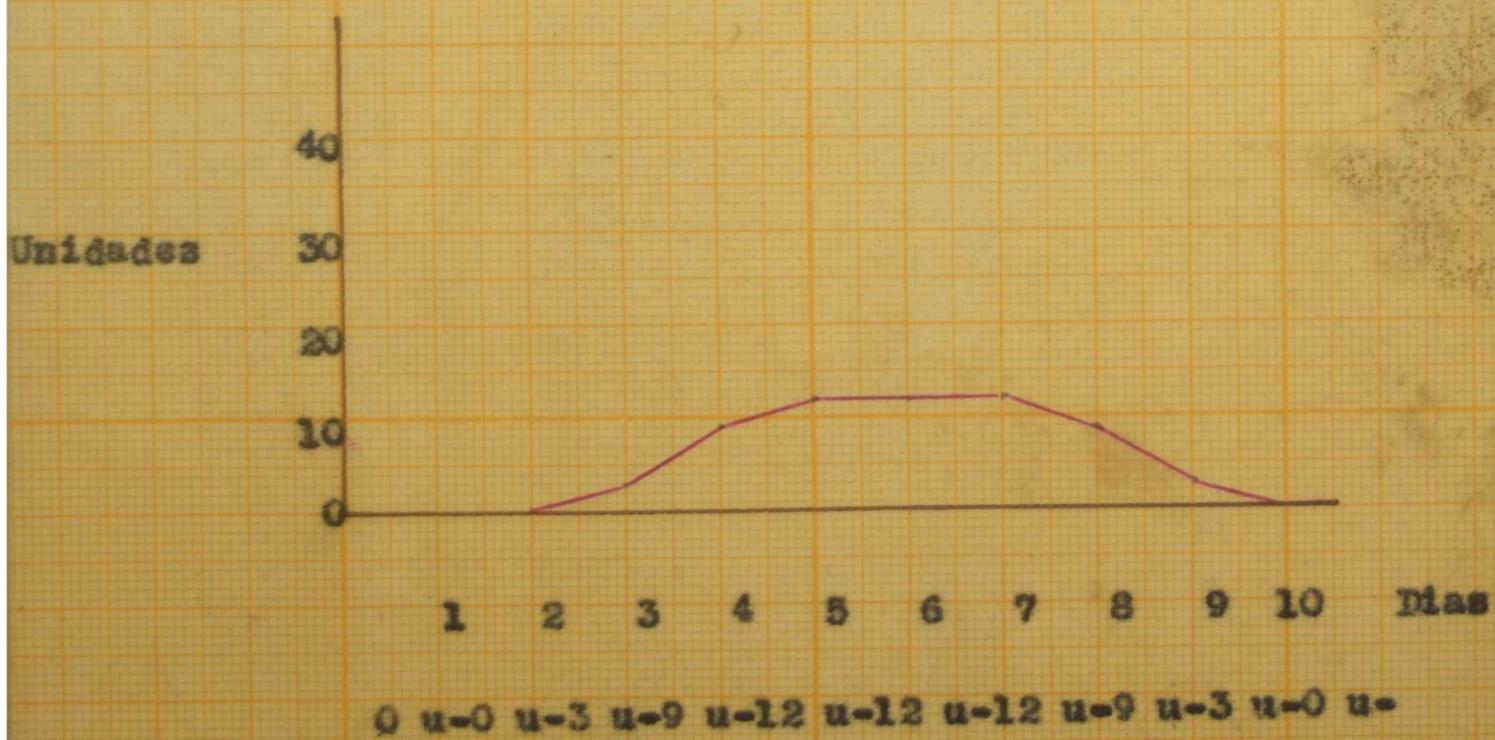
Los resultados obtenidos en esta fermentación pueden apreciarse en los diagramas que siguen:

### Cuarta serie de fermentaciones

#### Curva de pH.



#### Curva de rendimiento



.- Quinta serie de fermentaciones:

Como fuente de nitrógeno proteico se utiliza un hidrolizado químico de proteínas obtenido a partir de sangre desecada (dry blood), que es un subproducto de la industria frigorífica, ya que proviene de los residuos de faenamiento.

Su contenido en nitrógeno total es de 1,89 g.%. De ahí que sea necesario para mantener la proporción de nitrógeno proteico, el empleo de 27 cc. por litro de medio de cultivo.

La composición del medio empleado es la siguiente:

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	1,5 g.
3.- Hidrolizado No. 1	27 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $HgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada c.s.p.	1000 cc.

Las condiciones de trabajo son las mismas que las descritas en las fermentaciones anteriores.

Con los datos de pH y los resultados obtenidos al valorar el antibiótico en las muestras extraídas cada 24 horas se han hecho los diagramas siguientes; en cuanto al agregado antiespumante se inició a las 24 horas de incubación, y fué suspendido al sexto día.

### Quinta serie de fermentaciones

#### Curva de pH.



#### Curva de rendimiento



→ Sexta serie de fermentaciones

Se utilizó también un hidrolizado químico de proteínas, llamado No. 2.- La cantidad a agregar es de 11 cc. por litro de medio, ya que su riqueza en nitrógeno es de 4,65 g.%. -

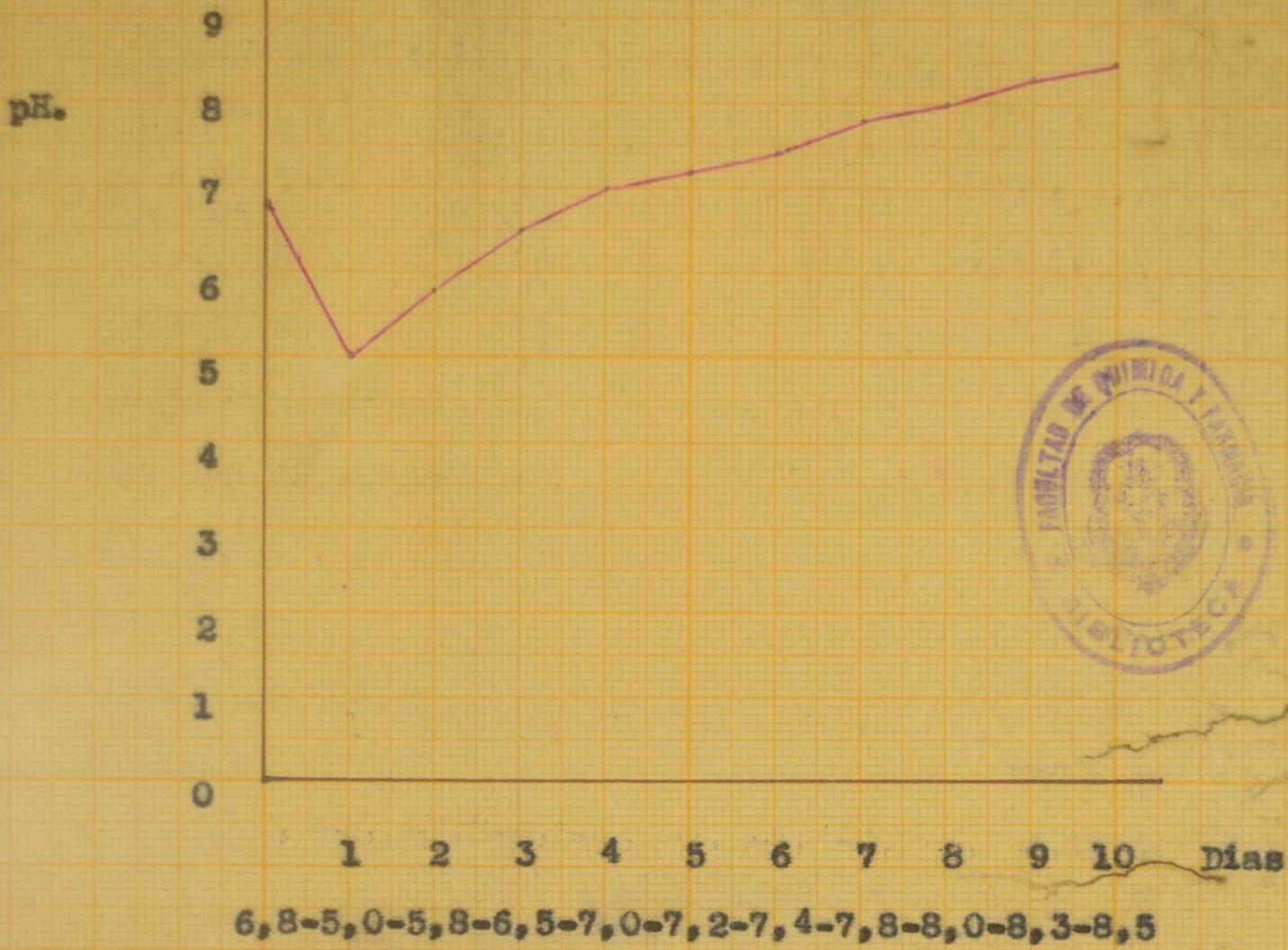
La composición del medio es la siguiente:

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	1,5 g.
3.- Hidrolizado No. 2	11 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua Destilada c.s.p.	1000 cc.

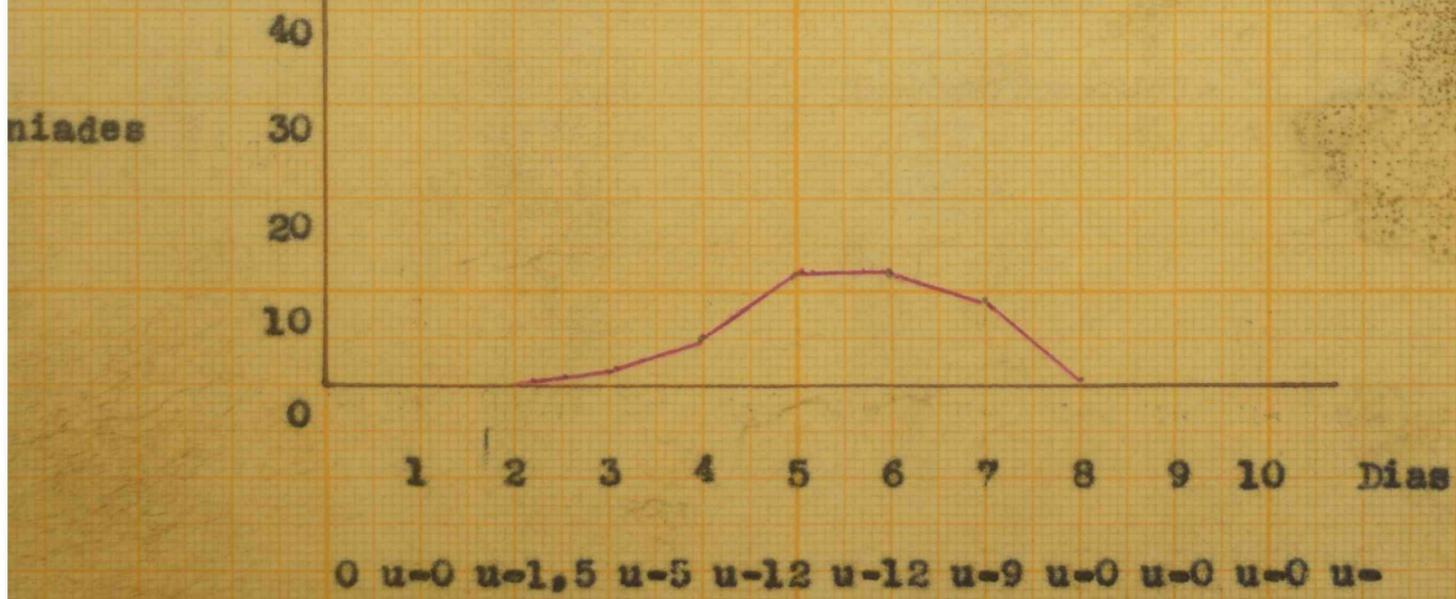
Los resultados obtenidos se establecen en los diagramas siguientes; respecto al agregado antiespumante se inició a las 24 horas de incubación y fué suspendido al séptimo día.

Sexta serie de fermentaciones

Curva de pH.



Curva de rendimiento



- Séptima serie de fermentaciones:

El hidrolizado químico de proteínas que se utiliza en este ensayo, al que llamamos hidrolizado No. 3, se lo obtiene también a partir de sangre desecada.

Se agregan 12 cc. por cada 1000 cc. de medio de cultivo que su riqueza en nitrógeno total es de 4,11 g%.

La composición del medio de cultivo empleado es la siguiente:

1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	1,5 g.
3.- Hidrolizado No. 3	12 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada c.s.p.	1000 cc.

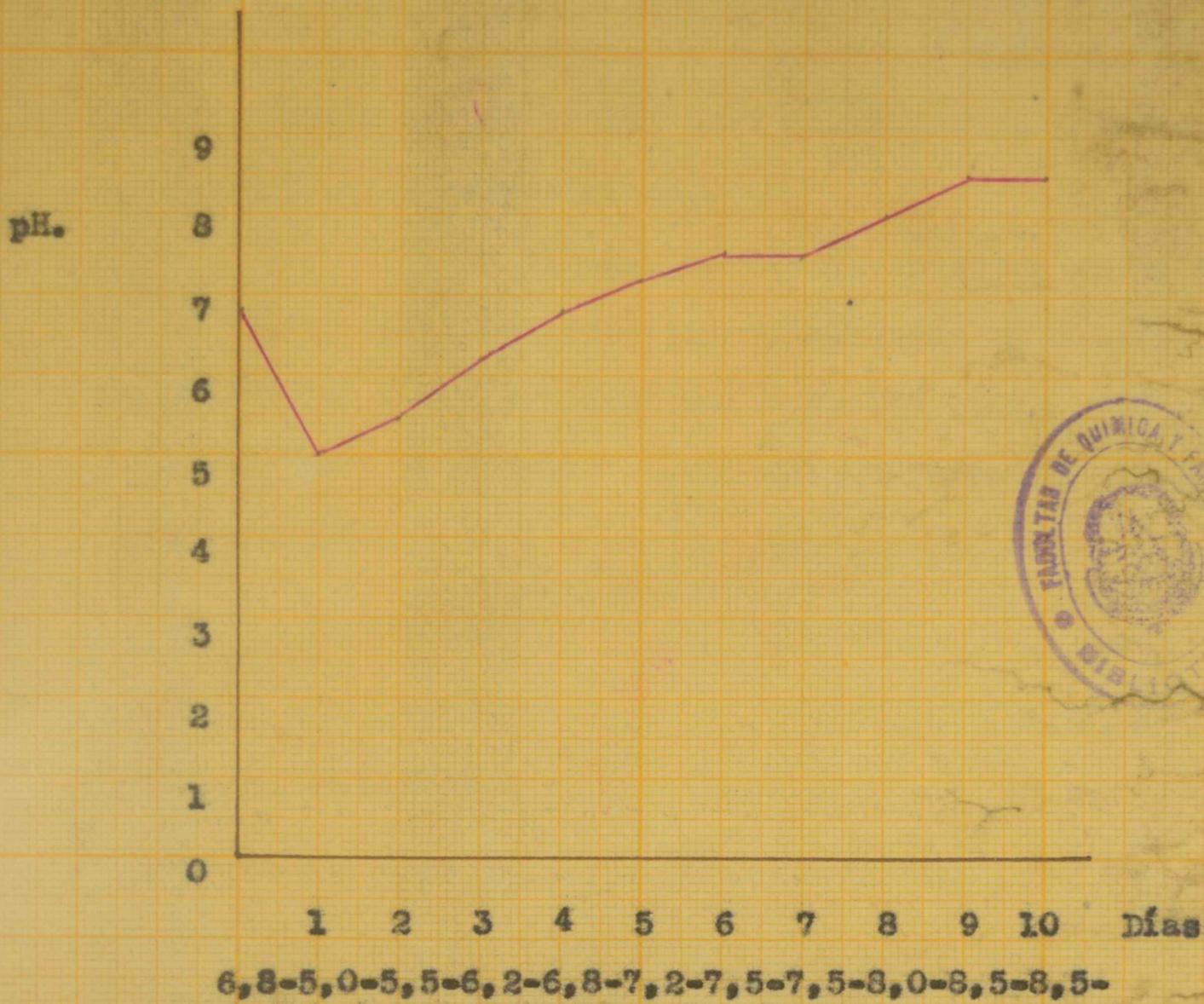
La técnica de trabajo es igual a la ya descrita.

De los tres balones utilizados en la fermentación se extrajeron muestras cada 24 horas. En ellas se valoró el antibiótico producido y se determinó el pH colorimétricamente.

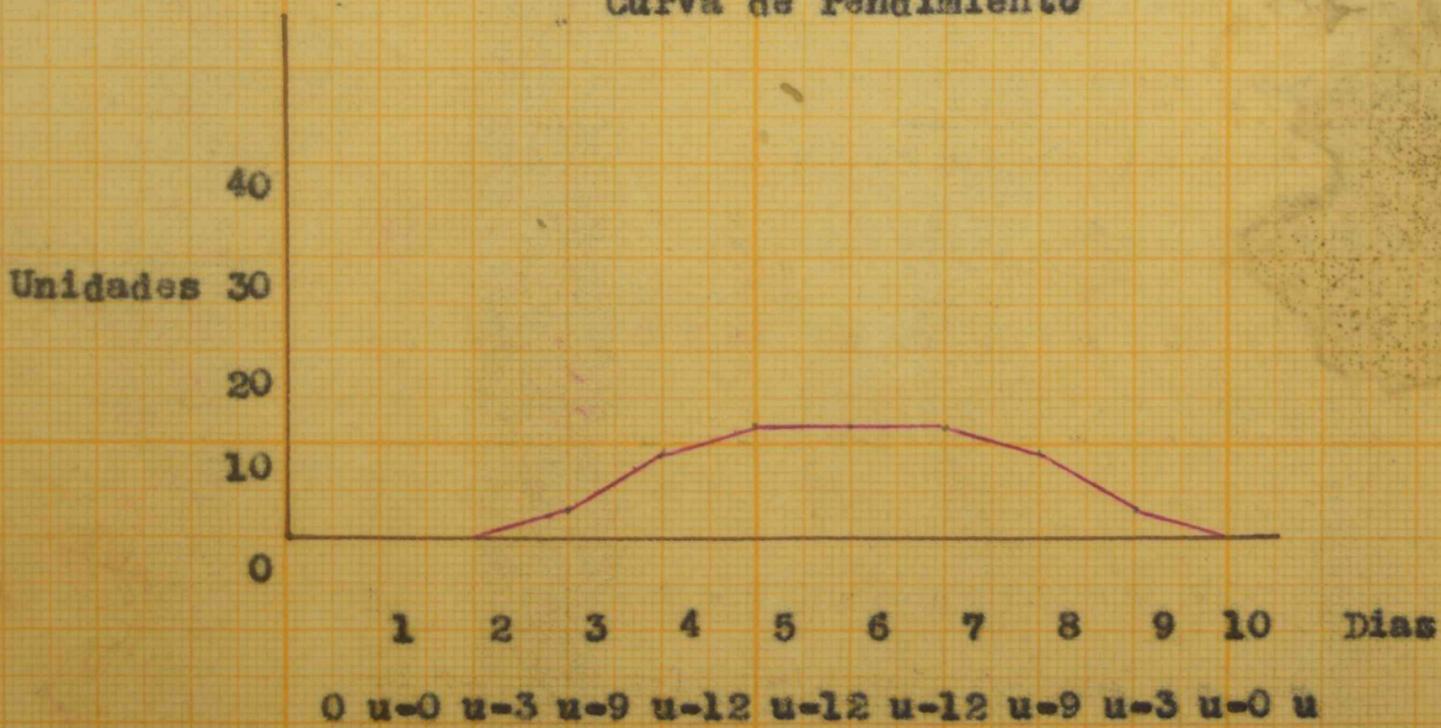
Con los resultados obtenidos se han confeccionado los siguientes diagramas; respecto al agregado antiespumante se inició a las 24 horas de incubación, suspendiéndose al séptimo día.

### Séptima serie de fermentaciones

#### Curva de pH.



#### Curva de rendimiento



.- Octava serie de fermentaciones:

En la última serie de fermentaciones de este conjunto, se ha usado como fuente de nitrógeno proteico, un hidrolizado químico de proteínas obtenido a partir de sangre desecada.

El método de obtención y análisis sumario del mismo, a igual que el de los tres hidrolizados anteriores, figuran en el capítulo correspondiente.

Su riqueza en nitrógeno total es de 5,77 g% ; por lo tanto, para mantener la equivalencia en nitrógeno debemos emplear 9 cc. de hidrolizado por litro de medio.

La composición del medio de cultivo se detalla a continuación:

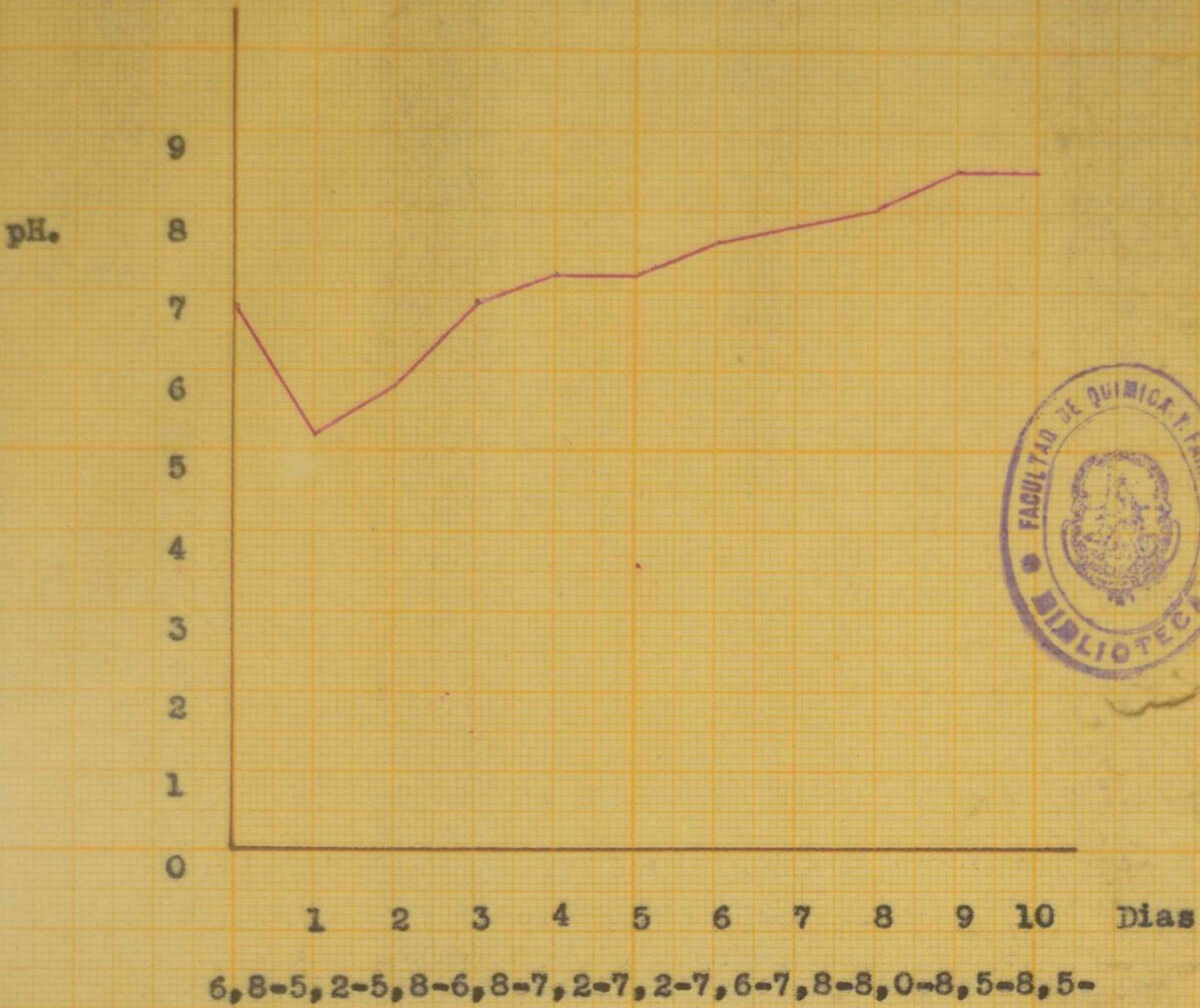
1.- Glucosa	5 g.
2.- Acido cítrico	1,5 g.
3.- Hidrolizado No. 4	9 cc.
4.- $K_2HPO_4$	0,5 g.
5.- $KH_2PO_4$	0,5 g.
6.- $HgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2 g.
7.- $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,01 g.
8.- $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,01 g.
9.- Agua destilada c.s.p.	1000 cc.

En los medios de cultivo a base de hidrolizados químicos de proteína, hemos elevado la cantidad de ácido cítrico a 1,5 g. debido a su mayor riqueza en minerales.

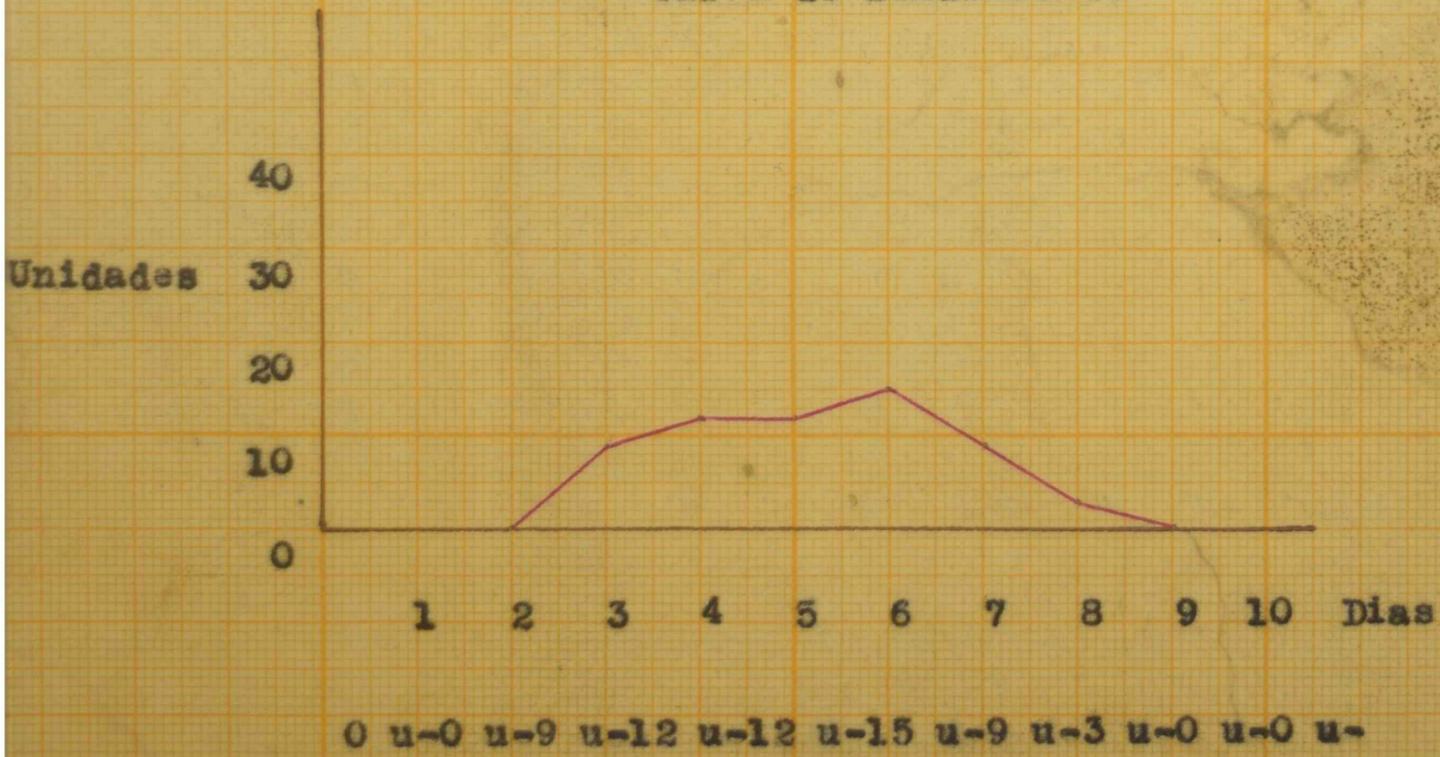
Los resultados obtenidos en estas series de fermentaciones figuran en los diagramas siguientes; en cuanto al agregado antiespumante se inició a las 24 horas de incubación y fue suspendido al octavo día.

Octava serie de fermentaciones

Curva de pH.



Curva de tendimiento



En estas ocho series de fermentaciones podemos apreciar que las curvas de pH presentan un descenso producido por la acidificación del medio, debido al aprovechamiento de la glucosa por el germen. Luego el pH sube por la desaminación de los aminoácidos.

Los rendimientos en bacitracina son bajos, ya que son muy inferiores con respecto a los que se obtienen en fermentaciones superficiales y con agitación. Esto lo atribuimos a la baja temperatura a que fueron realizadas.

## B.- VARIACION DE LA TEMPERATURA

A los efectos de obtener mejores rendimientos realizamos un segundo conjunto de ocho series de fermentaciones, en las cuales empleamos los mismos medios de cultivo e iguales condiciones de trabajo que los utilizados en las series precedentes, a excepción del factor temperatura de incubación, que se lleva a 29 - 30 grados centígrados en la estufa descripta anteriormente.

Cada serie se realizó en tres balones de fermentación, en forma simultánea. Como los elementos y técnica de trabajo se detallaron con anterioridad, consignamos directamente en diagramas, las variaciones de pH y el rendimiento en antibiótico que se determinaron en las muestras extraídas cada 24 horas.

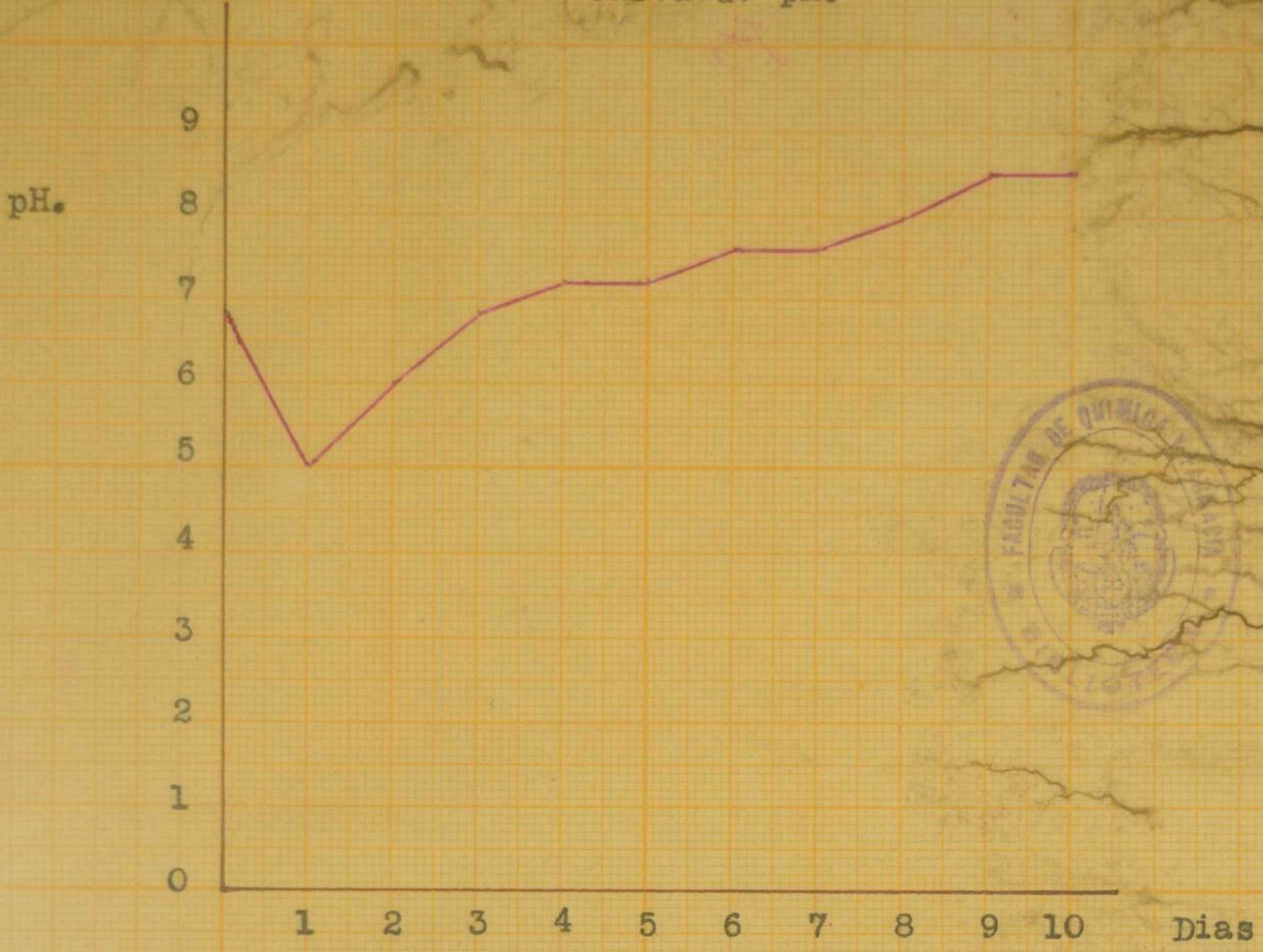
En estas fermentaciones, se evitó la formación de espuma con el agregado de silicones en emulsión.

En general el agregado de inició a las 24 horas de comenzadas las fermentaciones y se suprimió en el transcurso del sexto al octavo día, al dejar de ser necesario.



Novena serie de fermentaciones  
Medio con peptona de carne

Curva de pH.



6,8-5,0-6,0-6,8-7,2-7,2-7,6-7,6-8,0-8,5-8,5

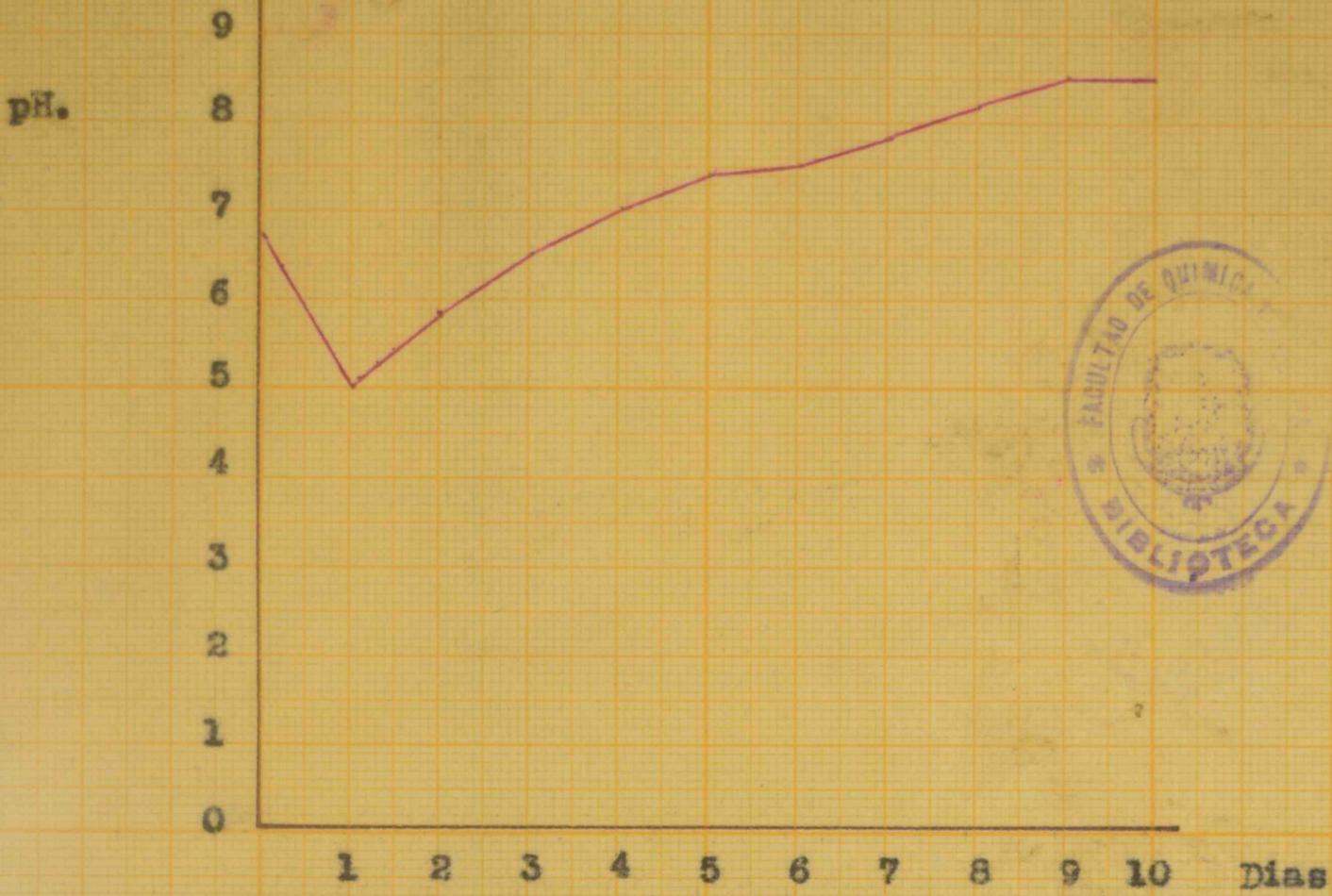
Curva de rendimiento



0 u-3 u-5 u-15 u-23 u-30 u-30 u-15 u-9 u-3 u-

Décima serie de fermentaciones  
Medio con "Corn steep"

Curva de pH.



6,8-5,0-5,8-6,5-7,0-7,4-7,5-7,8-8,2-8,5-8,5-

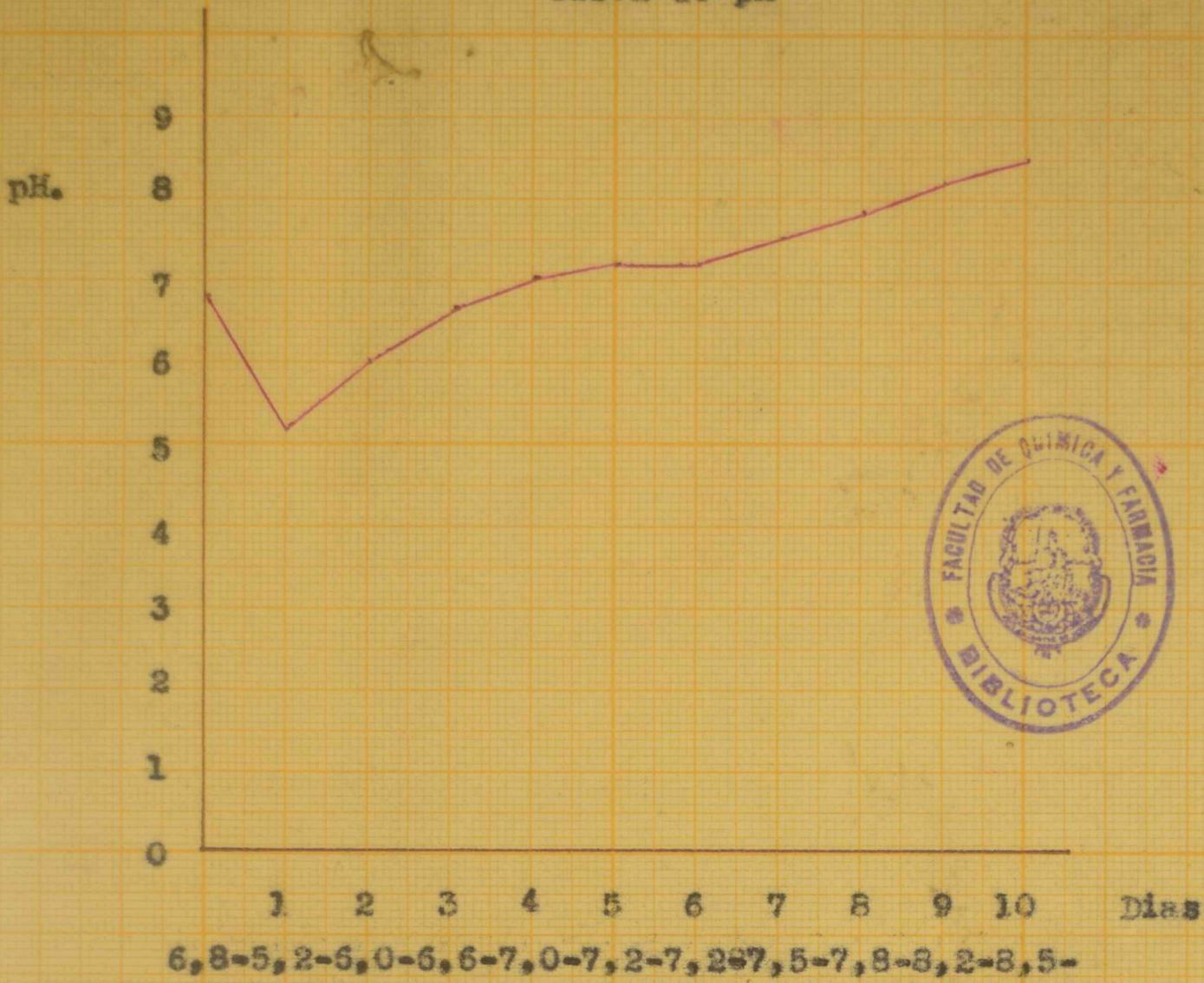
Curva de rendimiento



0 u-3 u-12 u-23 u-33 u-33 u-30 u-15 u-3 u-0 u

Décima primera serie de fermentaciones  
Medio con Licor de "Corn steep" (sin germinar)

Curva de pH

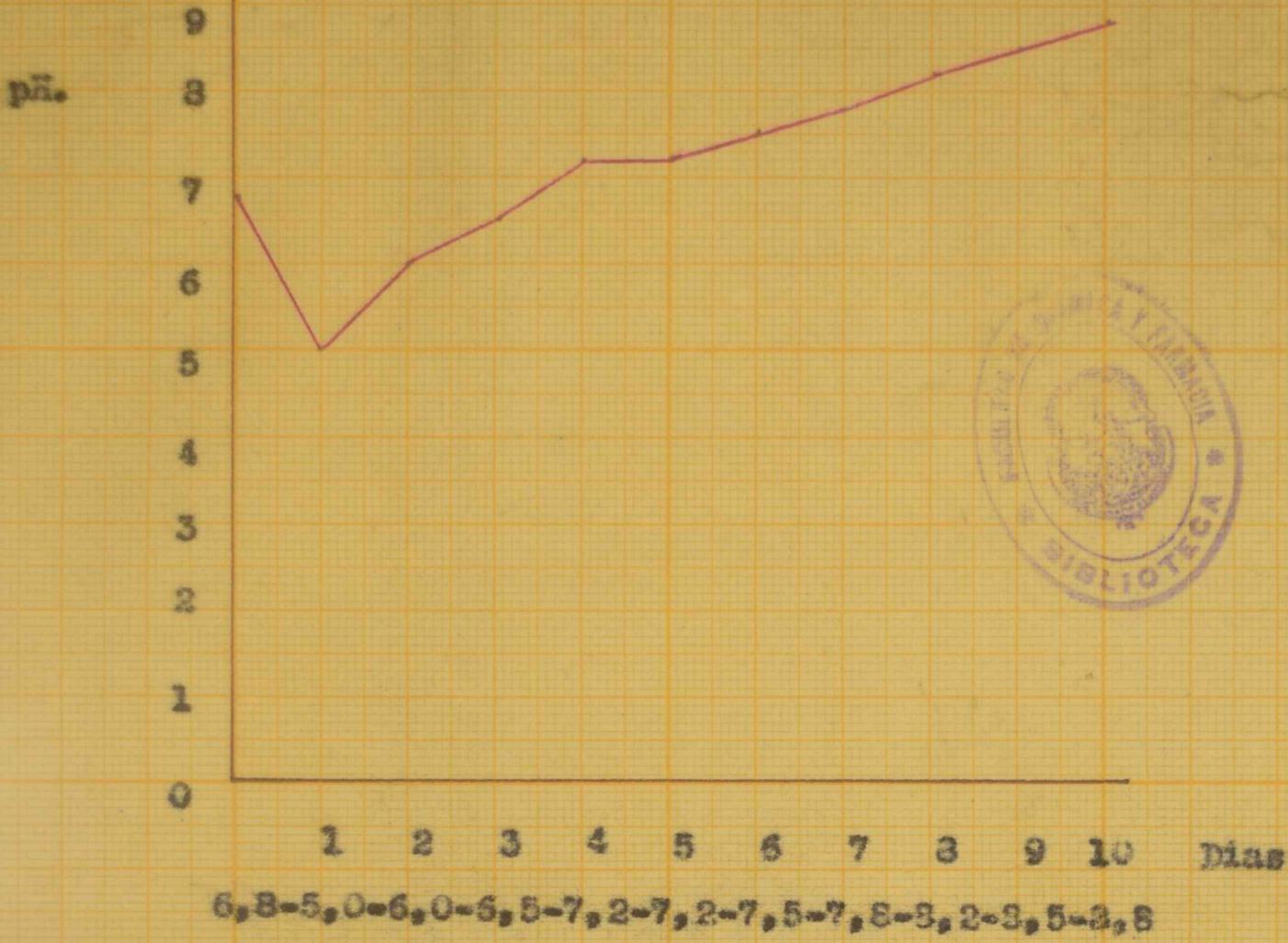


Curva de rendimiento

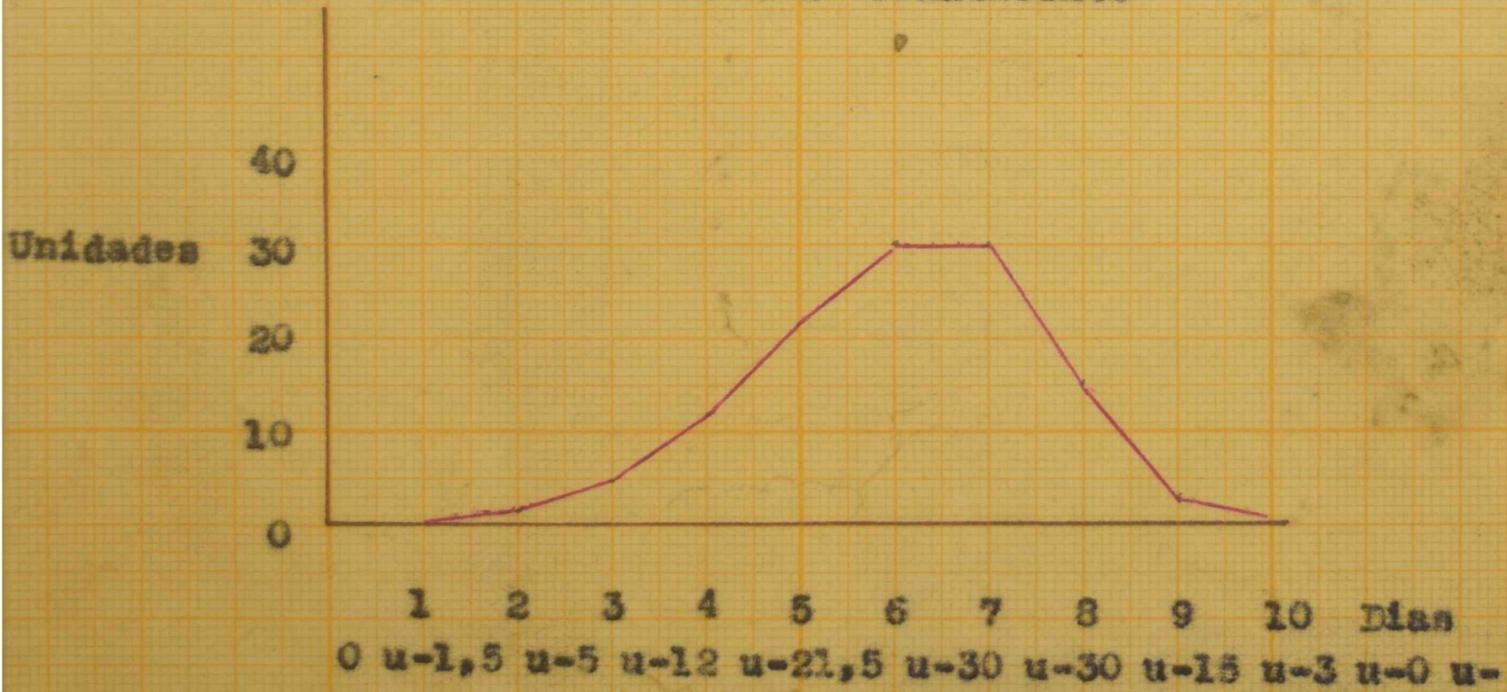


Décima primera serie de fermentaciones  
Medio con Licor de "Cora steep" (germinado)

Curva de pH.

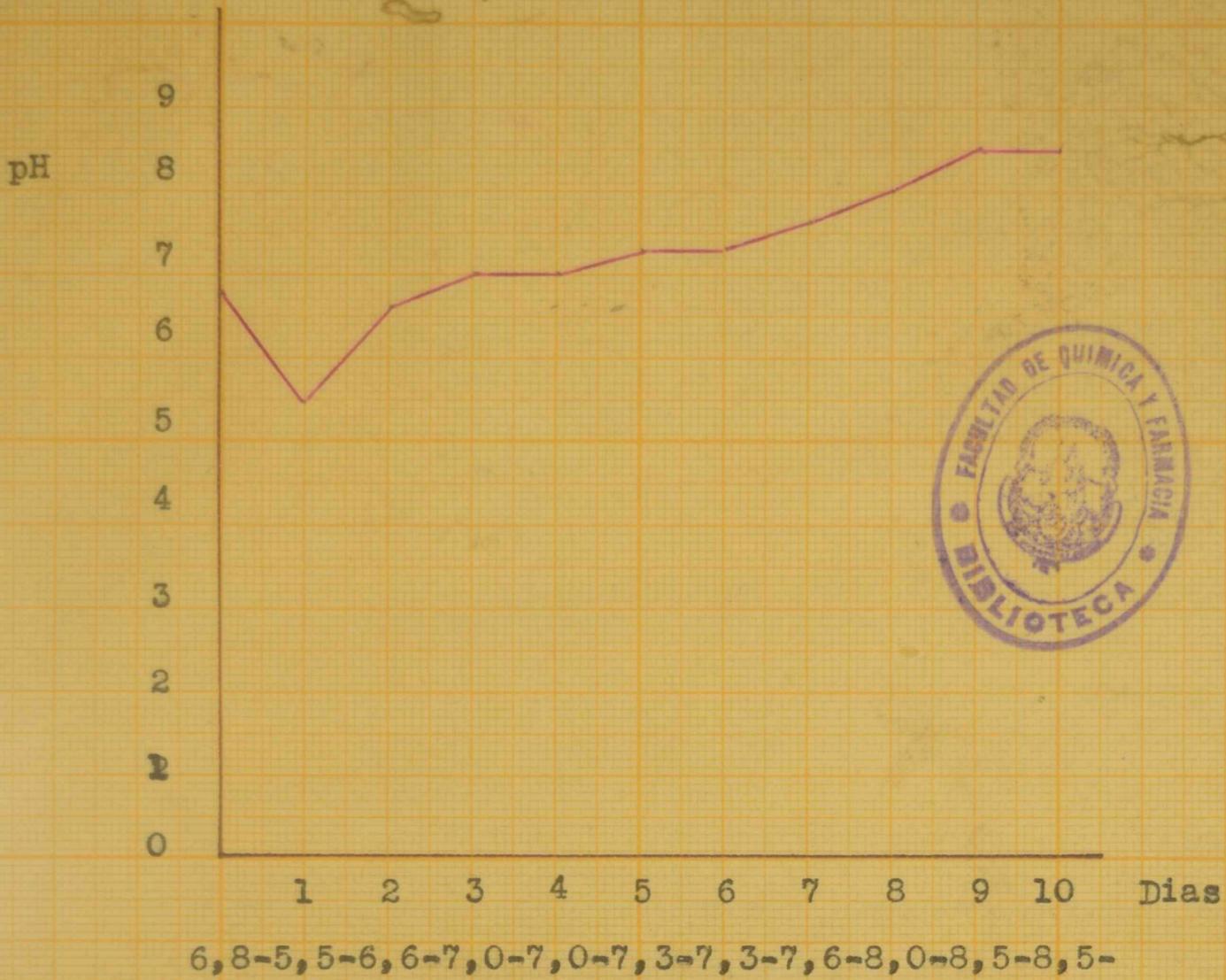


Curva de rendimiento

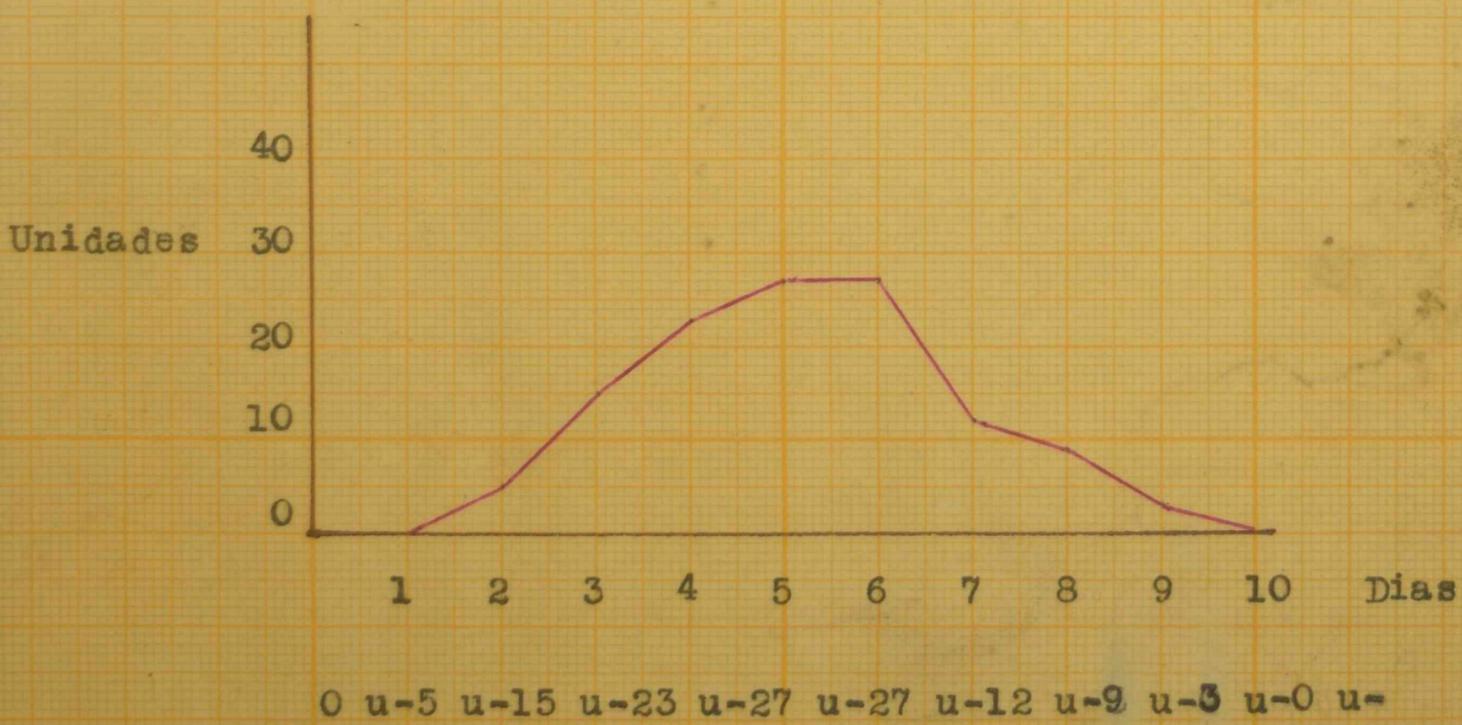


Décima segunda serie de fermentaciones  
Medio con hidrolizado péptico de hígado

Curva de pH



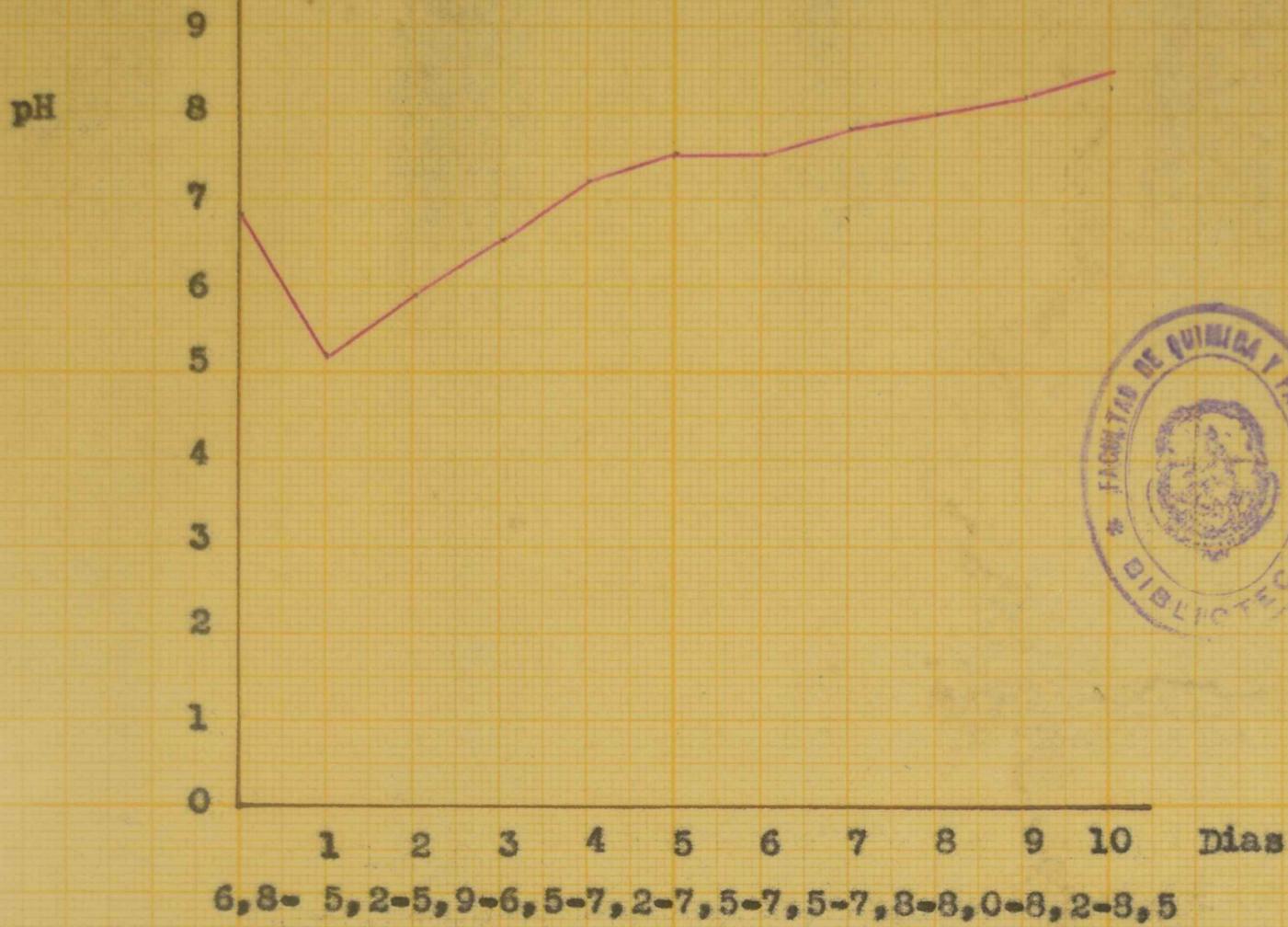
Curva de rendimiento



Décima tercera serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado Nº 1

Curva de pH



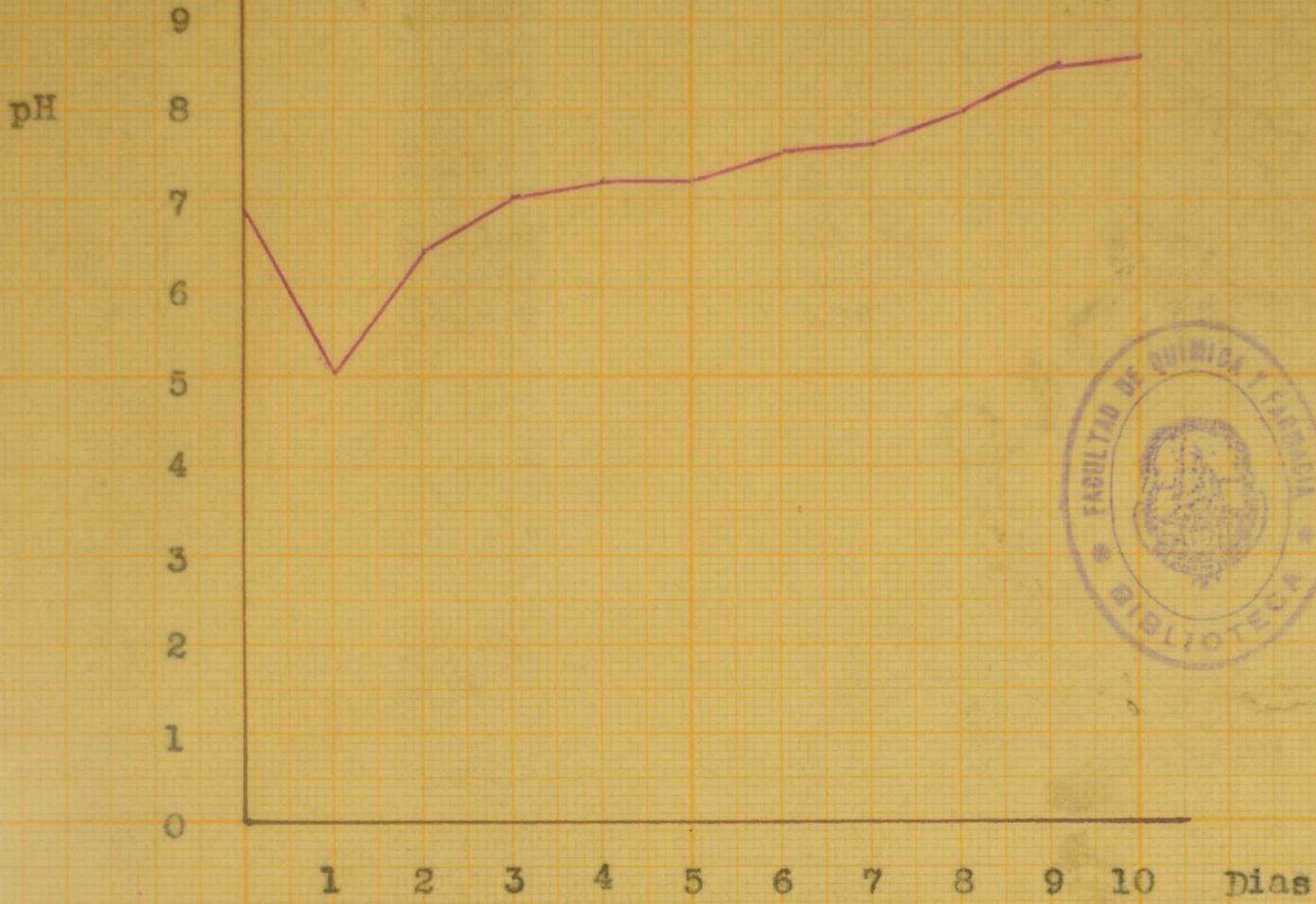
Curva de rendimiento



Decimo cuarta serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado No. 2

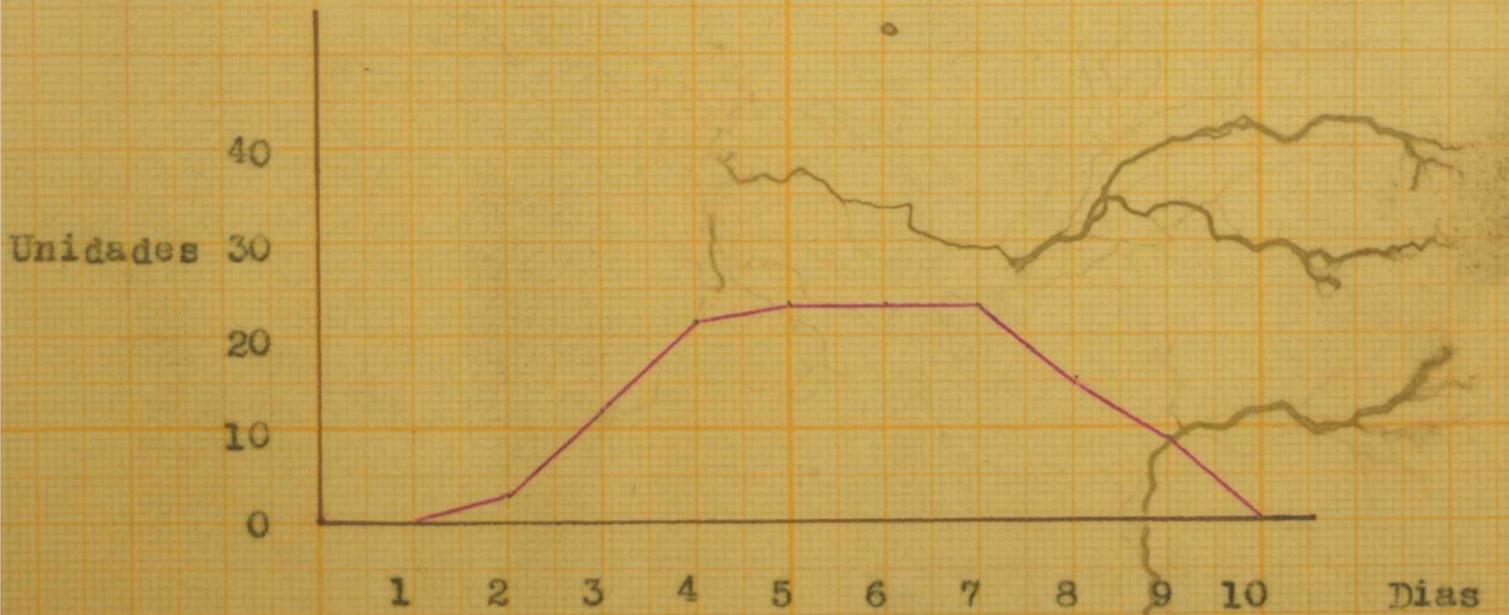
Curva de pH.



6,8-5,0-6,4-7,0-7,2-7,2-7,5-7,6-8,0-8,5-8,6



Curva de rendimiento



0 u-3 u-12 u-21,5 u-23 u-23 u- 23 u-15 u-9 u-0 u-

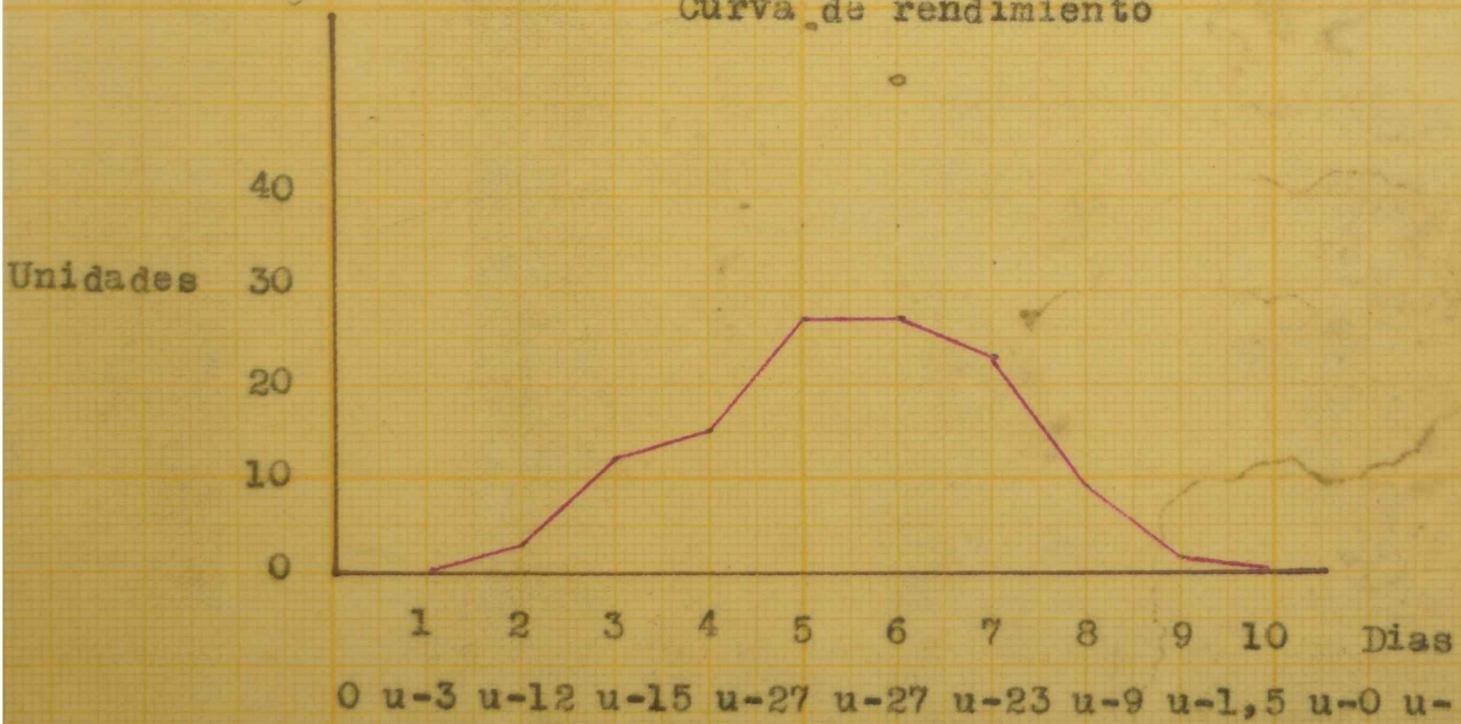
Décima quinta serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado No. 3

Curva de pH



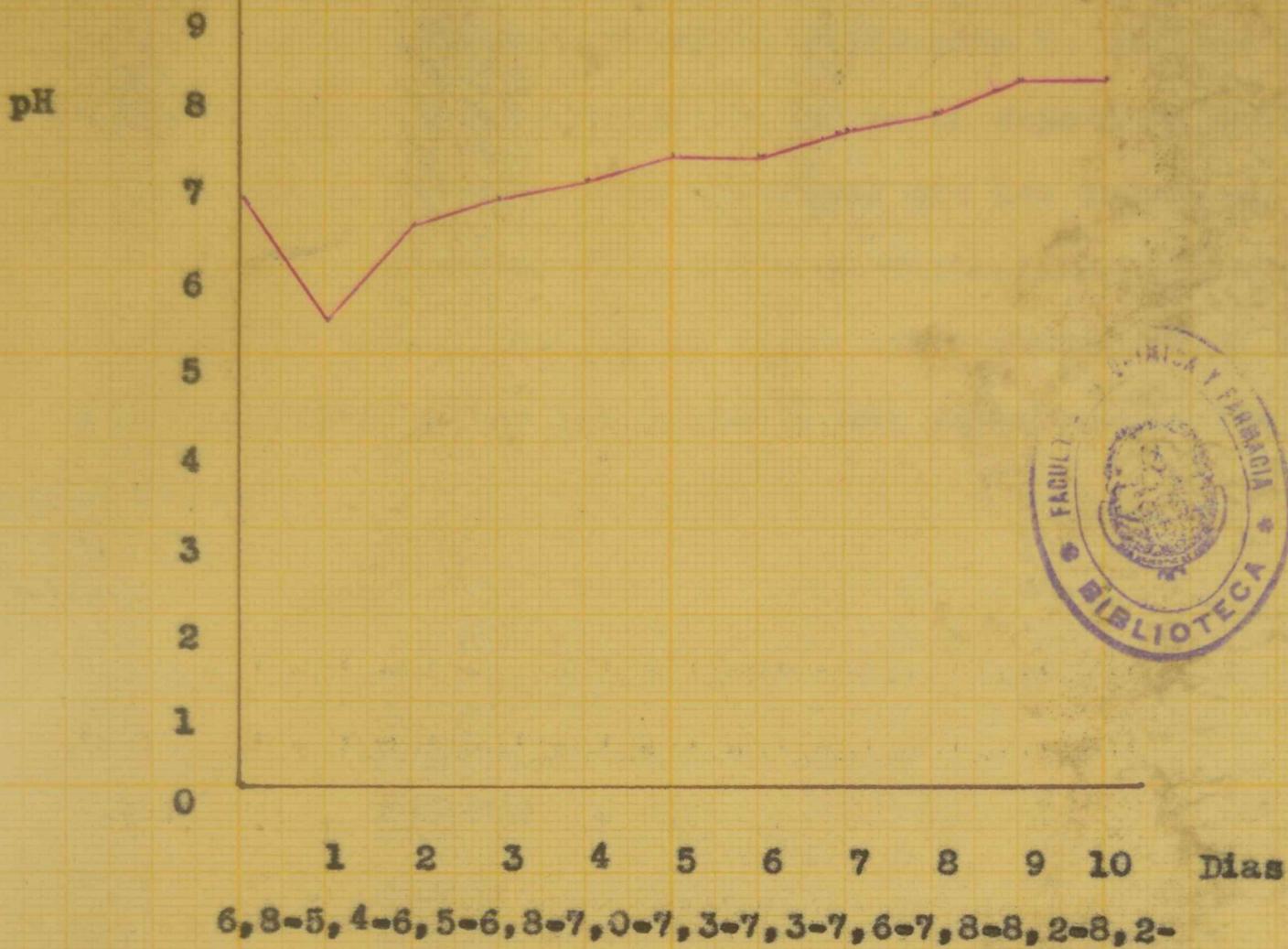
Curva de rendimiento



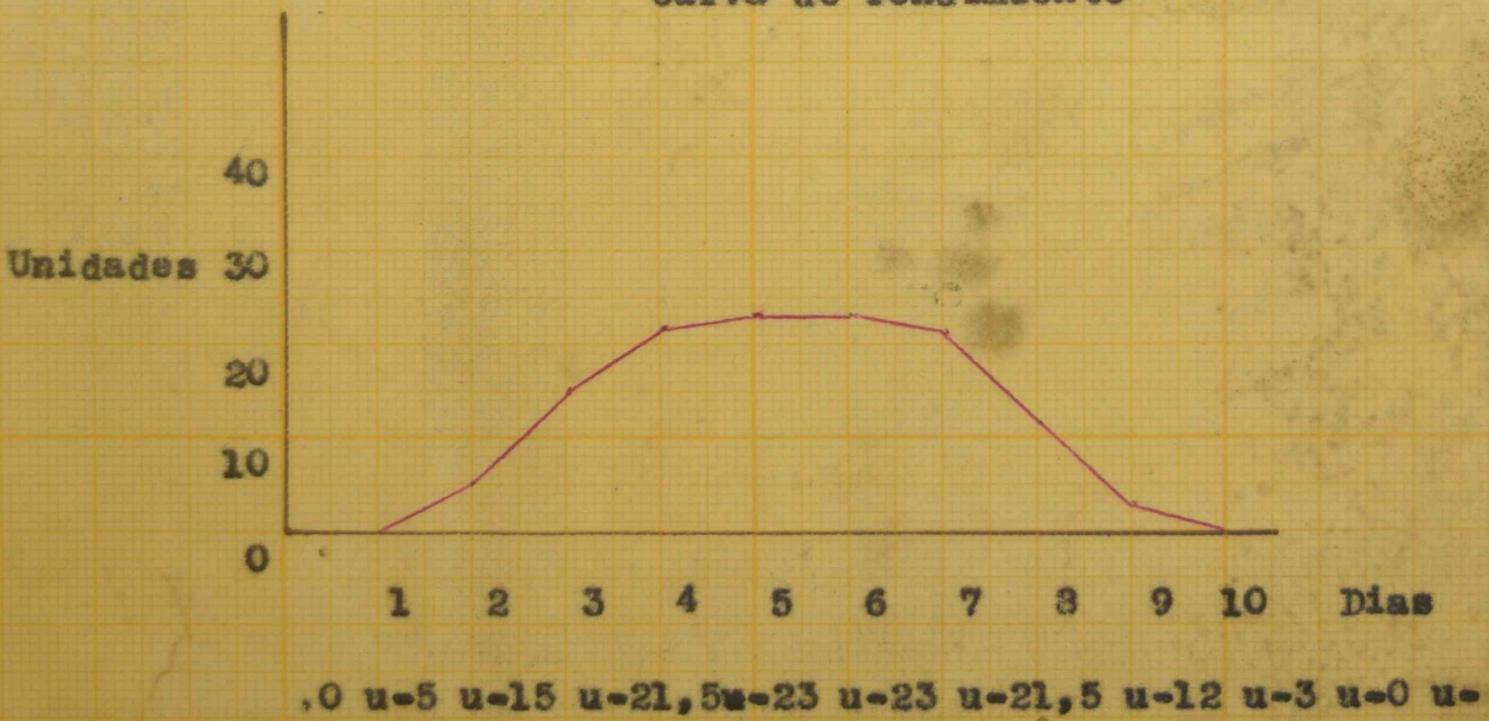
Décima sexta serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado Nº 4

Curva de pH



Curva de rendimiento



Los rendimientos de estas series de fermentaciones, confirman las consideraciones efectuadas a la luz de los resultados obtenidos en el primer conjunto. Es decir, que el factor temperatura influye fundamental y positivamente en la producción de bacitracina.

Los resultados obtenidos evidencian la calidad de los medios empleados y en particular, ya en el objeto de nuestro trabajo, la de los elementos proteicos que los integran.

Ello justifica el intento de variaciones que ofrezcan al germen la posibilidad de un mejor aprovechamiento de los medios de cultivo, y por consiguiente una mayor producción de antibiótico.

### G. - VARIACION EXPERIMENTAL INOCULO OBTENIDO CON AGITACION

Este intento se basa en la premisa de que si antes de inocular el germen al medio de fermentación, es sometido a un proceso de acostumbramiento a las condiciones que imperan en la fermentación sumergida, se hallará mejor adaptado para su desarrollo.

Para ello modificaremos la técnica de obtención del inóculo, procediendo en la forma siguiente:

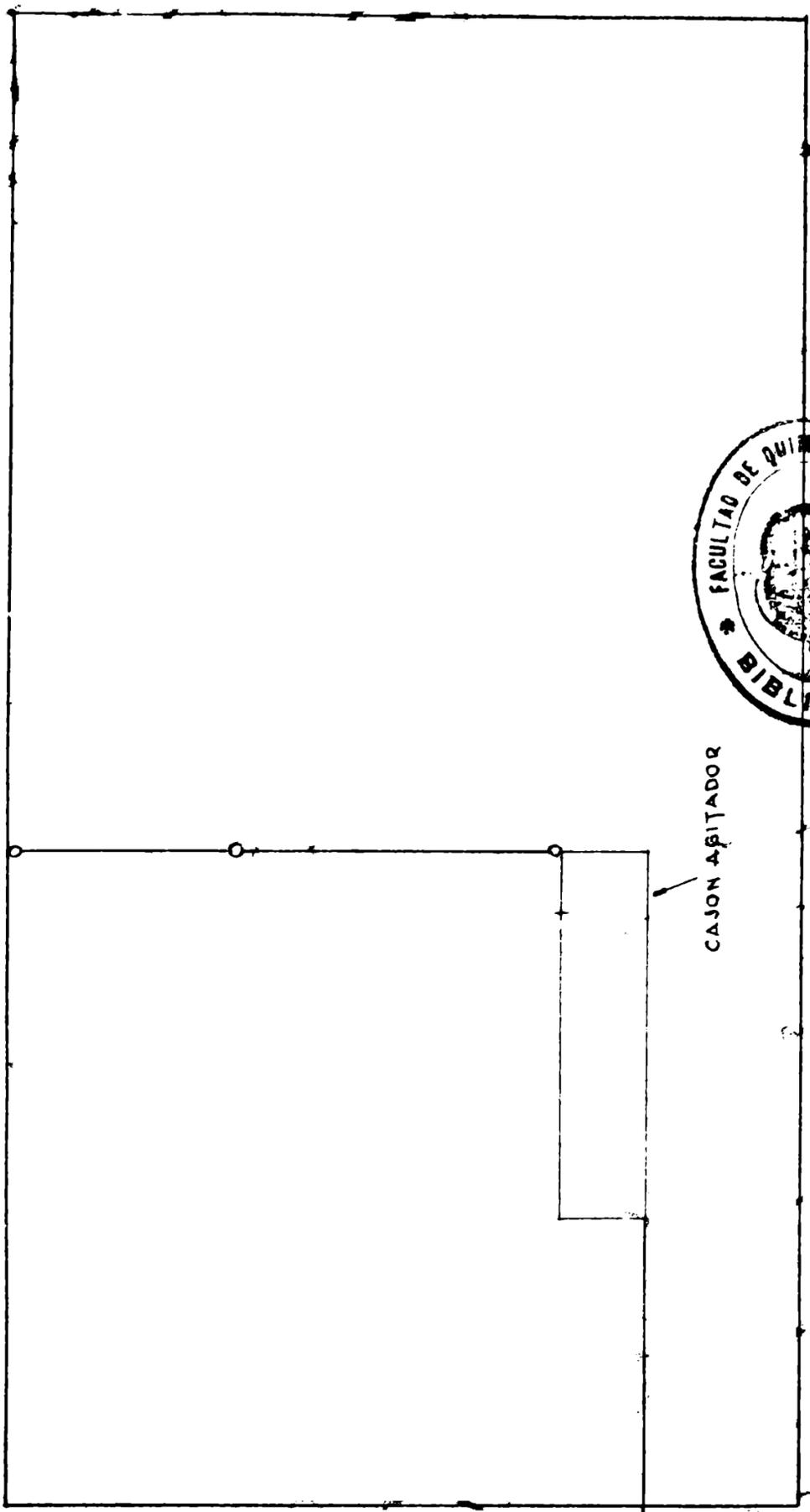
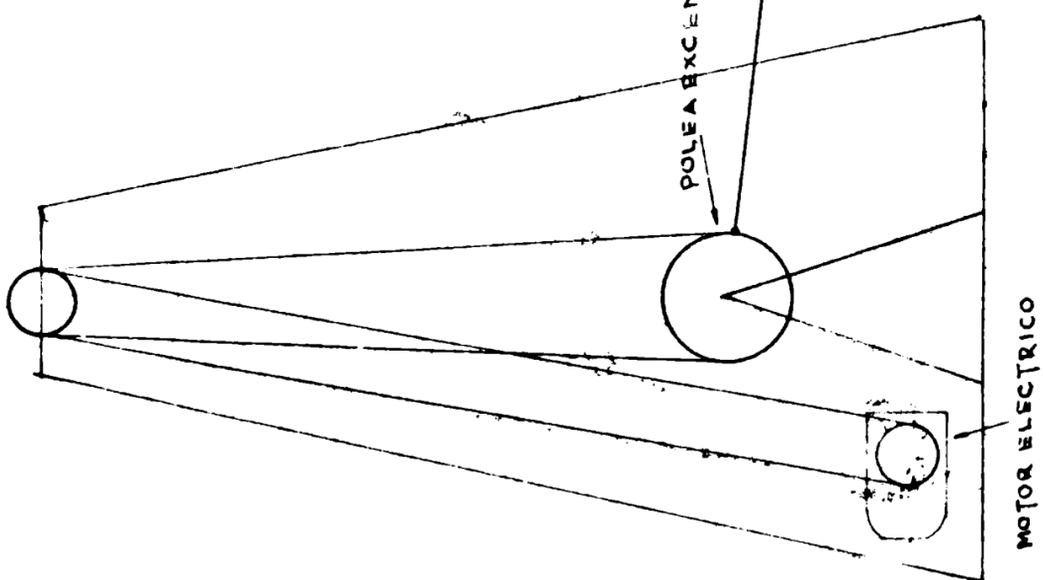
En una botella de vidrio de caras planas, de 500 cc. de capacidad, se introducen 50 cc. de caldo vitamínico empleando como medio de inóculo. Se cierra flojamente con tapón de algodón para permitir la circulación del aire, y se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión durante 30 minutos.

Frio el medio, se lo siembra con *Bacillus subtilis* por cualquiera de las dos técnicas ya citadas, en condiciones de aspeina. Se lo lleva a estufa incubándolo a 37 grados durante 24 horas. Al cabo de estas 24 horas, mediante pipeta estéril y en rigurosas condiciones de aspeina, transferimos los 50 cc. sembrados a un frasco de Mariotte que previamente se lo preparó con el dispositivo que lo convierte en frasco inoculador, también ya descrito y que contiene 50 cc. de caldo vitamínico esterilizado.

Una vez hecho esto, incubamos el frasco inoculador durante otras 24 horas a 37 grados centígrados, agitándolo en un dispositivo que se encuentra en el interior de la estufa. Esta agitación tiene por fin acostumbrar al germen a las condiciones imperantes en profundidad, ya que la fermentación con agitación es semejante en sus condiciones a la sumergida. Podemos considerarla intermedia, entre la fermentación en superficie y la sumergida con aereación forzada, utilizada en nuestro trabajo.

El sistema de agitación comprende un cajón de madera suspendido del techo de la estufa por dos varillas de hierro articuladas que tocan al cajón por sus aristas, en uno de sus extremos. En el otro, su base está fijada a una varilla de hierro,

# ESTUFA



CAJON ABITADOR

LARGO = 50 m  
ALTO = 50 m  
ANCHO = 100 m

MOTOR ELECTRICO

que a su vez tiene el otro extremo adosado en forma excéntrica a una polea. Esta polea es accionada mediante una correa transmisora por un motor eléctrico de  $\frac{1}{2}$  de H.P. que la mueve a 70 revoluciones por minuto. Este sistema, hace que el cajón se mueva en un plano horizontal y para asegurar la estabilidad de los frascos y evitar roturas, se coloca aserrín hasta formar un espesor de 6 centímetros.

Preparado así el inóculo se lo introduce en el balón fermentador siguiendo la técnica descrita al mencionar las condiciones generales de trabajo de la fermentación sumergida.

Empleando este tipo de inóculo se llevó a cabo un nuevo conjunto de ocho series de fermentaciones, con las mismas ~~condiciones~~ condiciones de cultivo que las utilizadas en los conjuntos anteriores.

Se emplearon simultáneamente tres balones por cada serie de fermentaciones, acondicionados en igual forma que anteriormente. En ellos se colocaron tres litros de medio de cultivo y se esterilizó el conjunto de balón, filtro de aire y conductos de goma, a una atmósfera de presión durante 30 minutos. Una vez frío, inoculado y regulado el caudal de aire, que debe ser de un litro, por litro de medio y por minuto, se incubó en estufa a 29-30 grados centígrados.

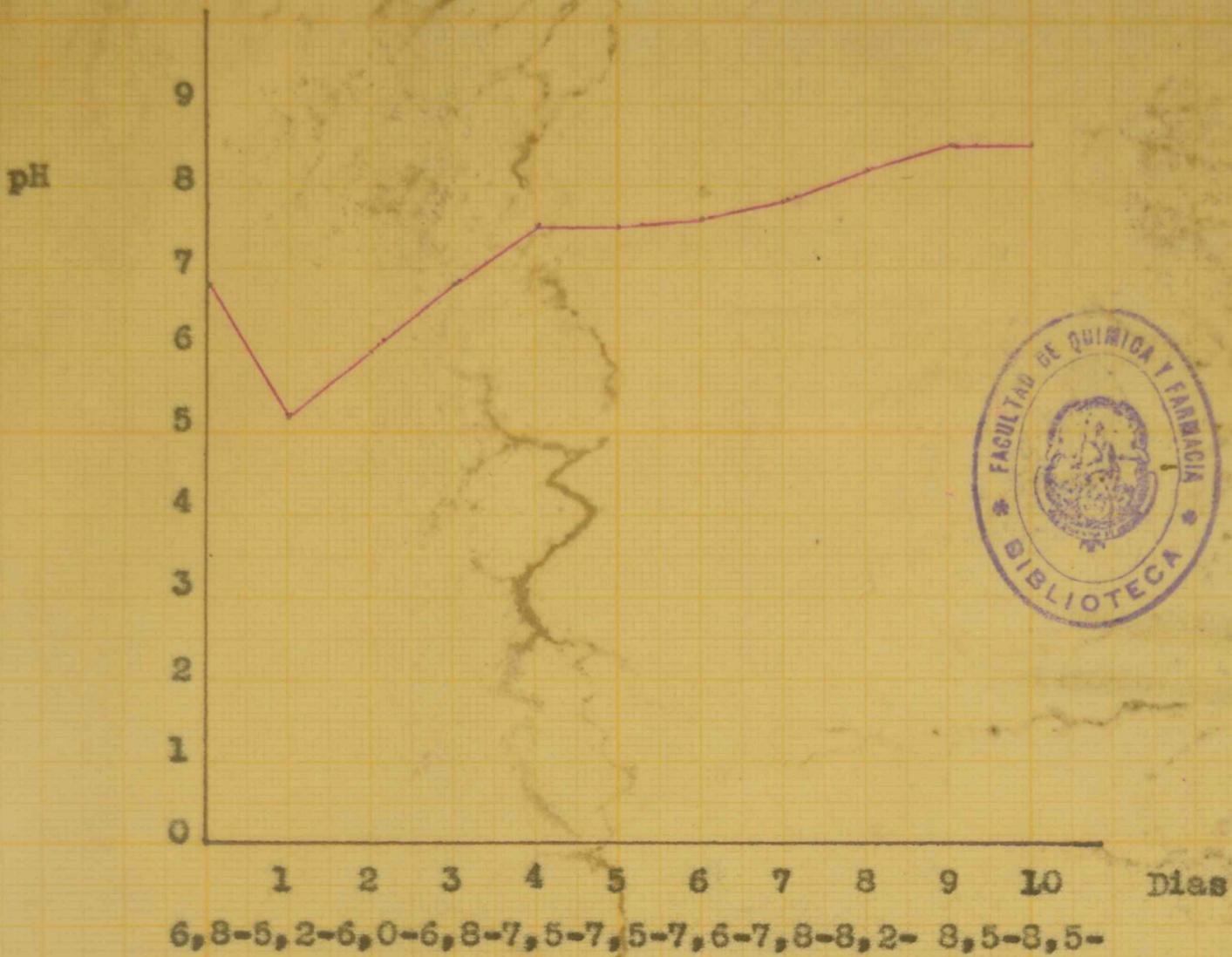
Después de las primeras 24 horas fue necesario agregar agente anticéptico (siliconas caulizadas), operación que se prolongó hasta el sexto u octavo día. Dicho agregado se hizo asepticamente y mediante pipeta estéril, por el tubo de salida de gases de los balones de fermentación.

En síntesis, las condiciones, técnicas y detalles prácticos observados en estas series de fermentaciones son las mismas que las descritas al relatar las anteriores. Como siempre, cada 24 horas de extrajo muestra, determinándose en las mismas pH y concentración de antibiótico. Con los datos obtenidos se han construido los diagramas siguientes:

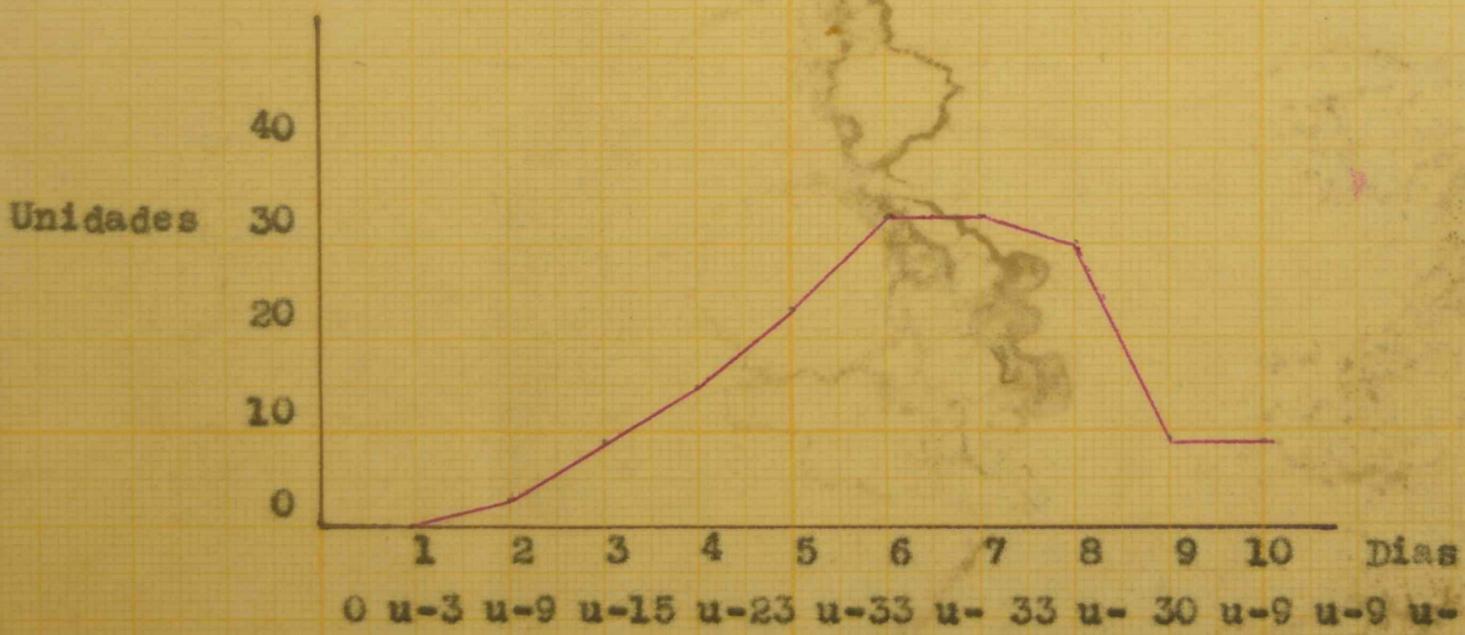
Décima séptima serie de fermentaciones

Medio con peptona de carne

Curva de pH.



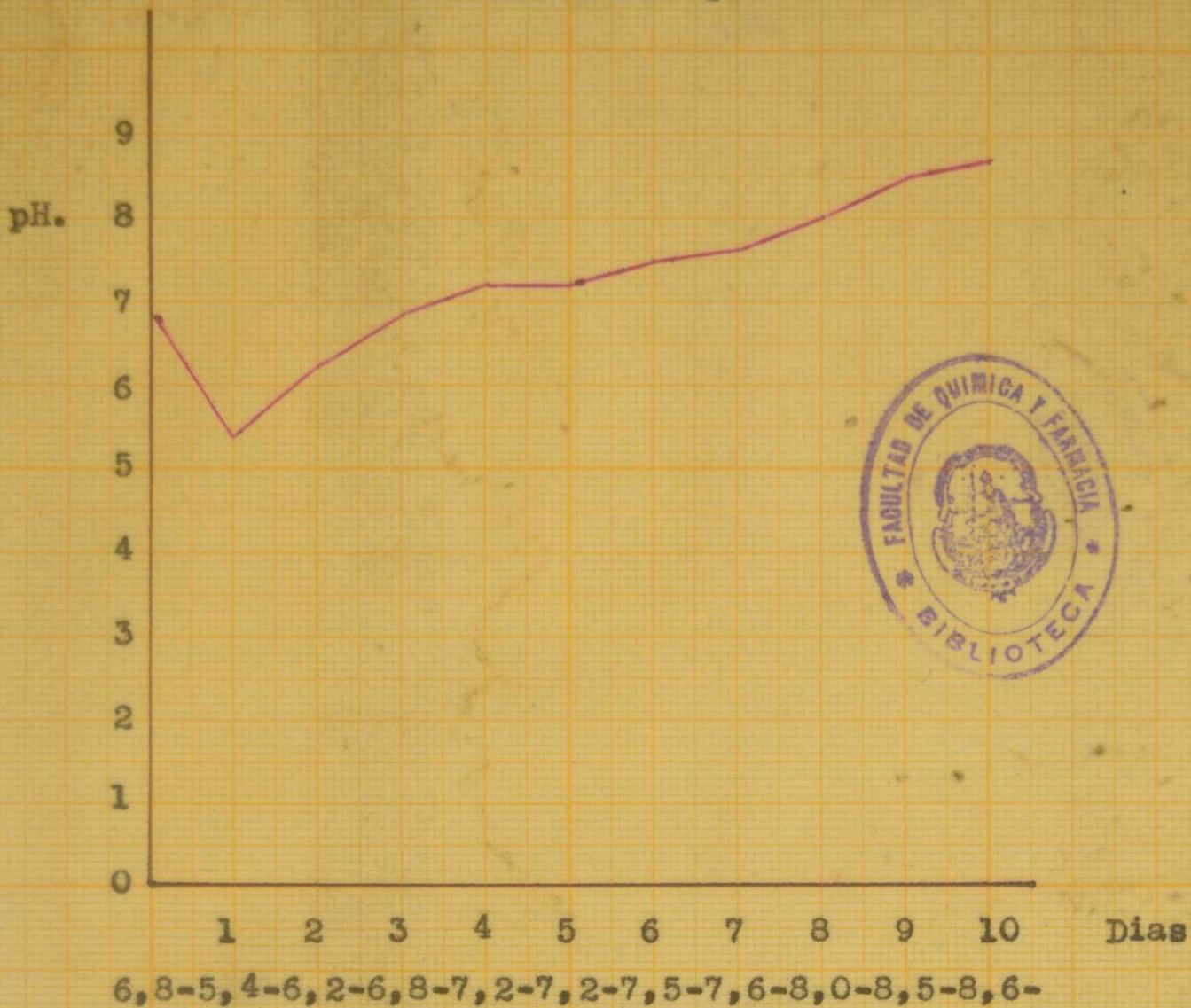
Curva de rendimiento



Décima octava serie de fermentaciones

Medio con "Corn steep"

Curva de pH

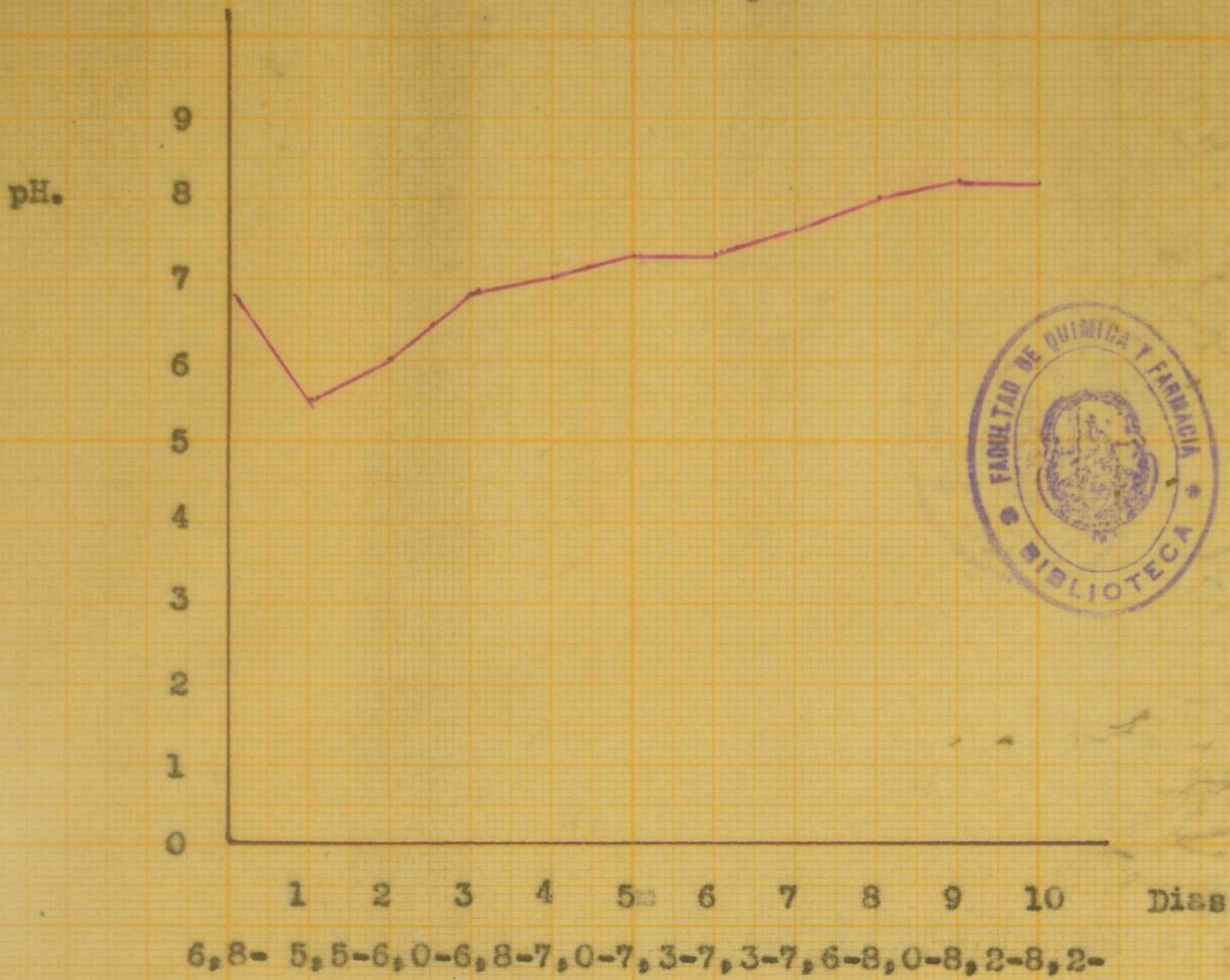


Curva de rendimiento

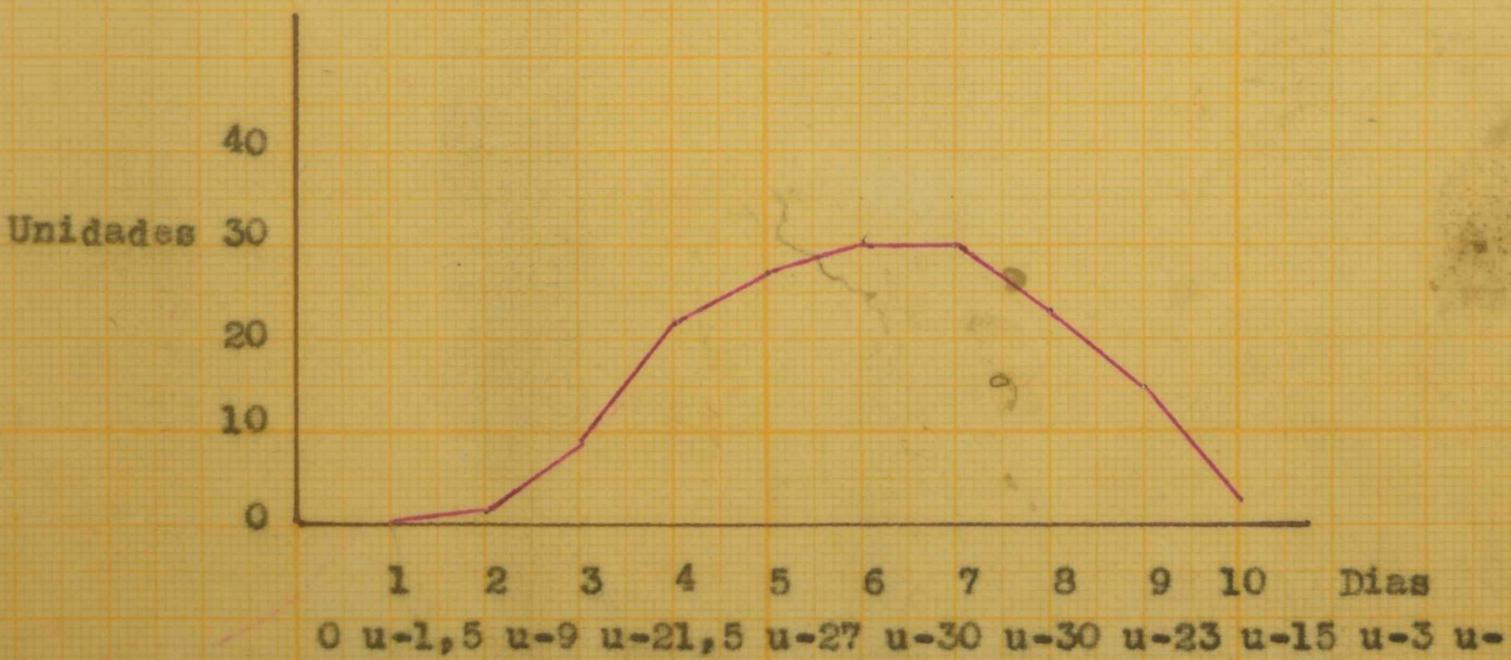


Décima novena serie de fermentaciones  
 Medio con Licor de "Corn steep" (sin germinar)

Curva de pH.



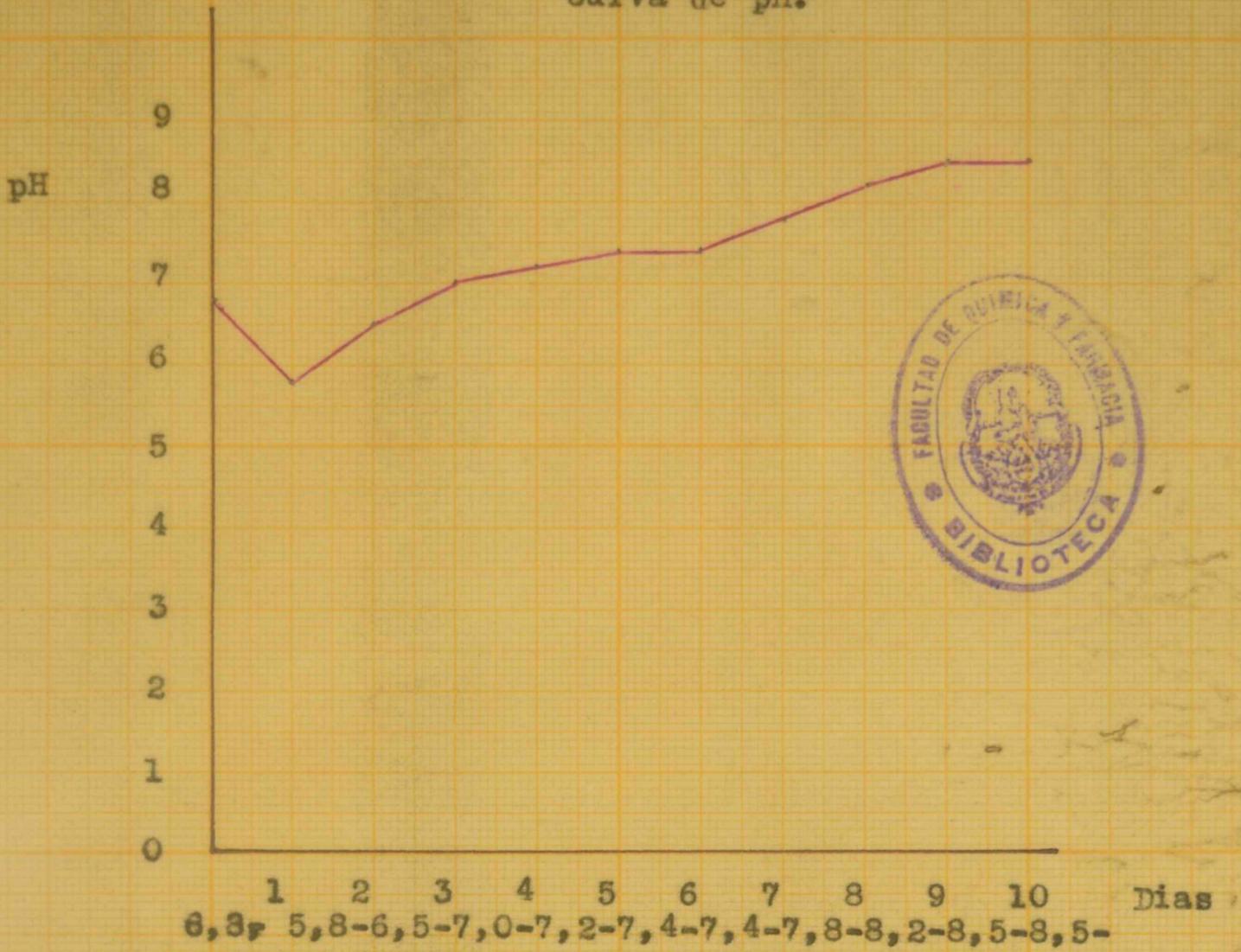
Curva de rendimiento



Décima novena serie de fermentaciones

Medio con Licor de "Corn steep" (germinado)

Curva de pH.

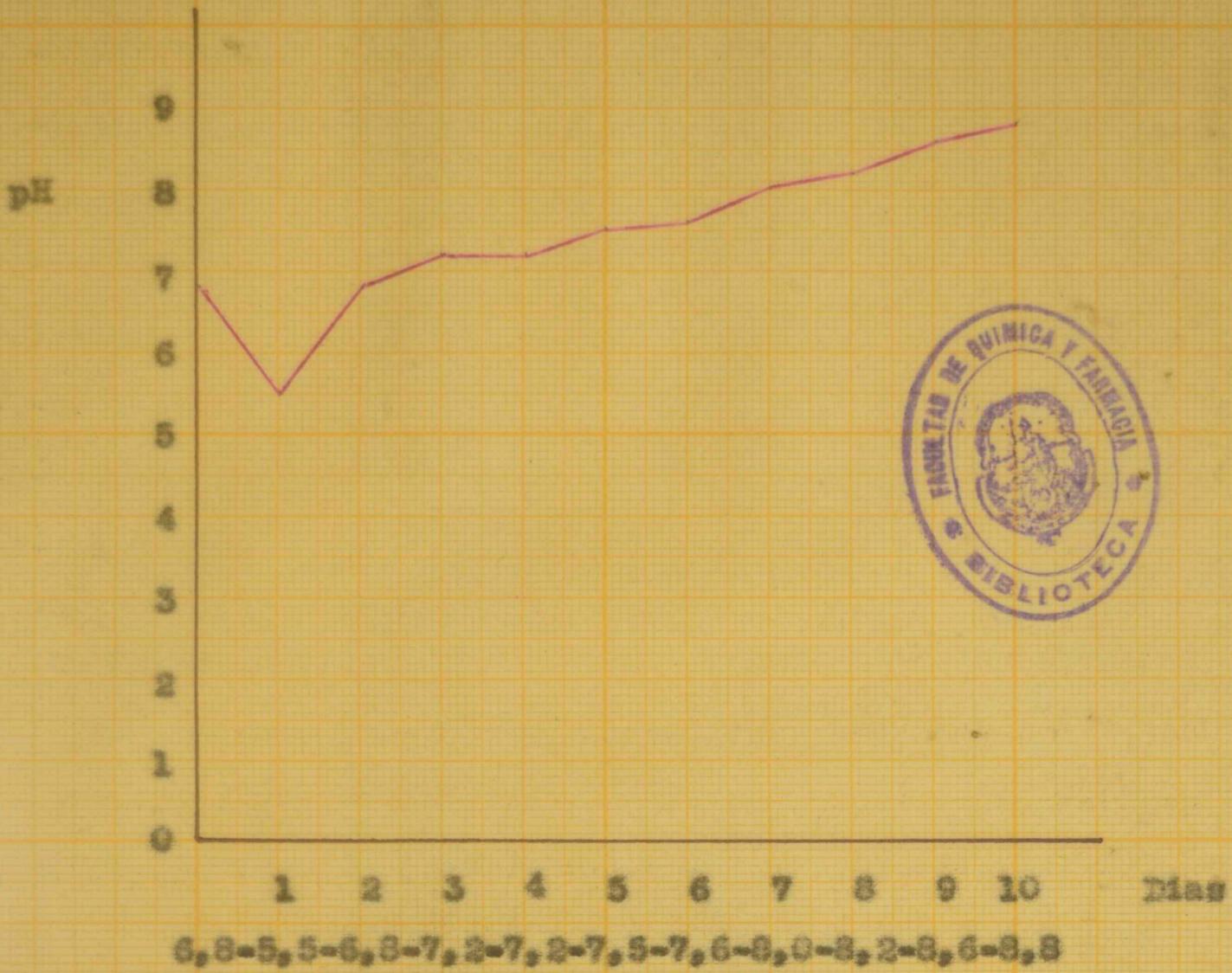


Curva de rendimiento



Vigésima serie de fermentaciones  
Medio con hidrolizado péptico de hígado

Curva de pH



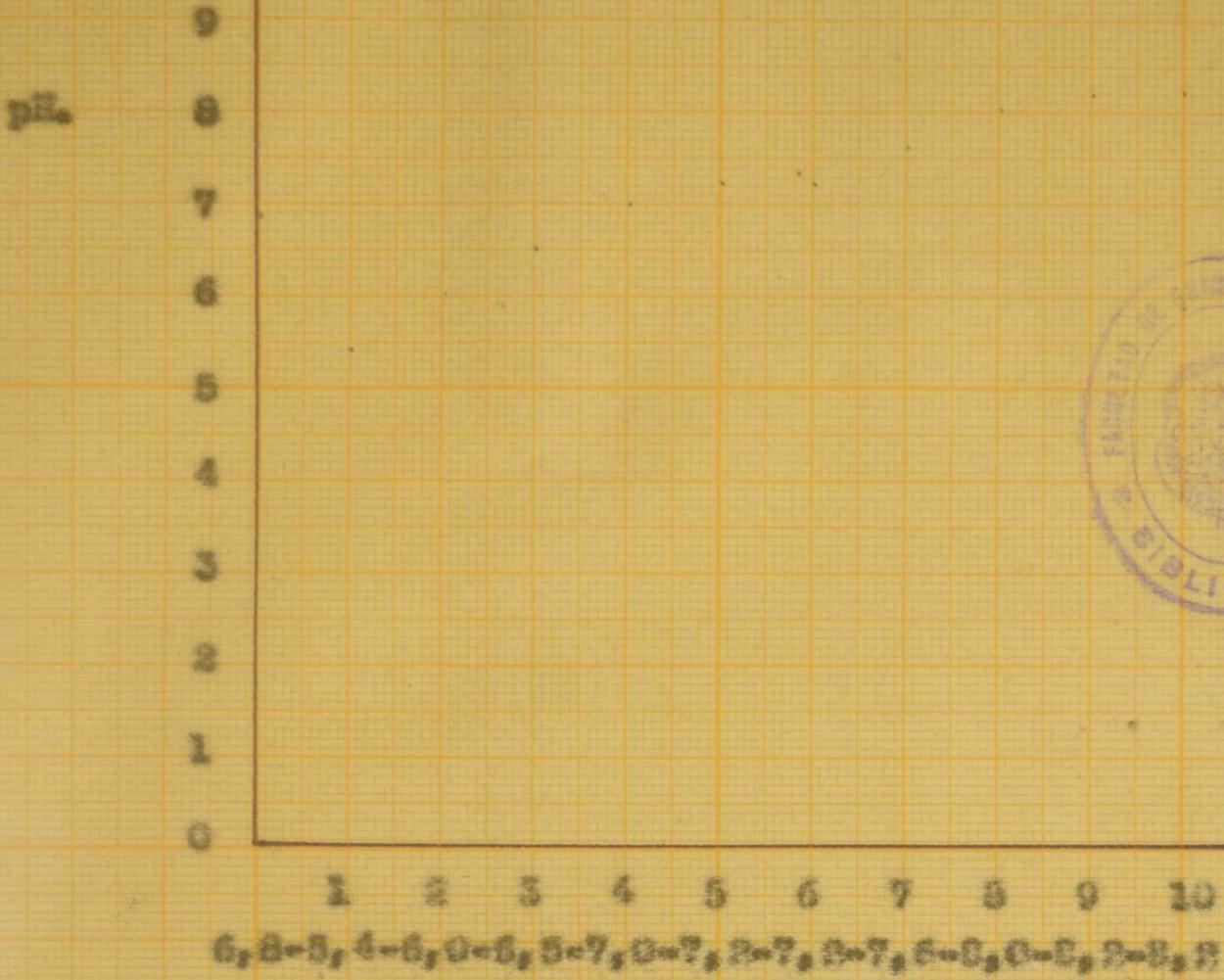
Curva de rendimiento



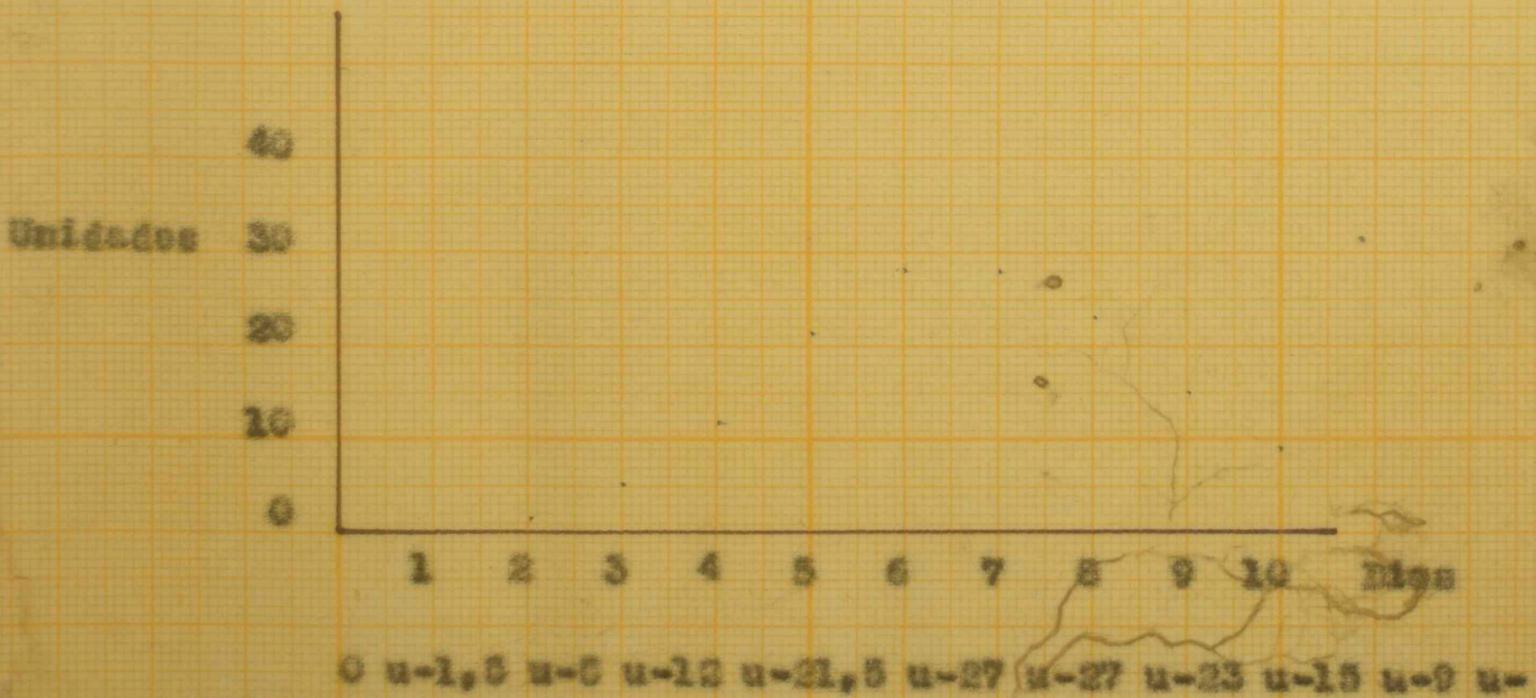
Vigésima primera serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado No. 1

Curva de pH



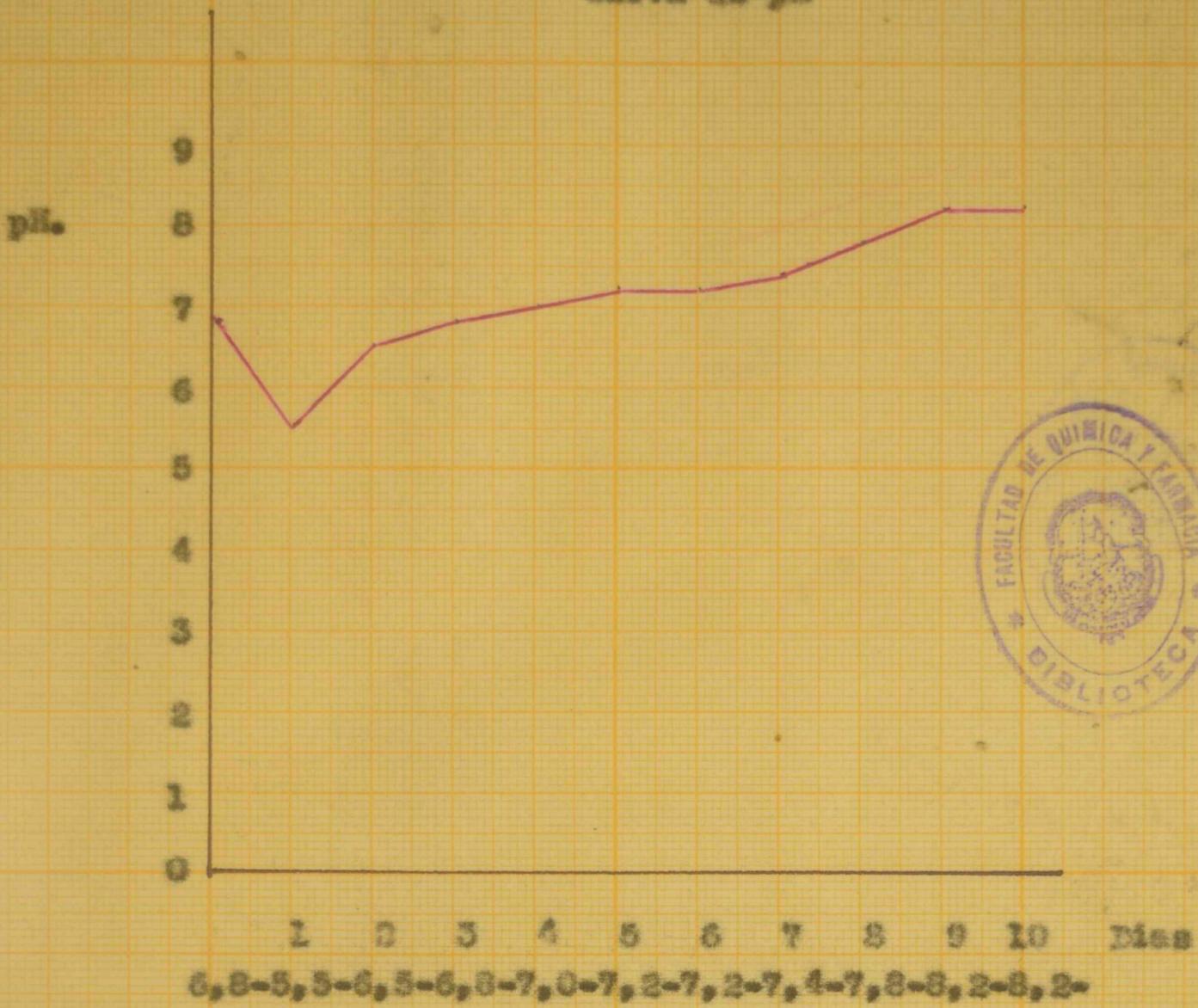
Curva de rendimiento



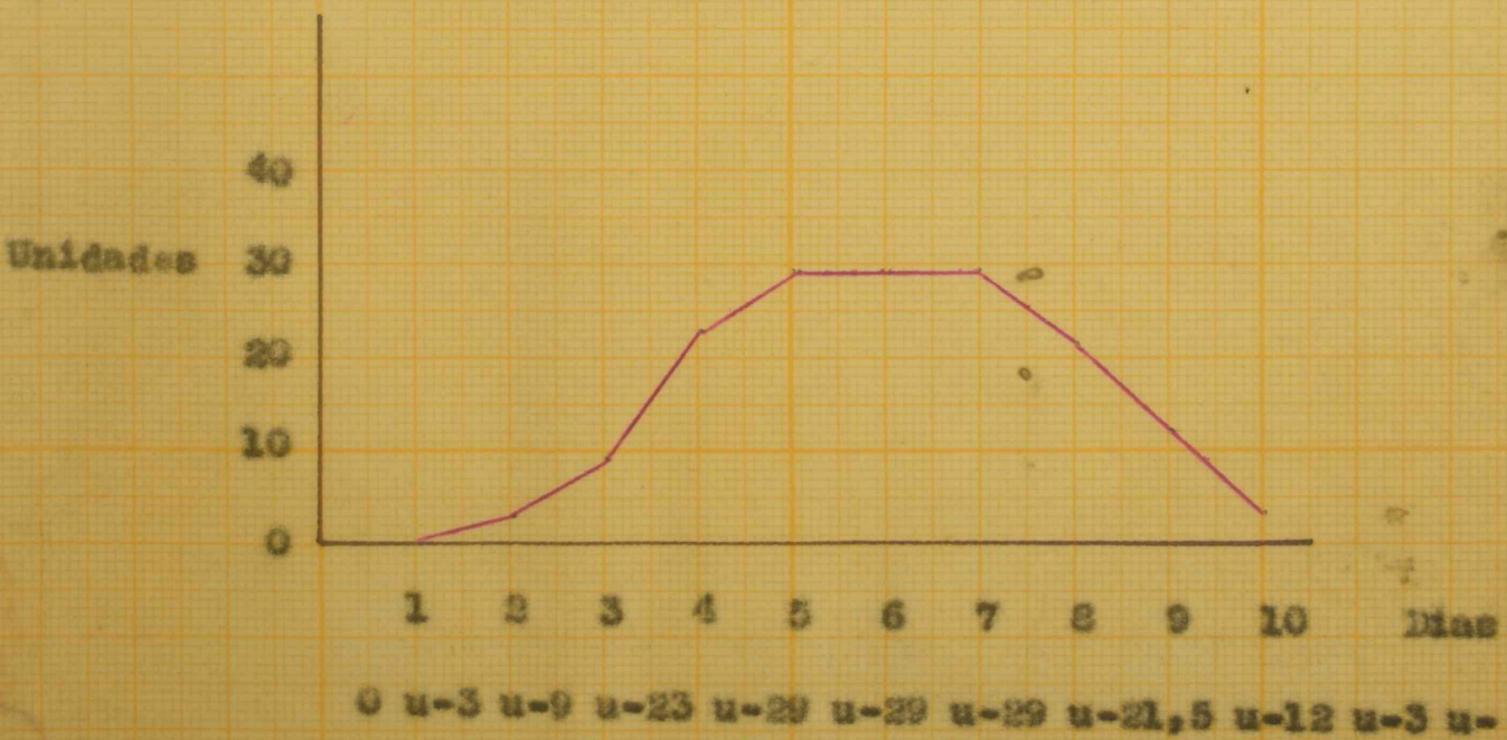
Vigésima segunda serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado No. 2

Curva de pH



Curva de rendimiento

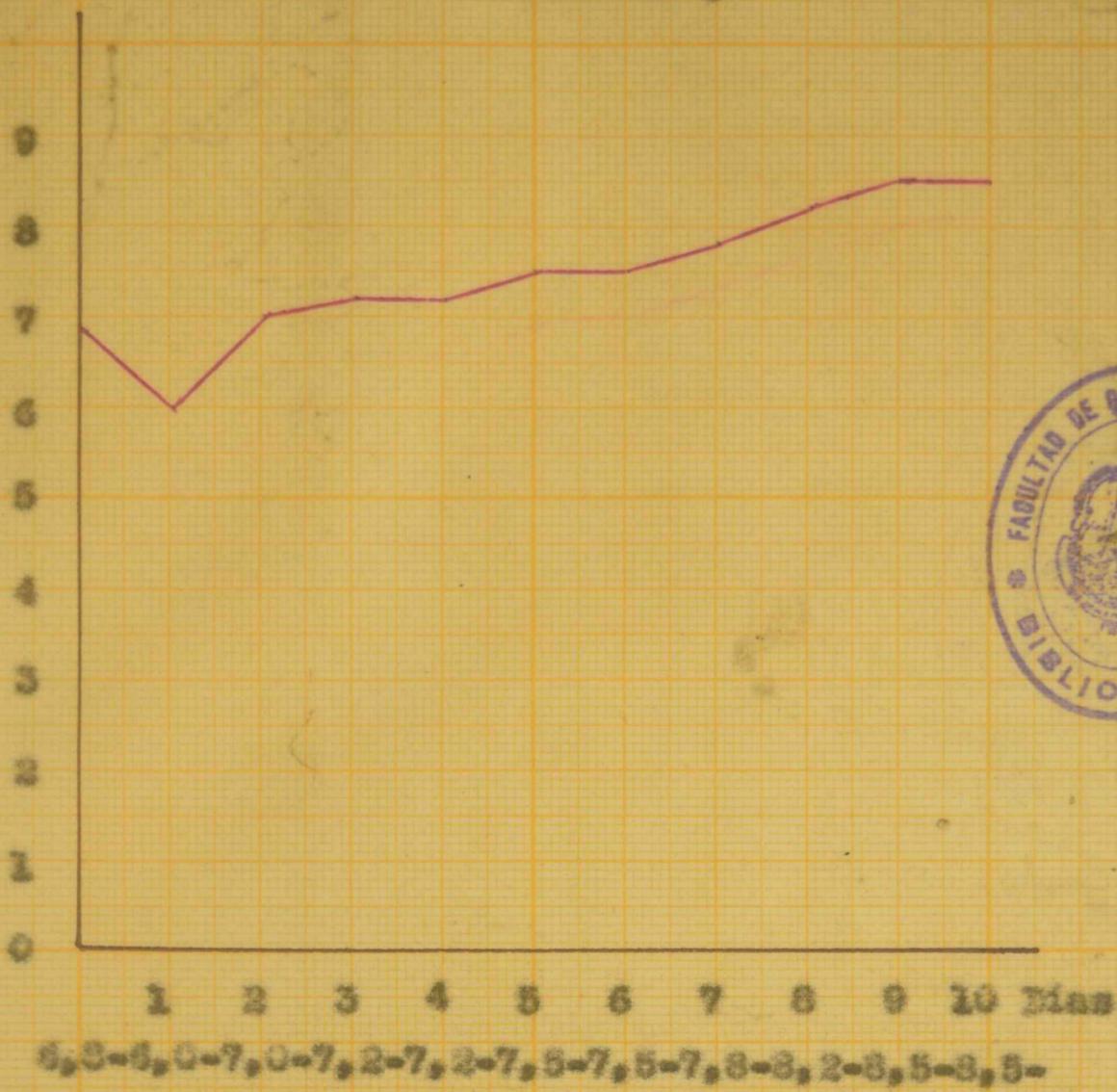


Vigésima tercera serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado No. 3

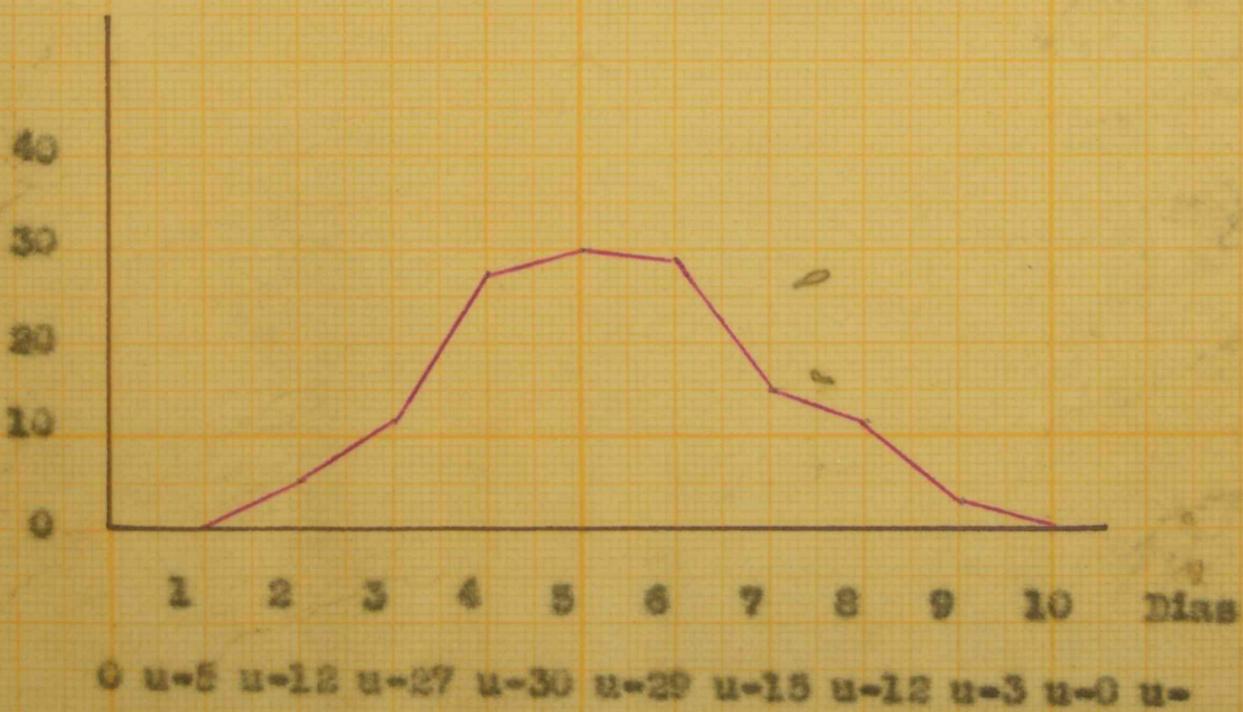
Curva de pH

pH.



Curva de rendimiento

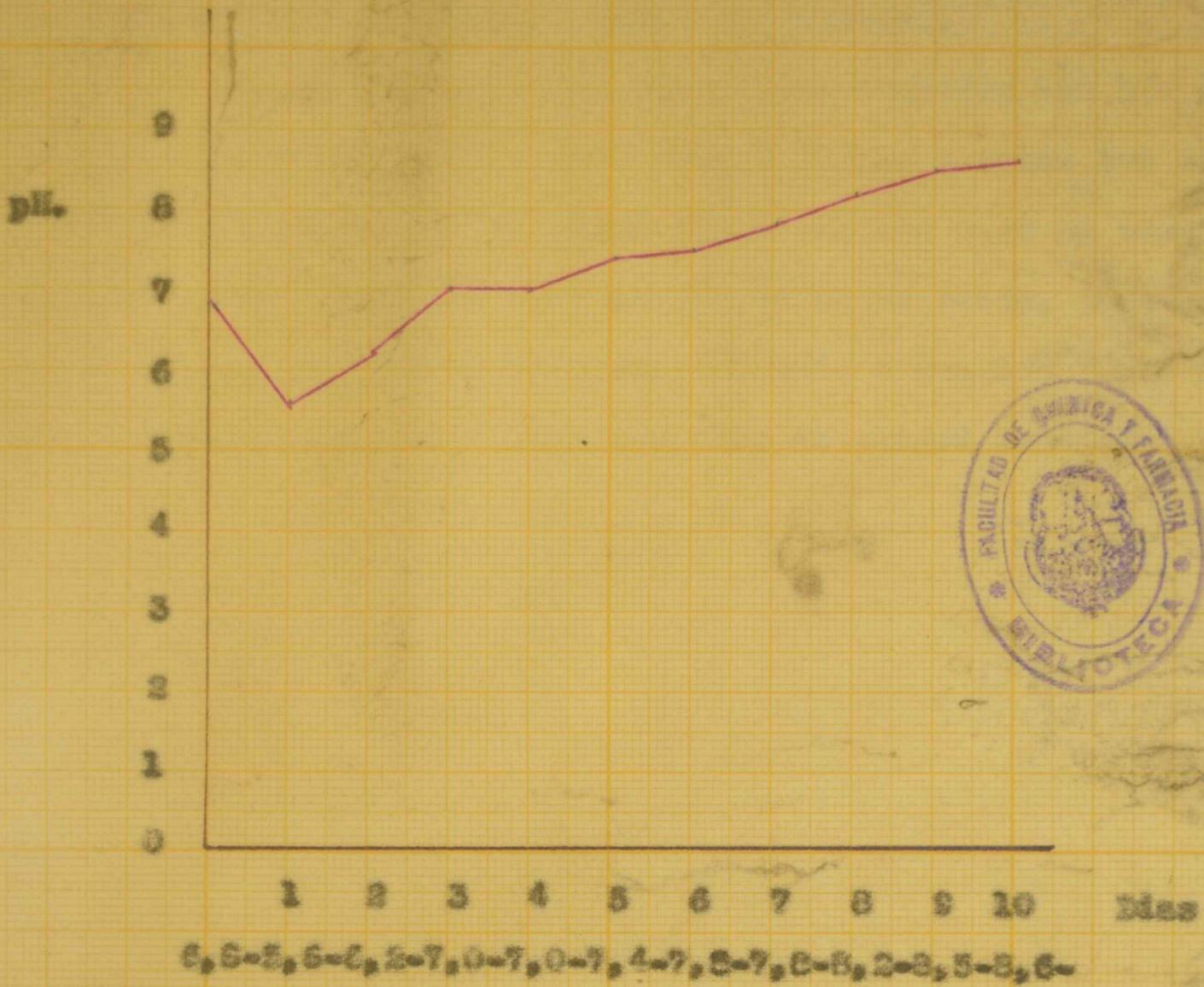
Unidades



### Vigésima cuarta serie de fermentaciones

Medio con hidrolizado No. 4

Curva de pH



Curva de rendimiento



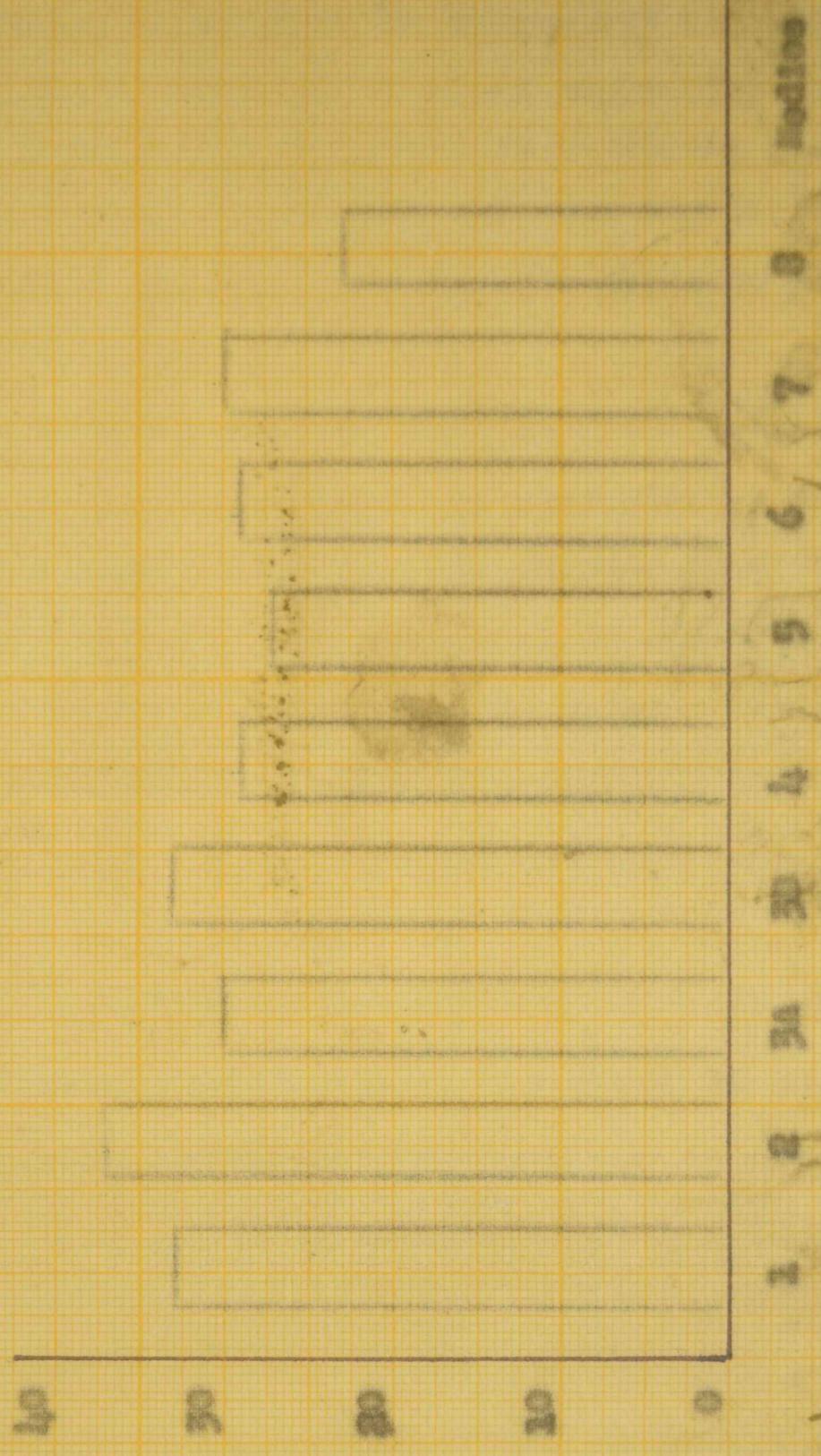
Con la variación efectuada se consiguió un aumento en los rendimientos máximos de antibiótico, estableciéndose así las condiciones generales de trabajo que permiten la obtención de bacitracina con rendimientos conceptuados como buenos.

La similitud de los resultados logrados con los distintos medios de cultivo, señala como recomendables a todos los productos utilizados como fuente de nitrógeno orgánico, pero en base a la facilidad de su obtención y lo económico de su costo, podemos distinguir a los productos extractivos del maíz o sea los "Corn steep" y los hidrolizados obtenidos a partir de sangre desecada.

6. PRACTICUM

Gráficas comparativas los resultados obtenidos de los mejores estudiantes

Unidades



1. Lupton de carne
2. "Carne steup"
- 3A. Lacer de "Carne steup" (sin granular)
- 3B. Lacer de "Carne steup" (granular)
4. Hidrolizado físico de hígado
5. Hidrolizado químico N° 1
6. Hidrolizado químico N° 2
7. Hidrolizado químico N° 3
8. Hidrolizado químico N° 4



**H. - METODOS DE OBTENCION Y ANALISIS SUMARIO DE LAS SUSTANCIAS  
UTILIZADAS COMO FUENTE DE NITROGENO PROTEICO.**

**"Corn steep":** esta sustancia es un producto extractivo del maiz. En microbiología el "Corn steep" puede servir como suplemento para reemplazar extractos o como fuente principal de nitrógeno y carbono para todos los microorganismos en general, que sean capaces de crecer bien en un medio simple que contenga extracto de carne y peptonas, sales minerales y vitaminas.

Para obtenerlo se comienza por humedecer el grano de maiz lo que se hace en tanques de madera abiertos. La operación se realiza a una temperatura de 45-52 grados centígrados durante 40 a 48 horas. Se necesitan de 20 a 30 litros de agua para cada 35 litros de grano ( 5 a 7 galones N.A. de agua por cada bushel de grano). Durante la humectación, los materiales solubles se disuelven, el grano se ablanda y su estructura se debilita y se rompe, lo que facilita la molienda y ulterior separación de sus componentes.

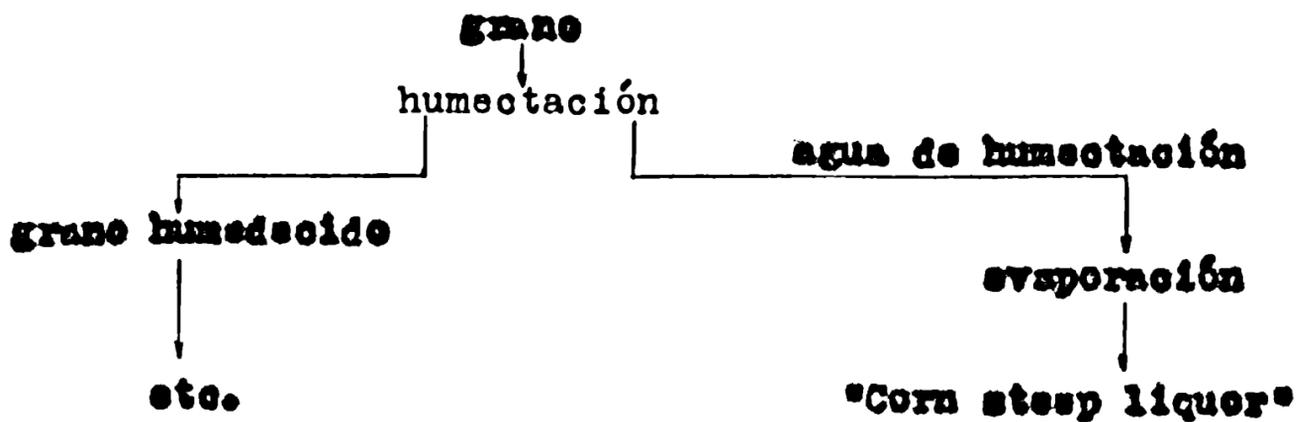
Inmediatamente antes de la entrada de agua a los tanques que contienen el maiz, se agrega  $SO_2$  con el objeto de impedir la putrefacción y facilitar la extracción de los compuestos solubles. La concentración inicial del mismo es de 0,1 a 0,2 por ciento pero dado que la mayor parte del  $SO_2$  es absorbido por el grano, esta baja, 5 horas después del agregado a 0,05 % y 10 horas después del agregado a 0,01 %.

Agua y grano se desplazan en contracorriente de manera que el agua que lleva menos cantidad de soluto y que por eso tiene mas capacidad de extracción, encuentra al grano mas humectado y en consecuencia se facilita la extracción de las sustancias solubles.

Cuando el grano está agotado, separamos la solución obtenida que se concentra hasta alcanzar un contenido de sólidos de alrededor del 50 % .

Este concentrado denominado "Corn steep liquor" crudo, puede usarse en procesos microbiológicos, con o sin transformaciones ulteriores, o bien luego de combinarlo con gluten y materiales fibrosos, destinarlo a alimento para animales.

Esquema del proceso



Durante el período de humectación y durante las otras fases del proceso, se produce una fermentación espontánea de carácter láctico y a pesar de que el pH es bajo, 3,8 a 4,5, el número total de microorganismos alcanza frecuentemente el orden de los billones por ml.- Debemos señalar que la fermentación láctica es importante en la manufactura de un "Corn steep" cuya calidad lo haga apto para su empleo en microbiología. Esto se debe a que como las proteínas del grano de maíz son relativamente insolubles en agua, pero se solubilizan en un medio ligeramente acidificante, dicho ácido láctico juntamente con el  $SO_2$ , confieren a las aguas de extracción esa acidez conveniente. A este proceso de solubilización de carácter químico, se le agrega otro de carácter bacteriano provocado por la acción de enzimas que actúan sobre las proteínas del grano reduciéndolas a unidades menores.

Debido a esta actividad bacteriana no solo puede separarse más fácilmente el almidón del gluten, sino que el "Corn steep" resultante es rico en aminoácidos y polipéptidos los que son fuentes de nitrógeno excelentes para casi todos los microorganismos.

En resumen el "Corn steep", es un concentrado de solubles de maíz, extraídos mediante un proceso de humectación realizado a un pH aproximado de 4 y a una temperatura de 45 a 52 grados centígrados, en presencia de  $SO_2$  y una fermentación láctica activa. Además incluye materiales solubles incorporados durante la molienda o separación.

Dado que el agua del proceso puede quedar retenida en la planta alrededor de 2 semanas, no sorprende que se produzcan fermentaciones adicionales.

El "Corn steep", utilizado, proviene de las Refinerías Argentinas de Maíz y fue cedido por los Laboratorios Squibb. El análisis sumario practicado sobre el mismo nos da los siguientes resultados:

Residue seco:.....	58,85 g%
Cenizas:.....	11,67 g%
Nitrógeno total:.....	4,92 g%
N no precipitable por ac. tricloroacético....	4,48 g%
N no precipitable por ac. fosfomolibdico....	2,80 g%
Nitrógeno amínico:.....	0,23 g%

Los porcentajes se refieren a 100 mililitros de muestra.

Licor de "Corn steep" sin concentrar. N° 1

Este "Corn steep" lo obtuvimos en el laboratorio a partir de maíz sin germinar.

Se tomó un kilogramo de este grano y se lo colocó en un recipiente enlozado con 10 veces su peso en agua. Se le agregan 10 g. de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para evitar la putrefacción. Se lo mantiene a una temperatura de 45 a 50 grados centígrados durante 72 horas, removiendo el grano con frecuencia y sin reponer el agua perdida por evaporación. Al cabo de este tiempo filtramos por algodón recogiendo el líquido en un recipiente de vidrio que se obtura con un tapón de algodón y se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión durante 30 minutos. Nos queda así preparada la fuente de nitrógeno proteico que utilizaremos en las fermentaciones. El análisis sumario que practicamos sobre 100 ml. de este producto arrojó los siguientes resultados:

Residue seco.....	1,64 g%
Cenizas.....	1,25 g%
Nitrógeno total.....	0,65 g%
N no precipitable por ac. tricloroacético....	0,53 g%
N no precipitable por ac. fosfomolibdico....	0,49 g%
Nitrógeno amínico.....	0,06 g%

- Licor de "Corn steep" sin concentrar. N° 2

Se lo obtiene a partir de maíz germinado. La técnica es la siguiente: Se humedece bien un kilogramo de maíz y se lo coloca en un recipiente amplio para brindarle al grano un máximo de superficie. Se lo lleva a estufa a 37 grados centígrados donde se lo mantiene hasta que germine, debiéndose realizar una remoción frecuente del grano para exponerlo al aire. Debe mantenerse constantemente un grado promedio de humedad.

Una vez germinado colocamos este maíz en un recipiente enlozado con 10 veces su peso en agua y 10 g. de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  para evitar la putrefacción y se sigue la misma técnica que con el producto anterior.

El análisis efectuado sobre este "Corn steep" y referido a 100 ml. del mismo, nos da los siguientes resultados:

Residue seco.....	2,93 g.%
Cenizas.....	0,62 g.%
Nitrógeno total.....	0,88 g.%
N no precipitable por ac. tricloroacético.....	0,77 g.%
N no precipitable por ac. fosfomolibdico.....	0,74 g.%
Nitrógeno amínico.....	0,10 g.%

- Peptona de carne

Es un autodigerido de estómago, que luego de ser desengrasado y privado de mucus, se lo suspende en 3 veces su peso en agua; el pH de esta suspensión se lleva a 2 mediante el agregado de la cantidad necesaria de ácido clorhídrico. Se lo mantiene en estufa a una temperatura de 45 a 50 grados centígrados durante 48 horas, y en el transcurso de las mismas debe reajustarse el pH cada 6 horas.

Una vez transcurridas las 48 horas se somete a ebullición y luego se filtra. Este filtrado se ~~xxx~~ concentra al vacío y el producto resultante se seca y se pulveriza obteniéndose así lo que llamamos peptona de carne.

El análisis practicado sobre esta peptona que fué referido a 100 gramos de muestra, nos dió los resultados siguientes:

Humedad.....	1,90	g. %
Cenizas.....	17,70	g. %
Nitrógeno total.....	6,93	g. %
N no precipitable por ac. tricloroacético.....	6,16	g. %
N no precipitable por ac. fosfomolibdico.....	3,64	g. %
Nitrógeno amínico.....	0,734	g. %

#### - Hidrolizado péptico de hígado

Se toman 3 partes de hígado y una de os-  
ténago previamente desengrasados y librados de mucus, y se suspenden  
en tres veces su peso en agua. Se ajusta el pH a 3 agregando ácido  
clorhídrico y se lleva a estufa manteniéndolo durante 48 horas a una  
temperatura de 45 a 50 grados centígrados. El pH se reajusta cada  
6 horas.

Al cabo de las 48 horas se filtra y el filtrado se concen-  
tra al vacío hasta consistencia pastosa.

El análisis realizado sobre una muestra de este hidrolizado  
nos da las siguientes cifras referidas a 100 gramos:

Humedad.....	15,20	g. %
Cenizas.....	11,93	g. %
Nitrógeno total.....	8,53	g. %
N no precipitable por ac. tricloroacético.....	7,32	g. %
N no precipitable por ac. fosfomolibdico.....	7,12	g. %
Nitrógeno amínico.....	1,095	g. %

#### - Hidrolizado cárnico No. 1

Este hidrolizado se obtuvo a partir de  
un subproducto de la industria frigorífica: sangre desecada.

La sangre que cae en las playas de faenamiento así como la  
que proviene del lavado del animal faenado, se arrastra con agua  
a grandes tanques donde se seca y posteriormente se muele. Este pro-  
ducto constituye nuestra materia prima.

El agente hidrolizante utilizado es  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . La técnica de  
trabajo es la siguiente: se mezclan 200 gramos de proteínas con 10  
gramos de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y se suspenden en 1 litro de agua.

Lo llevamos a ebullición y lo mantenemos durante tres horas, agitando frecuentemente y reponiendo el agua que se evapora. Se deja enfriar y se filtra por algodón, reuniéndose el filtrado en un recipiente de vidrio, que se tapona con algodón y se esteriliza en autoclave a una atmósfera de presión durante treinta minutos.

El análisis sumario de este producto, referido a 100 ml., nos da el siguiente resultado:

Residuo seco.....	3,23 g %
Cenizas .....	0,24 g %
Nitrógeno total .....	1,89 g %
N no precipitable por ac. tricloroacético.....	1,62 g %
N no precipitable por ac. fosfomolibdico.....	1,24 g %
Nitrógeno amínico .....	0,12 g %

#### - Hidrolizado químico No. 2

También se lo obtiene a partir de sangre desecada. La técnica de obtención es la misma que la descrita en el trabajo inmediato anterior. Sólo varía el agente hidrolizante y la proporción en que este interviene.

Para 200 gramos de proteínas, agregamos 20 g. de NaOH y los suspendemos en un litro de agua. Los resultados obtenidos al realizar el análisis de este producto, referidos a 100 ml., son los siguientes:

Residuo seco .....	12,23 g %
Cenizas .....	1,83 g %
Nitrógeno total .....	4,65 g %
N no precipitable por ac. tricloroacético.....	3,22 g %
N no precipitable por ac. fosfomolibdico.....	2,94 g %
Nitrógeno amínico .....	0,47 g %

#### - Hidrolizado químico No. 3

A igual que los denominados hidrolizados No. 1 y No. 2, se lo obtiene a partir de sangre desecada. El agente hidrolizante utilizado es  $\text{Ca(OH)}_2$ . Para 200 gramos de sangre desecada, empleamos 25 g. del mismo suspendiéndose todo en un litro de agua. La técnica de trabajo es la ya descrita para los hidroliza-

El análisis practicado sobre el mismo, referido a 100 mililitros nos dió los siguientes resultados:

Residuo seco.....	8,86 g.%
Cenizas.....	0,53 g.%
Nitrógeno total.....	4,11 g.%
N no precipitable por ac. tricloroacético..	3,93 g.%
N no precipitable por ac. fosfomolibdico...	2,48 g.%
Nitrógeno amínico.....	0,15 g.%

- Hidrolizado químico No. 4

Se lo obtiene también a partir de sangre desecada. Interviene como sustancia hidrolizante,  $H_2SO_4$  concentrado. Por cada 200 gramos de proteínas se agregan 10 gramos de  $H_2SO_4$  suspendiéndose la mezcla en 1 litro de agua.

La técnica de trabajo no presenta variaciones con respecto a los hidrolizados anteriores. El análisis efectuado a este producto, referido a 100 ml., nos da los siguientes datos:

Residuo seco.....	41,77 g.%
Cenizas.....	8,65 g.%
Nitrógeno total.....	5,77 g.%
N no precipitable por ac. tricloroacético.....	3,50 g.%
N no precipitable por ac. fosfomolibdico.....	2,90 g.%
Nitrógeno amínico.....	0,75 g.%

**III - RESUMEN Y CONCLUSIONES**

## RESUMEN

Se ha puesto a punto un método de obtención de bacitracina por fermentación sumergida.

Se utilizó como germen productor una cepa No. 166 de los Laboratorios "Ocefa", de *Bacillus subtilis* Tracy (variedad licheniformis).

Para la preparación de los caldos de fermentación se tomó como medio tipo, el utilizado por HEDLIN en 1951, del que se fué variando la fuente de nitrógeno orgánico, con el objeto de hallar un sustrato proteico que produciendo un buen rendimiento, resulte asequible a nuestra industria.

Así se utilizaron, peptona de carne, "Corn Steep", licor de "Corn Steep" obtenido a partir de maíz sin fermentar, licor de "Corn Steep" obtenido a partir de maíz fermentado, hidrolizado péptico de hígado, hidrolizado químico de sangre desecada, obtenido en medio alcalino de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al 10 %, hidrolizado químico de sangre desecada, obtenido en medio alcalino de  $\text{NaOH}$  al 20 %, hidrolizado químico de sangre desecada, obtenido en medio alcalino de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  al 25 %, y por último hidrolizado químico de sangre desecada, obtenido en medio ácido de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10 %.

Se determinaron: la cantidad óptima de inóculo, las condiciones de inoculación y el caudal de aire más conveniente.

Con cada medio se hicieron tres fermentaciones simultaneas, constituyendo los datos proporcionados, el valor promedio de las mismas. Se hicieron así, con ocho medios, ocho series de fermentaciones, y estas series se repitieron en las siguientes condiciones:

- a) trabajando a temperatura ambiente.
- b) trabajando a temperatura regulada entre 29-30 °C.
- c) en las mismas condiciones de temperatura, pero empleando un inóculo obtenido por agitación.

Cada 24 horas se extrajo muestra y en ella se determinó el pH colorimétricamente y su contenido en antibiótico. La valoración se realizó empleando un método biológico: el de las diluciones seriadas, utilizando como germen "test" el *Estafilococo albus*.

Se describen los métodos de obtención de las sustancias utilizadas

como fuente de nitrógeno orgánico y el análisis sumario practicado a las mismas.

Se determinó:

Residuo seco.

Cenizas.

Nitrógeno total.

Nitrógeno no pptable con ácido tricloroacético.

Nitrógeno no pptable por ácido fosfomolibdico.

Nitrógeno amínico.

CONCLUSIONES

Los rendimientos máximos obtenidos con fermentación sumergida, al trabajar a temperatura ambiente, oscilan entre 12 y 16 unidades.

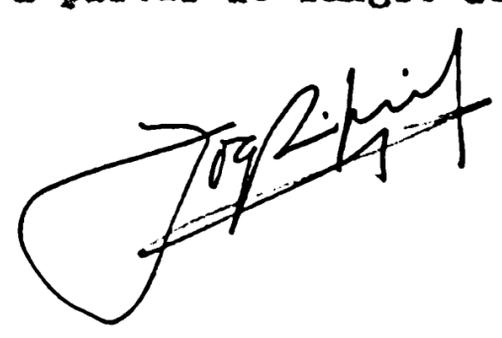
Trabajando a temperatura regulada entre 29-30 °C, se obtienen rendimientos máximos comprendidos entre 23 y 33 unidades, lo que demuestra la influencia favorable de este factor.

La preparación del inóculo por agitación, eleva aun más los rendimientos, oscilando los máximos entre 23 y 37 unidades.

La curva de pH tiene una estructura típica, presentando un descenso en el primer día, que puede llegar hasta pH 5 y luego un ascenso paulatino que puede llegar a pH 9.

El caudal de aire más conveniente resultó ser el de un litro de aire por litro de medio, por minuto, y la cantidad óptima de inóculo, la de 100 cc. por cada tres litros de medio de cultivo.

Todos los sustratos proteicos ensayados, dieron rendimientos satisfactorios en antibiótico, por lo tanto todos son recomendables; pero en base a la facilidad de obtención y a lo económico de su costo, podemos distinguir a los productos extractivos del maíz, o sea los "Corn Steep", y los hidrolizados químicos obtenidos a partir de sabgre desecada.-



IV - BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALBERTS, C.L., BLACK, O.F., U.S.D.A., Bureau of Plant Industry, (1913).
- 2.- ALKNER, A.S., JOHNSON, B.A., GOLDFINE, J. y MELLINBY, F.L., J. Bact. 55, 249 (1948).
- 3.- ALTHEIMYER, W.A., J. Michigan State, Med. Soc., 50, 597 (1951).
- 4.- ARRIAGADA, A., SAVAGE, M.C., ABRAMSON, H.P., KENTLEY, N.G. y SHARP, A.L., Brit. J. Exper. Path., 30, 435 (1949).
- 5.- ARRIAGADA, A., HONEY, H.W., GIBBINGS, M.A. y WALTERS, I.G., Brit. J. Exper. Path., 30, 453 (1949).
- 6.- BARRY, G.T., GREGORY, J.D. y CRAIG, L.C., J. Biol. Chem., 175, 435 (1948).
- 7.- BATHURBY, A.R. y CRAIG, L.C., J. Am. Chem. Soc., 74, 4023 (1952).
- 8.- BENNETT, R.W., DUDLEY, J.F. y SHEPARD, E.L., Industrial and Engineering Chemistry, 43, 1488 (1951).
- 9.- BOND, G.C., HLEBICK, R.H. y MAC DONALD, L.H., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 38, 30 (1949).
- 10.- BROCKMANN, H., GRUBISOMER, R., KASS, W. y KALBE, H.S., Ber. Dtsch. Chem. Ges., 84, 260 (1951).
- 11.- SUBPELSKY, E. y JORDAN, J., J. Am. Chem. Soc., 67, 1824 (1945).
- 12.- BURTON, H.S., Chem. and Ind., 576 (1954).
- 13.- BUSH, H.T. y GOTH, A., J. Pharmacol. Exp. Therap., 73, 164 (1943).
- 14.- CARTER, H.B., COTTLERS, D. y ANDERSON, H.W., Science, 107, 113 (1943).
- 15.- CAVALLITO, CH.J. y BAILEY, J.H., J. Am. Chem. Soc., 66, 1950 (1944).
- 16.- CORNILL, A.B. y BABBS, V., J. Conn. Med. Prat., 7, 321 (1885).
- 17.- CRAIG, L.C., GREGORY, J.D. y BARRY, G.T., J. Clin. Investigation, 22, 1014 (1949).
- 18.- CRAIG, L.C., WEISIGER, J.R., HAUSMANN, W. y HARTENIST, R.J., J. Biol. Chem., 199, 259 (1952).
- 19.- CRAIG, L.C., HAUSMANN, W. y WEISIGER, J.R., Journal Biol. Chem. (1952)
- 20.- CRAIG, L.C., HAUSMANN, W. y WEISIGER, J.R., J. Amer. Chem. Soc., 76, 2839 (1954).
- 21.- DAVIDSON, F.W., Laryngoscope, 60, 131 (1950).

- 22.- DARKER, G.D., BROWN, H.G., FINE, A.H., BIRO, B. y GOORLEY, J.D.,  
J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., 37, 156 (1948).
- 23.- ENLICH, F., Ber. Dtsch. Chem. Ges., 40, 2533 (1907).
- 24.- EMERICH, R. y LOW, O., Ztschr. Hyg. Infektkr., 31, 1 (1899).
- 25.- MILO, R.A., Rev. Brasil Farm., 27, 336 (1946).
- 26.- FINLAND, L., FRANK, P.F. y WILCOX, C., Am. J. Clin. Path., 20,  
325 (1950).
- 27.- FLEMING, A., Brit. J. Exp. Path., 10, 226 (1929).
- 28.- FLEMING, A., Proc. Roy. Soc. London, 93, 306 (1922).
- 29.- FLEMING, R.E. y GARIBALDI, J.A., Arch. Biochem., 17, 447 (1943).
- 30.- FRIEDBERG, C.K. y BADNER, M.E., J.A.M.A., 147, 46 (1951).
- 31.- GRATIA, A. y DATH, S., Comp. Rend. Soc. Biol., 91, 1442 (1924).  
92, 1125 (1925). 93, 481 (1925). 94, 1267 (1926).
- 32.- HARMENIST, E.J., J. Amer. Chem. Soc., 75, 5528 (1953).
- 33.- HAUSMANN, W., WEISIGER, J.R. y CRAIG, L.C., J. Amer. Chem. Soc.,  
77, 723 (1955, a).
- 34.- HAUSMANN, W., WEISIGER, J.R. y CRAIG, L.C., J. Amer. Chem. Soc.,  
77, 721 (1955, b).
- 35.- HENDLIN, G., Arch. Biochem., 24, 435 (1949).
- 36.- HUTNER, S.H., J. Bot., 52, 213 (1946).
- 37.- HERRICK, W. E. , "Penicillin and other antibiotic agents", Saunders,  
W.B. Co., Philadelphia and London, 253 (1945).
- 38.- HILL, G.M., BELTON, F.C. y BLANTHNEY, E.D., Brit. J. Exper. Path.,  
30, 427 (1949).
- 39.- HIRS, C.H.W., STEIN, W.H. y MOORE, S., J. Biol. Chem. , 211, 941  
(1954).
- 40.- HOFF, D.A., BENNETT, R.E. y STANLEY, A.R., Science, 106, 551 (1942).
- 41.- HOWE, C.W., Surg. Gynec. and Obst., 91, 669 (1950).
- 42.- INGRAM, V.M., J. Biol. Chem. , 202, 193 (1953).
- 43.- INSKEEP, G.C., BENNETT, R.E., DUDLEY, J.F. y SHEPARD, M.W., Indust.  
Engin. Chem., 43, 1433 (1951).
- 44.- JAWETZ, E., GUMHISON, J.E. y COLLMAN, V.R., Science, 111, 254(1950).
- 45.- JOHNSON, B.A., ALEGER, H.S. y MELINNEY, P.L., Science, 102, 376(1945).
- 46.- KACZKA, E., y FOLKERS, K., "The Chemistry of Penicillin", p. 244,  
Princeton, The University Press, (1949).

- 47.- KOLMER, J.A., "Penicillin Therapy, Including Tyrothricin and other antibiotic therapy", D. Appleton-Century, Co. Inc., New York, 7 (1945).
- 48.- KUHN, R. y DRAWERT, F., Liebigs Ann., 590, 55 (1954).
- 49.- LEWIS, J.C., EBENEY, R.E., GARIBALDI, J.A., MICHENER, H.D., HIRSCHLUM D.J., TRAUFLER, D.H., LAUGLYKIE, A.F., LIGHTBODY, H.D., STUBBS, J.J. y HUMFELD, H., Arch. Biochem., 14, 415 (1947).
- 50.- LOCKHART, J.M., NEWTON, G.G.F. y ABRAHAM, E.P., Nature, London, 173, 536 (1954).
- 51.- LOCKHART, J.M. y ABRAHAM, E.P., Biochem. J., 53, 633 (1954, a).
- 52.- LOCKHART, J.M. y ABRAHAM, E.P., Biochem. J., 58, 647 (1954, b).
- 53.- LOCKHART, J.M., ABRAHAM, E.P. Y NEWTON, G.G.F., Biochem. J., 61, 534 (1955).
- 54.- MELLENBY, F.L., JOHNSON, B.A. Y TENG, P., Surg. Gynec. and Obst., 89, 657 (1951).
- 55.- MILLER, C.P. y BOHNHOFF, M., J.A.M.A., 130, 485 (1946).
- 56.- MAC-LEOD, R.A. y SMELL, E.E., J. Biol. Chem., 170, 351 (1947).
- 57.- MELLENBY, F.L., New York Med., diciembre de 1949.
- 58.- MELLENBY, F.L. y JOHNSON, B.A., Am. J. Med., 7, 794 (1949).
- 59.- MELLENBY, F.L., Proc. N. Y. State Assoc. Publ. Health Lab., 30, 19 (1950).
- 60.- MELLENBY, F.L. y JOHNSON, B.A., "The importance of clinical and laboratory cooperation in the control of surgical infections", M.D., octubre de 1950.
- 61.- MILLER, C.P. y BOHNHOFF, M., Science, 105, 620 (1947).
- 62.- NEUBERGER, A., Advances Protein. Chem., 4, 297 (1948).
- 63.- NEWTON, G.G.F. y ABRAHAM, E.P., Biochem. J., 47, 257 (1950).
- 64.- NEWTON, G.G.F. y ABRAHAM, E.P., Biochem. J., 53, 597 (1953, a).
- 65.- NEWTON, G.G.F. y ABRAHAM, E.P., Biochem. J., 53, 604 (1953, b).
- 66.- OXFORD, A.E., RAISTRICK, H. y SMITH, G., Chemical Industries, 61, 22 (1942).
- 67.- PERHICK, S.B. and COMPANY, Bacitracin, (1952).
- 68.- PIEZ, K.A., J. Biol. Chem., 207, 77 (1954).
- 69.- PORATH, J., Nature, London, 172, 871 (1953).
- 70.- PORATH, J., Acta Chem. Scand., 8, 1813 (1954).
- 71.- PRIGAL, S.J. y MCLOMUT, H., J.A.M.A., 144, 897 (1950).

- 72.- FULASKI, R.J., Ann. N. York Acad. Science, 53, 347 (1950).
- 73.- SCUDI, J.V., CORET, J.A. y ANTOPOL, W., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 553 (1947).
- 74.- SHARP, B.F., ARRIAGADA, A., NEWTON, G.C.F. y ABRAHAM, R.P., Brit. J. Exper. Path., 30, 447 (1949).
- 75.- BRUNNING, H.H. y ANDERSON, T.G., J.A.M.A., 147, 1336 (1951).
- 76.- WAKSMAN, S.A. y WOODRUFF, H.B., J. Bact. 42, 231 (1941).
- 77.- WAKSMAN, S.A. y WOODRUFF, H.B., Proc. Soc. Exp. Biol., New York, 40, 207 (1942).
- 78.- WAKSMAN, S.A., HOWING, M.S., WELSON, H. y JOOPHUIS, H.P., Soil. Sc., 54, 281 (1942).
- 79.- WAKSMAN, S.A., "Les antibiotiques", Medicine et Biologie, Masson, Cie., Paris, 11 (1947).
- 80.- WAKSMAN, S.A., "Microbial antagonisms and antibiotic substances", 2nd. Ed. The Commonwealth Foundation. New York, 36 (1947).
- 81.- WAKSMAN, S.A. y INCHEVALIER, H.A., Science, 109, 305 (1949).
- 82.- WAKSMAN, S.A., SWART, R.A. y HUTCHISON, D., Arch. Biochem., 22, 16 (1949).
- 83.- WARING, W.S. y WIKMAN, C.H., ibid, 1, 425 (1943).
- 84.- WEISICER, J.R., HAUSMANN, W. y CRAIG? L.C., J. Amer. Chem. Soc., 77, 731 (1955).
- 85.- WHITE, H.C. y HILL, J/H., J. Bact., 45, 433 (1943).
- 86.- WOODRUFF, H.B. y FOSTER, J.W., J. Bact., 51, 363 (1946).

