

MANUTENÇÃO DE ESPOROS DE *PENICILLIUM NOTATUM* POR LIOFILIZAÇÃO (OBSERVAÇÃO DURANTE 25 ANOS) ⁽¹⁾

MAINTENANCE OF SPORES OF *PENICILLIUM NOTATUM* BY LYOPHILIZATION (OBSERVATION DURING 25 YEARS)

HASSIB ASHCAR ⁽²⁾

SUMMARY

The author analyses the morphological and biochemical characteristics of *Penicillium notatum* obtained from lyophilized spores maintained in a common refrigerator during 25 years. All the characteristics were the same, before and after lyophilization, including the capacity of producing penicillin. Lyophilization is recommended to preserve active inoculum for both production of penicillin and maintenance of type species of *Penicillium notatum*.

INTRODUÇÃO

Com o advento da penicilino-terapia, graças aos trabalhos iniciais de CHAIN *et alii*¹ e de ABRAHAM *et alii*¹, surgiram numerosos problemas de ordem técnica para a produção de penicilina, em larga escala por biossíntese, destacando-se, entre eles, o da manutenção de amostras de *Penicillium* com elevada capacidade penicilinógena.

Como ocorre com numerosos fungos, as culturas de *Penicillium notatum*, após repiques freqüentes, em meios artificiais de cultura, tendem facilmente a se degenerar, a ponto de perder parcial ou totalmente a capacidade de produzir penicilina. Era evidente a necessidade de se procurar um método seguro para a manutenção de culturas ativas.

No decurso de nossos estudos iniciais, em 1941, sobre a morfo-biologia do *Penicillium notatum*², observamos que o dessecação natural da cultura, em temperatura ambiente, não era processo seguro para a manutenção deste fungo; o mesmo ocorreu com esporos dessecados em estufa a 37°C³.

Nessa ocasião, FOSTER, WOODRUFF & MCDANIEL⁵ recomendavam, para a conservação do *P. notatum*, misturar esporos de cultura ativa com areia ou terra, em tubos, antes da secagem em baixa temperatura. Estes autores usavam esporos secos como material de semeadura para a produção de penicilina, por julgarem que, assim conservados, eles mantinham indefinidamente a capacidade de produzir esse antibiótico.

Tomando como base a secagem em baixa temperatura, começamos a usar, em 1945, o processo da liofilização para a manutenção de esporos de cultura de *Penicillium notatum*³.

No ano seguinte, THOM & RAPER⁷ fizeram referência a trabalho de Wickerham & Andreasen (1942) que haviam mantido, por um ano, leveduras liofilizadas.

Posteriormente, RAPER & THOM⁶ relataram estudos de Raper & Alexander (1945) que, utilizando culturas liofilizadas de *Penicillia*, observaram que elas conservavam

(1) Realizado no Instituto Adolfo Lutz (Secção de Micologia)
(2) Do Instituto Adolfo Lutz e do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

suas características morfológicas e culturais após cinco anos, parecendo ser preservadas também suas características bioquímicas. Verificaram, ainda, que as amostras produtoras de penicilina mantiveram esta capacidade inalterada por mais de dois anos.

Constitui o objetivo dêste trabalho o contrôle periódico, com intervalos longos de tempo, dos caracteres morfológicos e das propriedades bioquímicas, inclusive a de produzir penicilina, de culturas de *P. notatum*, obtidas a partir de esporos liofilizados, a fim de avaliar o método de liofilização para a manutenção dêste fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

Penicillium notatum

A cultura por nós utilizada foi enviada, em 1941, ao Instituto Adolfo Lutz pelo Dr. Charles Thom, do "United States Department of Agriculture", com a indicação 144-5767 do microrganismo de Fleming.

Método de liofilização

Para a liofilização, usamos, em sôro normal de cavalo, suspensões de esporos de cultura ativa de *P. notatum*. A técnica adotada foi a seguinte: distribuímos estêrilmente, em tubos (12x12mm), 0,5 ml de sôro normal de cavalo. A cada tubo transferimos uma alça de platina carregada de esporos de cultura de sete dias de *P. notatum*, desenvolvida em tubo inclinado de agar Sabouraud glicosado. As suspensões de esporos foram imediatamente congeladas, por refrigeração a -40°C, obtida com mistura de neve carbônica e álcool etílico e, em seguida, secadas a vácuo. Após a secagem, os tubos foram fechados a chama de bico de Bünsen e mantidos em refrigerador comum a $\pm 4^\circ\text{C}$.

Contrôle morfo-biológico

Feito em culturas de *P. notatum* obtidas a partir de esporos liofilizados, consistiu na observação dos seguintes caracteres e propriedades:

1. *Caracteres macroscópicos* — Aspecto, forma, tamanho, cor e produção de pigmento de colônia gigante, desenvolvida em meio

sólido de Czapek-Dox modificado³, após incubação a 25°C durante sete dias.

2. *Caracteres microscópicos* — Micélio vegetativo, apresentando hifas septadas com ramificações laterais e anastomoses (fusão de micélio). Com relação ao aparelho reprodutor, verificação da presença de conidióforos, dando origem sucessivamente, no sentido próximo-distal, a ramos, métulas e esterígmias, de onde se originam os esporos exógenos (conídios).

3. Propriedades bioquímicas

a) Testes de capacidade de produzir ácido, a partir de dextrose, sacarose, maltose e glicerol, no meio semi-sólido de Hiss. Incubação a 25°C e leituras diárias do segundo ao sétimo dia.

b) Prova de capacidade de produzir penicilina, no meio líquido de Czapek-Dox modificado, com altura de 2 cm em frasco de Fernbach. O inóculo consistiu em rica suspensão de esporos de *P. notatum*, obtida de cultivo de sete dias em tubo inclinado de agar Sabouraud glicosado. Incubação do frasco a 25°C. Pesquisa de produção de penicilina, na ocasião em que o meio atinge pH neutro, após a forte acidificação que ocorre nos primeiros dias de cultivo. Titulação pelo método das diluições seriadas em tubos, usando como germe de prova a conhecida amostra padrão de *Staphylococcus aureus* 209 P.

RESULTADOS

Os exames de contrôle dos caracteres macro e microscópicos e das propriedades bioquímicas das culturas de *P. notatum*, obtidas a partir de esporos liofilizados, foram feitas em três ocasiões diferentes: na primeira, 10 anos após a liofilização dos esporos, tendo sido apresentados os resultados, a convite do Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, na reunião de 23 de maio de 1959 do Simpósio sobre Micologia, da Sociedade de Biologia de São Paulo; na segunda (1962), 17 anos após a liofilização, relatamos os nossos achados em reunião da Sociedade de Microbiologia, de Ribeirão Preto, presidida pelo Prof. Dr. José Oliveira de Almeida. Nessas duas ocasiões, os resultados obtidos, inclu-

sive com relação à capacidade de produzir penicilina, foram iguais aos que havíamos observado antes da liofilização² e³. Finalmente, os resultados obtidos 25 anos após a liofilização, serão descritos, a seguir.

Exame macroscópico colônia discóide com 2 a 3 cm de diâmetro. Na face superior, de aspecto penujento, distinguem-se três zonas concêntricas; a central, de cor verde-escuro, abrangendo a maior parte da colônia, é saliente, pregueada, com sulcos dispostos como raios de circunferência, com filamentos aéreos longos e gotículas amarelas que não molham a colônia; a zona intermediária, de cor branco-esverdeada, com filamentos aéreos curtos e, finalmente, a zona periférica, com aspecto de franja, formada por delicados filamentos, de 2 a 3 mm de comprimento, aderentes ao meio. Face inferior da colônia, com aspecto de membrana, ondulada e de cor branco-amarelada.

A colônia produz pigmento amarelo que se difunde no meio de cultura.

Exame microscópico: Micélio vegetativo constituído por trama de hifas septadas que emitem ramificações laterais, com freqüentes anastomoses (fusão de micélio). A formação de esporos exógenos (conídios) se realiza através de aparelhos conidianos com forma de pincel ("penicillus"), constituídos por conidióforos que se dividem em ramos; êsses, por sua vez, em métulas sustentando esterígmias que dão origem aos esporos.

Provas bioquímicas: Provas da capacidade de produzir ácido, a partir de dextrose, sacarose, maltose e glicerol positivas, em leituras do segundo ao quarto dia de incubação. No quinto, viragem do indicador para a alcalinidade nos tubos de dextrose, sacarose e maltose, continuando acidificado somente o glicerol.

Prova de capacidade de produzir penicilina, pelo método das diluições seriadas em tubos: inibição total do crescimento do *Staphylococcus aureus* 209 P até a diluição de 1:40, e inibição parcial, até a diluição de 1:80.

DISCUSSÃO

Comparando-se os resultados, publicados anteriormente³, dos exames macroscópico e microscópico das culturas de *Penicillium notatum* com os observados neste trabalho, de culturas obtidas a partir de esporos liofilizados há 25 anos, verifica-se que êles são iguais. Não houve variação dos caracteres da colônia gigante, quanto ao crescimento, aspecto, forma, tamanho, cor e produção de pigmento, nem das estruturas microscópicas (micélio vegetativo e aparelhos conidianos).

A análise comparativa das atividades das culturas desse fungo, antes e após a liofilização, sobre a dextrose, sacarose, maltose e glicerol mostra igualdade de resultados, inclusive com relação às modificações do pH do meio.

Analisando-se os resultados das provas de produção de penicilina, pelo método das diluições seriadas em tubos, verifica-se que a cultura de *P. notatum*, após a liofilização, mantinha-se ativa, com título de inibição total de 1:40, superior ao de 1:20 obtido com a cultura antes da liofilização. Esta desigualdade de títulos pode ser explicada por diferença de sensibilidade dos germes de prova, considerando que, em nosso trabalho anterior², foi usada cepa diferente de *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que:

1. A liofilização é método seguro de manutenção de esporos de *Penicillium notatum*, conservando a capacidade de desenvolvimento de culturas com todos os seus caracteres morfológicos.
2. A liofilização é método recomendável para a manutenção de inóculo ativo para a produção de penicilina e para a conservação da espécie tipo *Penicillium notatum*.

RESUMO

Foram analisados os caracteres morfológicos das culturas de *Penicillium notatum*, obtidas a partir de esporos liofilizados e mantidos durante 25 anos em refrigerador comum. Comparando-se êstas observações com as encontradas antes da liofilização, verificou-se igualdade de resultados, inclusive com relação à capacidade de produzir penicilina. O autor considera a liofilização método recomendável para a conservação de inóculo ativo para a produção de penicilina e para a manutenção da espécie tipo de *Penicillium notatum*.

Agradecimentos — Aos Srs. Luiz Paulo Faraco e Januário José Delle Cave, pela valiosa colaboração na parte técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E.; FLETCHER, C. M.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A. — Further observations on penicillin, *Lancet* 2:177-88, ago., 1941.
2. ASHCAR, H. — Contribuição ao estudo morfológico do *Penicillium notatum*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 2:309-25, 1942.
3. ASHCAR, H. — Penicilina. Estudo geral e aplicação em terapêutica. Rev. Inst. Adolfo Lutz 5(1):31-262, 1945.
4. CHAIN, E.; FLOREY, H. W.; GARDNER, A. D.; HEATLEY, N. G.; JENNINGS, M. A.; ORR-EWING, J.; SANDERS, A. G. — Penicillin as chemotherapeutic agent, *Lancet* 2:226-8, 1940.
5. FOSTER, J. W.; WOODRUFF, H. B. & McDANIEL, L. E. — Microbiological aspects of Penicillin. III. Production of Penicillin in surface cultures of *Penicillium notatum*. *J. Bact.* 46(5):421-33, 1943.
6. RAPER, K. B. & THOM, C. — A manual of the Penicillia. Baltimore. Williams & Wilkins, 1949, p. 79-80.
7. THOM, C. & RAPER, K. B. — A manual of the *Aspergilli*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1945. p. 53.

Recebido para publicação em 20 de julho de 1970.