

ASPECTOS GENETICOS Y FISIOLÓGICOS

DE LA ANTIBIOSIS DE

Schizophyllum commune Fr.

Una tesis presentada

por

Alfredo Mauro Muñoz Rivas

para

La Facultad de Ciencias

en cumplimiento parcial de los requisitos

para el título de

Biólogo

Universidad Nacional Autónoma de México

México, D. F.

Diciembre de 1977

A mi madre y mis hermanas por el constante apoyo durante toda mi vida y su ayuda para obtener una formación científica.

A mi hermano y a mi padre.

A la Dra. Martha C. Terrazas M. por su inapreciable ayuda.

Al R. P. Octavio Vilches S. por su preocupación y ayuda en mi formación.

Muy especialmente dedico esta tesis a la memoria de mi Profesora la Dra. Celia Dubovoy Rudoy, científica eminente de gran calidad humana, cuyo ejemplo es digno de seguir por toda aquella persona que busque la perfección como ser humano.

A mis amigos, quienes de una u otra manera, me han ayudado durante mi carrera.

A todos los idealistas que trabajan por un mundo mejor,
un mundo justo.

three passions, simple but overwhelmingly strong,
have governed my life: the longing for love,
the search for knowledge, and unbearable pity
for the suffering of mankind

BERTRAND RUSSELL

Agradecimientos

Profundo es mi agradecimiento a todas las personas que contribuyeron directa e indirectamente en mi formación humana y científica y en la elaboración de la presente tesis.

Deseo expresar mi más profunda gratitud a mi Profesora la Dra. Celia Dubovoy Rudoy por su dirección en este trabajo y la formación que me legó en el campo de la genética de los hongos, y la ciencia en general.

Indudablemente agradezco la ayuda, revisión y valiosa crítica de esta tesis a los Dres. Teófilo Herrera S., Aurora Brunner L., Cora Salinas Ch., Ernesto Moreno M. y Guadalupe Vidal G.

Es incalculable la ayuda y estímulo que me han dado dos personas, para proseguir en este campo de investigación: El Dr. Teófilo Herrera S. y la M. en C. Cora Salinas Ch., con quienes siempre estaré en deuda.

Agradezco la ayuda del Biol. Rafael Villalobos M. durante el desarrollo de esta tesis.

Asimismo, agradezco a las Biol. Guadalupe Vidal G. y Catalina Tapia R., y al Sr. Bruno Acosta A. su ayuda durante mi estancia en el laboratorio de Micología.

40	Discusión
34	Resultados de la Antibiología de las Cepas Silvestres y de las Mutantes Establecidas
33	Resultados de la Inestabilidad
28	Influencia de los Factores Físicos y Químicos
26	Trabajos Previos en Hongos
26	Capítulo III: Fisiología de la Antibiología
22	Cálculos Estadísticos
22	Antibiología
22	Criterio de Cuantificación de la
22	Resumen del Proyecto de Trabajo
21	Obtención de Mutantes Productoras de Antibiótico frente a <u>Bacillus subtilis</u>
20	Antibiología de los Inoculones
18	Síntesis del Antibiótico
18	Inestabilidad del Antibiótico
18	Antibiología frente a <u>Bacillus subtilis</u>
17	Microorganismos
15	Antibiología frente a Diferentes
15	Medios de Cultivo
10	Cepas utilizadas
10	Capítulo II: Materiales y Métodos
1	Capítulo I: Introducción
14	Resumen
1	Agradecimientos

Capítulo IV: Genética de la Antibiosis	53
Estudios Previos en <u>Schizophyllum commune</u>	53
Mapeo de Gene(s) de Producción de Antibiótico(s) contra <u>B. subtilis</u>	53
Mapeo de Gene(s) de Antibiosis contra Diferentes Microorganismos	54
Herencia Citoplásmica	63
Resultados de la Interacción Complementaria (Cosíntesis) y de la Complementación en la Antibiosis	63
Interacción Complementaria	64
Complementación	76
Inducción de Mutantes <u>ant</u>	81
Discusión	81
Capítulo V: Papel de la Cafeína en la Antibiosis	96
Trabajos Previos	96
Cafeína como Suplemento en el Medio	97
Cafeína y/o UV como Mutágenos	97
Discusión	100
Discusión General	102
Bibliografía	105

Resumen

El hongo basiomiceto Schizonhyllum commune Fr. estudiado ampliamente en relación a la genética de los factores de compatibilidad, ofrece nuevas perspectivas en el campo de la producción de antibióticos; escasos han sido los registros de su acción inhibitoria contra otros microorganismos. Aquí se presenta la posibilidad de manipularlo genética y fisiológicamente, para aprovechar las cepas con genes ant (antibiosis) y obtener nuevas mutantes ant, además de inducir la variabilidad metabólica secundaria, con cambios en los factores ambientales (pH, temperatura y composición del medio de cultivo), para provocar la optimización en la producción del antibiótico.

Se encontraron dos tipos de codificación genética para la producción de antibióticos:

a) Una de tipo nuclear, en donde se pudieron localizar 3 genes ant (ant-1, ant-2 y ant-3).

b) Otros patrones de antibiosis probablemente de tipo citoplásmico, tal vez similares a los hallados en Streptomyces.

Se presentó el fenómeno de interacción complementaria (cosíntesis) en algunas cepas inactivas para la formación de la(s) substancia(s) antibiótica(s), a partir de los metabolitos secretados en el medio de cultivo, y coinhibición en algunas cepas activas.

Se discute el papel de la luz ultravioleta y la cafeína en la obtención y expresión de los genes ant.

Capítulo I: Introducción

En la presente tesis se hace un estudio genético y fisiológico de la producción de antibiótico(s), y su interrelación en diferentes condiciones físicas y químicas, en cepas silvestres y en mutantes establecidas de Schizophyllum commune Fr.

Schizophyllum commune Fr. es un hongo basidiomiceto cuya posición taxonómica es todavía discutida. Una de las asignaciones que se le ha dado en la clasificación de Alexopoulos (1962), es la siguiente:

Clase Basidiomycetes
Subclase Homobasidiomycetidae
Orden Polyporales
Familia Schizophyllaceae
Género Schizophyllum
Especie commune

El nombre del género Schizophyllum deriva de la escisión en dos lamelas, que presentan las láminas que sostienen al himenio en los cuerpos de fructificación.

Su ciclo de vida consiste de las siguientes fases (Raper, 1966; Raper y Hoffman, 1974): espora → micelio homocariótico haploide → micelio dicariótico → cuerpo de fructificación → basidios (en donde sucede la cariogamia y la meiosis) → espora. La formación del micelio dicariótico y toda la secuencia de la morfogénesis sexual, está determinada por dos factores de compatibilidad independientes; el factor A y el factor B, que a su vez están formados por dos subloci cada uno, A_{α} A_{β} y B_{α} B_{β} con alelos múltiples. Para que puedan ser compatibles es necesario que A y B sean diferentes

(A^{\neq} B^{\neq}) entre uno y otro homocarion, y así se establezca la migración nuclear de un micelio hacia el otro durante la cruceza.

Por lo tanto, la incompatibilidad en Schizophyllum es tetrapolar y está dada por dos pares de factores con alelos múltiples en cada serie. Tanto la fase haploide como la dicariótica son capaces de tener crecimiento indefinido.

Todo el ciclo de vida se puede reproducir en las condiciones del laboratorio, en un período aproximado de 10 a 14 días. Se han elaborado los medios de cultivo tanto Completos como mínimos, que hacen posible el uso de mutantes auxótrofos; por estos motivos, S. commune se ha convertido en un organismo de fácil manipulación en el laboratorio para estudios de genética, bioquímica y fisiología, principalmente.

Los trabajos llevados a cabo en Schizophyllum han estado dirigidos hacia el estudio de la genética de la sexualidad, y existen relativamente pocos registros de aspectos genéticos y fisiológicos sobre los procesos de regulación de otros sistemas metabólicos (Raper y Hoffman, 1974), como es el caso de la producción de antibióticos y algunos otros metabolitos.

Se sabe que los basidiomicetos en general y los moniliales, son los hongos con mayor proporción de producción de metabolitos secundarios (Turner, 1975). Algunos de estos metabolitos secundarios pueden tener propiedades tan diversas como la formación de un pigmento, un antibiótico, una hormona o una toxina (Mateles y Wogan, 1967; Turner, 1971; Smith y Berry, 1974).

El tema central a desarrollar en el presente trabajo se

refiere a la producción de metabolitos con propiedades antibióticas, desde el punto de vista genético y fisiológico.

Los antibióticos se han definido como productos biológicos que actúan en pequeñas cantidades inhibiendo el crecimiento de las bacterias u otros microorganismos (Sermonti, 1969; Herrera, comunicación personal), pero no existe una definición que satisfaga completamente el concepto real de su naturaleza.

Hay diferentes teorías acerca del sentido biológico de los antibióticos; algunos autores piensan que son sustancias que tienen un papel de armas de destrucción con las que la naturaleza ha dotado a algunos microorganismos, en su lucha por el substrato; o que son productos metabólicos tóxicos para el propio organismo que los elabora y que tienen que ser excretados por ser tóxicos cuando están dentro de la célula. Actualmente, la idea más aceptada, es que se trata de productos metabólicos de carácter secundario, que se han conservado durante la evolución bioquímica de los microorganismos, puesto que existe la evidencia de la similitud de la estructura química de los antibióticos, con los constituyentes celulares que se forman por actividad del metabolismo primario (Sermonti, 1969; Turner, 1971, 1975; Bu'Lock, 1975). Se entiende por metabolismo primario aquel que es necesario para la sobrevivencia del organismo; metabolismo secundario, aquel que no implica un papel determinante para la supervivencia; y metabolismo intermedio, a los procesos metabólicos que se llevan a cabo entre un metabolito inicial y uno final de alguna vía metabólica.

La producción de antibióticos, de ninguna manera establece una secuencia evolutiva per se, puesto que la diversidad en la naturaleza química de los compuestos reconocidos como antibióticos es muy amplia, siendo igualmente probable que se encuentren constituidos por azúcares aminados, péptidos, ácidos orgánicos, etc. (Gottlieb y Shaw, 1967; Turner, 1971; Mitsuhashi, 1975), y por lo tanto, su modo de acción es diferente y muy específico, en cada uno de ellos (esto se encuentra extensamente explicado en algunas referencias, ej. Gottlieb y Shaw, 1967; Mitsuhashi, 1975). Esto apoya la idea de que sean el producto de la biosíntesis de las diferentes vías metabólicas secundarias.

Es necesario hacer notar que por lo general, la biosíntesis de estos compuestos antibióticos, se detecta en condiciones de laboratorio y no directamente en el sustrato natural, puesto que la mayoría de los organismos productores forman parte de la microflora de los suelos. Por lo tanto es difícil extrapolar los resultados obtenidos, cuando el microorganismo se encuentra aislado en las condiciones del laboratorio, a las condiciones y comportamiento del mismo microorganismo, en un sistema ecológico natural.

Con el descubrimiento de la penicilina, el estudio de los antibióticos y de los microorganismos que los producen se inició formalmente, con el fin de obtener y mejorar su producción, para satisfacer algunas necesidades en el campo de la medicina (Florey et al, 1949 I,II; Raper, 1952); de esta manera, se seleccionaron microorganismos que fueran capaces de poseer actividad inhibitoria sobre otros microorganismos, principalmente patógenos (Waksman et al, 1946; Florey et al,

1949 I,II; Raper, 1952; Backus y Stauffer, 1955).

En la serie de investigaciones efectuadas en la actualidad, se han encontrado principalmente hongos y bacterias con esta propiedad. Entre los hongos se han hallado (registrados hasta 1967) 150 antibióticos diferentes, y más de 600 corresponden a los producidos por organismos bacterianos, especialmente Actinomycetes (Turner, 1975).

Los estudios de los antibióticos producidos por hongos, se han llevado a cabo principalmente con Penicillium notatum y P. chrysogenum, debido a las aplicaciones médicas de la penicilina.

Los registros de producción de antibióticos en hongos, comprenden desde hongos inferiores, hasta los basidiomicetos (Florey et al, 1949 II; Broadbent, 1966). En Penicillium y Aspergillus se ha profundizado más en el área experimental; en el primero, haciendo uso de la parasexualidad y de la actividad de los mutágenos, para obtener cepas mejoradas en la producción de penicilina, y en el segundo, la presencia de una sexualidad verdadera con posibilidad de obtener segregantes meióticos, permitió también elevar la producción de penicilina con cepas mejoradas genéticamente (Raper, 1946, 1952; Johnson, 1946; Backus y Stauffer, 1955; Sermonti, 1959, 1969; Macdonald, 1964, 1973; Holt y Macdonald, 1968; Macdonald et al, 1973; Calam, 1973; Ball, 1973; Merrick, 1975 a,b; Merrick y Caten, 1975).

En los basidiomicetos, los trabajos de la producción de antibióticos, se habían limitado a estudiar los efectos inhibitorios de algunas sustancias provenientes de los carpofo-

ros, o de sus formas micelianas, que actuaban inhibiendo a los microorganismos de prueba (Robbins et al, 1946; Hervey, 1947; Locquin y Locquin, 1947 II, III; 1948 IV; Florey et al, 1949 I; Wilkins, 1954), sin prestar atención a los procesos celulares.

En las bacterias, igualmente, se han encontrado antibióticos variados, dependiendo del tipo de bacteria que los produzca (Florey et al, 1949 I, II; Raper, 1952; Gottlieb y Shaw, 1967). De éstas, los Streptomyces son los más prometedores en la investigación, debido a la facilidad de manejo genético y otras cualidades que los convierten en los productores de varios antibióticos de amplio espectro de inhibición (Alkhanian et al, 1959; Sermonti, 1969), inclusive la formación de diferentes antibióticos en una misma cepa (Vanek et al, 1958; Wright y Hopwood, 1976 a, b.). Existen estudios de la genética de la antibiosis de las bacterias y los mecanismos bioquímicos que están involucrados en dichos procesos. Autores como Delić et al (1969) y Sermonti (1969), establecieron la relación del patrón de biosíntesis de un antibiótico producido por Streptomyces en mutantes inactivas (obtenidas por lesión con mutágenos. De esta manera ha sido posible establecer en Streptomyces patrones de complementación que además de presentar perspectivas en el estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos, para el mejoramiento de la productividad en la biosíntesis de los antibióticos, también han servido para esclarecer otros procesos genéticos, como la sexualidad en Streptomyces y la presencia de plásmidos y su mecanismo de acción dentro de la célula (Hopwood et al, 1973; Vi-

vian, 1973). De manera similar se han estudiado los procesos biosintéticos de la penicilina en mutantes inactivos, con el fin de conocer sus patrones genéticos y bioquímicos (Sermonti, 1969).

La acción que tienen los mutágenos, ya sean físicos o químicos, en la inducción de mutantes ant (mutantes con genes para producir antibióticos), está poco clara, debido a la dificultad para actuar en loci específicos en el genoma (Fincham y Day, 1965; Sermonti, 1969; Petit y Prevost, 1972), por lo tanto, es imposible actualmente recomendar algún tipo de mutágeno, para obtener más y mejores cepas ant; hasta que los conocimientos de la respuesta genética a los estímulos de los mutágenos físicos y químicos se conozcan con mayor detalle; sin embargo, son valiosas herramientas en el mejoramiento de cepas ant, o en su inducción a partir de cepas silvestres.

Los antibióticos pueden estar codificados genéticamente en el núcleo, o en el cromosoma en el caso de las bacterias; o en el citoplasma, y de ahí se desprende el interés por su regulación genética (Macdonald, 1973; Kirby et al, 1975; Akagawa et al, 1975).

La formación de heterocariones y de diploides entre las cepas de Streptomyces y hongos productores de antibióticos lleva consigo el estudio y desarrollo de la optimización de las condiciones genéticas y fisiológicas para el aumento en productividad; de tal manera que se puedan construir cepas homocigas para el carácter ant (Alikhanian, et al, 1959; Sermonti, 1959; 1969; Macdonald, 1964; 1973; Holt y Macdonald, 1968), por medio de la manipulación de los mecanismos gené-

ticos.

Las condiciones de cultivo, tanto la composición química del medio, como el ambiente físico y biológico en el que se encuentran los organismos, no ha sido tan ampliamente investigado como el aspecto genético, por lo que hay escasos registros sobre estos temas; y no se toma en cuenta por lo general el papel que juegan la composición y las condiciones ambientales en la expresión genética celular, que es sumamente importante (Cochrane, 1958; Smith y Berry, 1974; Berry, 1975; Bull y Bushell, 1976; Clutiola, 1976).

El primer trabajo genético de la producción de antibióticos en los basidiomicetos, que incluía a los procesos meióticos, fue desarrollado por Parag y Parag (1974), utilizando cepas isogénicas de Schizophyllum commune, para obtener mutantes ant con acción contra Bacillus subtilis y Sarcina sp., e inductores de placas líticas (plc) en B. subtilis, usando luz ultravioleta (UV) como mutágeno.

Los resultados de dicha investigación, fueron los siguientes:

a) La expresión del gene ant fue óptima a 32°C, produciéndose a esta temperatura la mayor cantidad de antibiótico en el hongo.

b) El gene ant fue nuclear, mapeó fuera del grupo de eslabonamiento del factor de incompatibilidad B, y fue de naturaleza recesiva, ya que se inhibía en heterocariosis.

c) Los genes inductores de placas líticas sobre B. subtilis (plc-1, plc-2), se localizaron desligados del gene ant.

d) Se caracterizó parcialmente al antibiótico y se encontró que se trataba de una sustancia de bajo peso molecular, por ser volátil y difusible a través de una membrana semipermeable.

Capítulo II: Materiales y Métodos

Las cepas originales de Schizophyllum commune usadas para el desarrollo de este trabajo, fueron amablemente donadas por la Dra. C.A. Raper a la Dra. Celia Dubovoy.

Cepas Utilizadas

Los 38 tipos de cepas de S. commune, comprendían homocariaciones silvestres y mutantes establecidos, de diferente constitución genética, como se observa en las tablas 1 y 2, en donde se presentan la numeración de las cepas como se manejan en este trabajo, el número original de las cepas, el genotipo y los mutágenos con los que fueron obtenidas.

En la tabla 2 se presentan con mayor detalle las dosis de mutágenos, con las que fueron obtenidos los genes supresores en las cepas 8-10 y 8-11. Estos mutantes fueron obtenidos durante el desarrollo de otro trabajo sobre mutagénesis en Schizophyllum (Dubovoy y Muñoz, en preparación).

Para probar la acción antibiótica se utilizaron 18 diferentes tipos de microorganismos (17 bacterias y una levadura), que fueron donados por el Dr. S. Calderón y el Dr. Ch. Thomas, y cuyas características se dan en la tabla 3.

Tabla 1. Caracteres de las cepas de S. commune utilizadas en las pruebas de antibiosis.

Número de la cepa para este trabajo.	Número original de la cepa.	Factores de compatibilidad.	Genotipo Marcadores.	Mutágeno que las originó.
1	1-42	$A\alpha_4-\beta_6$ $B\alpha_1-\beta_1$	+	
2	1-60	$A\alpha_1-\beta_5$ $B\alpha_3-\beta_6$	+	
3	1-86	$A\alpha_2-\beta_{23}$ $B\alpha_4-\beta_{1?}$	+	
4	3-2	$A\alpha_4-\beta_6$ $B\alpha_2-\beta_1$	+	
5	4-13	$A\alpha_1-\beta_1$ $B\alpha_1-\beta_2$	MIV-11	?
6	4-14	$A\alpha_1-\beta_1(1)$ $B\alpha_3-\beta_2$	pab	?
7	7-5	$A\alpha_3-\beta_5$ $B\alpha_3-\beta_1$	MIX-16 dik ⁻ ura-2	Rayos X
8	7-13	$A\alpha_2-\beta_2$ $B\alpha_6-\beta_3$	MIX-24 nic-1	Rayos X
9	8-2	$A\alpha_3-\beta_5$ $B\alpha_3-\beta_6$	ade-4	Ultravioleta ?
10	8-6	A_{11} B_{11}	arg-6	Ultravioleta ?
11	8-7	$A\alpha_3-\beta_5$ $B\alpha_3-\beta_2$	arg-7	Ultravioleta ?
12	8-8	$A\alpha_3-\beta_5$ $B\alpha_2-\beta_2$	ino	?
13	8-10	$A\alpha_1-\beta_1$ $B\alpha_7-\beta_4$	nic-3	Ultravioleta ?

Continuación de la tabla 1

14	8-11	$A_{\alpha_3-\beta_5}$	$B_{\alpha_3-\beta_2}$	nic-4	Ultravioleta ?
15	8-17	$A_{\alpha_1-\beta_1}$	$B_{\alpha_3-\beta_2}$	δ	Ultravioleta ?
		$A_{\alpha_4-\beta_6}$	$B_{\alpha_1-\beta_1}$	bio	
16	8-20	$A_{\alpha_3-\beta_1}$	$B_{\alpha_3-\beta_2}$	δ	Etil-metano
		$A_{\alpha_4-\beta_6}$	$B_{\alpha_1-\beta_1}$	pan	Sulfonato
17	8-26	$A_{\alpha_2-\beta_7}$	$B_{\alpha_2-\beta_2}$	ade-7	Etil-metano
					Sulfonato
18	8-28	$A_{\alpha_3-\beta_1}$	$B_{\alpha_3-\beta_2}$	lis	Ultravioleta ?
19	9-4	$A_{\alpha_3-\beta_5}$	$B_{\alpha_2-\beta_2}$	dom-2	Ultravioleta
20	9-6	A_9	B_{10}	blue	Ultravioleta
21	9-7	$A_{\alpha_4-\beta_6}$	B_2	fir	?
22	9-8	A_2	B_1	puff	?
23	9-10	$A_{\alpha_4-\beta_1}$	$B_{\alpha_3-\beta_2}$	compact-1	?

Nota: Las abreviaturas usadas para los marcadores son: MIV, modificador IV; gab, ácido para-aminobenzoico; MIX, modificador IX; dik⁻, dicariosis⁻; ura, uracilo; nic, ácido nicotínico; ade, adenina; arg, arginina; ino, inositol; bio, biotina; pan, ácido pantoténico; lis, lisina; dom, cúpula; blue, azul; fir, abeto; puff, hinchado; compact, compacto. Ver Fincham y Day (1965), Raper (1966), Raper y Hoffman (1974) y Dubovoy (1973, 1976).

Tabla 2. Características de las cepas con genes supresores
(Dubovoy y Muñoz, en preparación.)

Número de la cepa para es- te trabajo.	Número original	Marcadores	Mutágenos	
			Cafeína mg/ml	Ultravioleta erg/mm ²
1a	8-11	<u>nic-4 sup-7</u>	0.5	3 000
2a	8-10	<u>nic-3 sup</u>	1.0	1 500
3a	8-10	<u>nic-3 sup-15</u>		2 500
4a	8-10	<u>nic-3 sup-12</u>		1 500
5a	8-11	<u>nic-4 sup</u>		1 500
6a	8-11	<u>nic-4 sup-3</u>		2 500
7a	8-11	<u>nic-4 sup-2</u>		2 000
8a	8-11	<u>nic-4 sup-4</u>		1 000
9a	8-11	<u>nic-4 sup-5</u>	0.5	1 000
10a	8-10	<u>nic-3 sup-14</u>		3 000
11a	8-11	<u>nic-4 sup-8</u>	0.5	1 500
12a	8-10	<u>nic-3¹¹ sup-13</u>		1 500
13a	8-11	<u>nic-4 sup</u>		3 500
14a	8-11	<u>nic-4 sup-6</u>	0.5	1 000
15a	8-10	<u>nic-3 sup-11</u>		1 500

Nota: Las cepas marcadas con el número original 8-10 u 8-11, poseen los siguientes factores de compatibilidad:

8-10 $\frac{A_{\alpha_1} - \beta_1}{B_{\alpha_7} - \beta_4}$

8-11 $\frac{A_{\alpha_3} - \beta_5}{B_{\alpha_3} - \beta_2}$

Tabla 3. Diferentes tipos de microorganismos de prueba usados.

<u>Microorganismo</u>	<u>Marcador</u>
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC6633	+
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	+
<u>Salmonella paratyphi-A</u>	+
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC6538	+
<u>Shigella dysenteriae</u>	+
<u>Escherichia coli</u> poli-B	+
<u>Sarcina lutea</u>	+
<u>Candida albicans</u>	+
<u>Pseudomonas</u> sp. (a)	+
<u>Pseudomonas</u> sp. (b)	+
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC13150	+
<u>Salmonella paratyphi-B</u>	+
<u>Salmonella enteritidis</u>	+
<u>Shigella sonnei</u>	+
<u>Salmonella typhi</u> Ty2	+
<u>Escherichia coli</u> SF2124	<u>col</u> ⁺ (producción de colicinas)
<u>Escherichia coli</u> PMB9	<u>tetr</u> ⁺ (resistencia a tetraciclina)
<u>Escherichia coli</u> PM121	<u>ban</u> ⁺ (resistencia a bano- micina)

Medios de Cultivo

Los medios en donde se sembró Schizophyllum fueron los siguientes: Medio Completo (MC), Medio Mínimo (MM), Medio Mínimo + requerimientos (MM+___); con pH de 5.0 y de 7.0..

Medio Mínimo + 1.0 y 0.5 mg/ml de cafeína, y Medio Mínimo + requerimientos, con las mismas concentraciones de cafeína.

Medio Completo y Medio Mínimo + 0.01 y 0.05 M de CuSO_4 .

La siembra de los organismos de prueba (bacterias y levadura), se efectuó en Agar Nutritivo DIFCO y en Medio 5 para Antibióticos DIFCO.

La constitución del Medio Completo fue de: 20 g. de glucosa, 2 g. de extracto de levadura, 2g. de peptona, 0.5 g. de MgSO_4 , amortiguador de fosfatos 0.1 M (0.46 g. de KH_2PO_4 y 1.0 g. de K_2HPO_4 , para proporcionar un pH de 7.0) y 20 g. de agar en 1 000 ml. de agua destilada. En el caso del Medio Completo líquido, no se adicionó el agar.

El Medio Mínimo estuvo formado por: 20 g. de glucosa, 2 g. de asparagina, 0.5 g. de MgSO_4 , 120 ug. de tiamina y con la misma concentración de amortiguador y de agar, por litro de agua destilada.

Para los mutantes auxotróficos, fue necesario suministrar los requerimientos en el Medio Mínimo, a las concentraciones dadas a continuación:

Acido nicotínico (niacina)	9.2 mg. por litro
Acido pantoténico	4.8 mg. por litro
Acido para-aminobenzoico	1.4 mg. por litro
Adenina	17.2 mg. por litro

Arginina	210.0 mg. por litro
Biotina	2.5 mg. por litro
Inositol	1.8 mg. por litro
Lisina	183.0 mg. por litro
Uracilo	11.2 mg. por litro

Con el fin de obtener un cambio en el pH de 7.0 a 5.0 sin introducir nuevos compuestos químicos en el medio de cultivo, se alteraron las concentraciones de los fosfatos para provocar una disminución hasta $\text{pH } 5.0 \pm 0.1$, por lo tanto, los medios (MC y MM con o sin requerimientos) quedaron con las concentraciones de fosfatos siguientes:

Medio Completo	14.0 g. de KH_2PO_4 por litro
Medio Mínimo	17.6 g. de KH_2PO_4 y 0.3 g. de K_2HPO_4 por litro

El pH fue ajustado antes de la esterilización.

Cuando se usó cafeína, se agregó al medio antes de esterilizar en la concentración ya mencionada. De la misma manera se preparó el medio con CuSO_4 , a la concentración de esta sustancia indicada anteriormente.

Para la siembra de los organismos de prueba se utilizaron:

a) Agar Nutritivo, cuyos constituyentes son: 3 g. de extracto de carne, 5 g. de peptona, 15 g. de agar para una cantidad de 1 000 ml. de agua destilada, con un pH final de 6.8 .

b) Medio 5 para Antibióticos formado por: 1.5 g. de extracto de carne, 3 g. de extracto de levadura, 6 g. de peptona y 15 g. de agar, para 1 000 ml. de agua destilada, con un pH final de 7.9 .

Antibiosis frente a Diferentes Microorganismos

Se sembró un inóculo central de Schizophyllum, en la caja de petri, que se incubó a 30°C por 72 horas; una vez que el hongo se desarrolló, se procedió a agregar el Agar Nutritivo en forma de una capa fina (ca. 4 ml.), que cubrió todo el resto del agar en la caja de petri, alrededor del hongo. Se hizo una suspensión de organismos por separado, en tubos de ensayo que contenían ca. 10 ml. de agua destilada estéril y se sembraron en forma radial (modificación de Herrera y Ulloa, 1975), utilizando hisopos para su siembra. El Agar Nutritivo se utilizó con el fin de proporcionar los requerimientos necesarios para el crecimiento de los organismos de prueba; los microorganismos se sembraron como se muestra en la figura 1, e inmediatamente se llevaron a la incubadora, a 37°C por un período de 24 horas. En todas las pruebas se hicieron simultáneamente las cajas control adecuadas. Como en todas las demás pruebas de antibiosis de este trabajo.

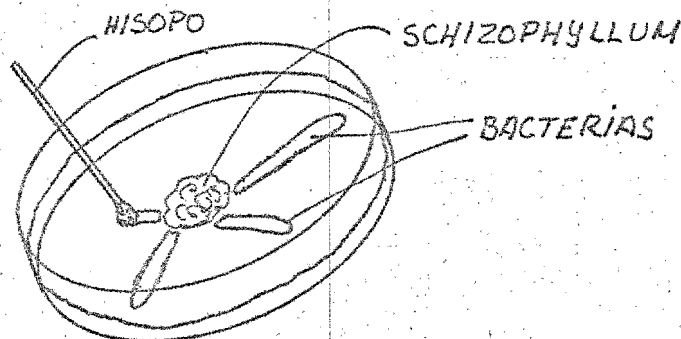


Figura 1. Técnica de sembrado de los diferentes microorganismos frente a Schizophyllum, en la caja de petri.

Antibiosis frente a Bacillus subtilis

Se efectuó por el método de infusión (Grove y Randall, 1955), modificado (Salinas, comunicación personal) de la siguiente manera:

Se hizo una suspensión de B. subtilis en 10 ml. de agua destilada estéril, de la cual se tomó 1.0 ml., que se agregó a 250 ml. de Medio 5 para Antibióticos (salvo una excepción, cuando se usó Agar Nutritivo), a una temperatura de 45°C, se resuspendió el bacilo y se vaciaron ca. 4ml. de medio sobre la placa de agar que contenía la colonia central del hongo, cuidando que lo rodeara perfectamente y formara una capa fina. En este caso, Schizophyllum se incubó a 26, 30 y 32°C, por períodos de 72 ó 96 horas antes de probar su antibiosis. Una vez sembrado el bacilo, las cajas de petri fueron colocadas en la incubadora a 26, 32 y 37°C por 24 ó 72 horas.

Difusibilidad del antibiótico

Para las pruebas de difusión del antibiótico, se colocó una membrana permeable de celofán Dupont # 150 P.D. 62 (uncoated film with slip agent dupont N° CNC 249541) sobre el micelio directamente, y sobre ella se colocó una gota de la suspensión de B. subtilis en Medio 5 para Antibióticos, preparada en la forma ya mencionada (procedimiento anterior). Esta metodología fue desarrollada a pH de 5.0 y de 7.0, a una temperatura de 30°C para el crecimiento fúngico durante 72 hrs. y a 37°C inmediatamente después de sembrar el bacilo.

Cosíntesis del Antibiótico

Se hizo una modificación del método empleado por Sermonetti (1969) y Deliá et al (1969); quedando de la siguiente ma-

nera:

Schizophyllum fue sembrado en MC y MM o MM+req, incubándose por 10 días a 30°C con el fin de que se alcanzara una superficie suficiente de micelio en la placa de agar de la caja de petri, para obtener bastantes botones para desarrollar estas pruebas (botones = inóculos regulares de dimensiones de ca. 0.75 cm. de diámetro, cortados con un sacabocados). A causa del crecimiento compacto de la cepa 23 (9-10), fue descartada.

Una vez cortado el hongo, se procedió a estructurar todas las posibles combinaciones de la siguiente forma:

Se tomaron los botones por parejas (cada uno de diferente cepa), y se fueron colocando a una distancia de ca. 0.5 cm., sobre la placa del medio de cultivo correspondiente, hasta reunir todas las posibles combinaciones; o sea, por ejemplo: un botón de la cepa 1 se colocaba a 0.5 cm. de la cepa 2, la 3 ó de la 4, etc. sobre la nueva placa de medio de cultivo, hasta que se probara con todas las cepas seleccionadas.

Los botones provenientes de Medio Completo se pasaron a placas de Medio Completo.

Para la cosíntesis en Medio Mínimo se sembraron los inóculos del hongo en este medio, al cual se le había adicionado el requerimiento necesario indicado para cada cepa y se cortaron los botones para colocarlos en la nueva placa de agar, que contenía MM+ todos los requerimientos de las cepas usadas, o sea que el medio contenía cualquier requerimiento que necesitaran los mutantes auxotróficos, eliminando la presencia

de compuestos ricos en material orgánico elaborado, como lo son la peptona y el extracto de levadura en el medio. Por lo tanto, los botones provenientes de MC, se pasaron a placas de Medio Completo y los de cada Medio Mínimo (con o sin determinado requerimiento), se colocaron en MM+ todos los requerimientos juntos, con el fin de poder usar un tipo de placa de agar de MM, uniforme para todas las mutantes y silvestres.

Una vez colocadas las parejas de botones en el nuevo medio, se sometieron a refrigeración (4°C) por 24 hrs., con el fin de provocar la difusión de los metabolitos, provenientes de los diferentes botones, en la placa de agar, sin permitir el crecimiento miceliario que pudiera provocar dicariosis al fusionarse las hifas de los homocarios compatibles.

Después se procedió a vaciar la suspensión de B. subtilis en infusión en Medio 5, en capa fina para que rodeara perfectamente los botones (3 parejas de botones por placa de agar en cada caja de petri), e inmediatamente se incubó a 37°C por 24 hrs. Estas pruebas se desarrollaron a pH 5.0 y 7.0 .

Antibiosis de los Dicarioses

Se entrecruzaron las cepas en todas las posibles combinaciones, determinadas por los factores de compatibilidad. Para diagnosticar la dicariosis se utilizó el criterio de formación de fíbulas o de fructificación a los tres o cuatro días de incubación a 30°C (Raper, 1966; Raper y Hoffman, 1974), seleccionando los dicarioses bien establecidos, de los cuales 20 (señalados con el sufijo b en la tabla) se probaron frente a diferentes microorganismos y el resto frente a B. subtilis.

lis para detectar el comportamiento del gene ant en heterocariosis. Para esta prueba se incubó a 30°C durante 72 hrs. el hongo solo, y por 24 hrs. a 37°C después de sembrar el o los organismos de prueba.

Obtención de Mutantes Productoras de Antibiótico frente a B. subtilis

Se puso a crecer la cepa 1 de Schizophyllum en matraces con 100 ml. de NC líquido, en agitación rotatoria constante, durante 4 días a 26°C; de ahí se hizo un macerado del hongo en licuadora. El concentrado dio una densidad óptica de 120 unidades Klett determinada en un colorímetro Klett-Summerson con filtro azul (rango espectral aproximado de 400 a 465 nm).

De este concentrado se tomaron 0.5 y 1.0 ml. que se agregaron a 5 ml. de agua destilada estéril por separado; las suspensiones se irradiaron con luz ultravioleta (con una lámpara ultravioleta germicida con emisión de 2537 Å, a 30 cm. de distancia, lo que daba una intensidad de 19 erg/mm²/seg., calculada con un dosímetro Latarget). Las suspensiones de fragmentos se sometieron a 500, 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000 y 3 500 erg/mm². Para las cuatro primeras dosis se tomaron las suspensiones de 0.5 ml. del concentrado en 5.0 ml. de agua, y para las tres últimas la concentración de 1.0 ml. del concentrado en la misma cantidad de agua debido al descenso en la supervivencia cuando se irradia a altas dosis.

El material irradiado se mezcló en Medio Mínimo, empleando un promedio de 20 cajas de petri por dosis (500 ml. de MM), con el fin de evitar la presencia de mutaciones auxotróficas.

Resumen del Proyecto de Trabajo

Para facilitar la comprensión de los procesos que se llevaron a cabo en la experimentación, se presenta la tabla 4, que contiene en forma resumida el proyecto que se desarrolló en este trabajo, en forma separada con una línea continua, los diferentes temas.

La línea punteada hace la separación entre los subtemas, o dos metodologías con pequeñas diferencias.

Criterio de Cuantificación de la Antibiosis

La nomenclatura adoptada fue la siguiente: + cuando hubo una inhibición del crecimiento del organismo de prueba, que fuera clara, formando un halo alrededor de la cepa productora del antibiótico. El signo \pm , en las ocasiones en las que se presentó una inhibición parcial, con la presencia de algunas colonias bacterianas resistentes en el campo del halo. El signo -, corresponde a la ausencia de inhibición del organismo de prueba.

Cálculos Estadísticos

Los cálculos estadísticos y pruebas utilizadas durante el mapeo de genes ant, estuvieron basados en las tablas de Arkin y Colton (1967).

Tabla 4. Proyecto de trabajo en forma resumida para el estudio de la producción de los antibióticos por Schizophyllum commune Fr.

Influencia de la temperatura en los mutantes establecidos y del sustrato bacteriano, para la producción de antibiótico.

en MC T= 26, 32 y 30---37°C
con B. subtilis como organismo de prueba

7 Difusibilidad del antibiótico producido por los silvestres y mutantes establecidos, bajo diferentes condiciones fisiológicas.

con membrana artificial en las cepas establecidas (mutantes y silvestres) pH= 5.0 en MC y MM
7.0
T= 30---37°C con B. subtilis como organismo de prueba

Prueba para producción de antibiótico de las cepas establecidas (silvestres y mutantes), bajo diferentes condiciones fisiológicas.

pH= 5.0 T= 30---37°C en MC y MM
7.0
con diferentes microorganismos de prueba

CS Segregación del gene ant probado contra B. subtilis

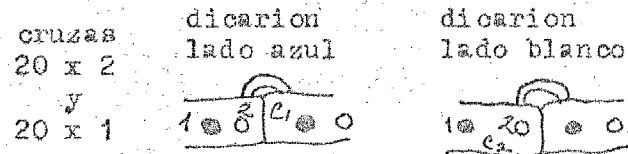
segregantes de 20 x 2 en MC pH= 7.0

Segregación del(los) gene(s) ant probado contra diferentes microorganismos, con el fin de mapearlo(s).

segregantes de 20 x 2 y 20 x 1 en MC y MM pH= 7.0
T= 30---37°C

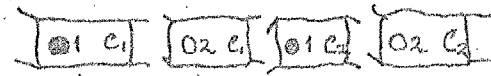
Continuación de la tabla 4

Herencia citoplásmica, usando CuSO_4 .



probar dicariones para antibiosis

desdicarionizar con CuSO_4 en MC y MM



HC	+	+	-	-
HN	+	-	+	-

} núcleos azul y blanco
 C= citoplasma de los homocariones.
 HC= herencia citoplásmica
 HN= herencia nuclear

Interacción complementaria y complementación para la formación del antibiótico.

interacción complementaria (cosíntesis) pH= 5.0 en MC y MM
 pH= 7.0
 T= 30---37°C con B. subtilis como organismo de prueba

complementación formación de dicariones para provocar la complementación genética pH= 5.0
 pH= 7.0 en MC y MM
 T= 30---37°C con B. subtilis como organismo de prueba
 T= 30---37°C con diferentes microorganismos de prueba

Continuación de la tabla 4.

Inducción de mutantes ant nucleares y/o citoplásmicos, a partir de una cepa silvestre sin antibiótico.

usando UV como mutágeno. pH= 7.0 en MM
T= 30---37°C
con B. subtilis como organismo de prueba

Influencia de la cafeína en los silvestres y mutantes establecidos

usando concentraciones de cafeína de 1.0 y 0.5 mg/ml pH= 7.0 en MM
T= 30---37°C
con B. subtilis como organismo de prueba.

Influencia de la cafeína y/o UV como mutágenos, en la producción de antibiótico.

con cepas de Schizophyllum generadas en este laboratorio, usando diferentes concentraciones de cafeína y/o dosis de UV. pH= 7.0 en MC y MM
T= 30---37°C
con diferentes microorganismos de prueba.

Capítulo. III: Fisiología de la Antibiosis

Trabajos Previos en Hongos.

El punto de vista puramente fisiológico de la producción de los antibióticos en los hongos, ha quedado relegado a un segundo término, ya que los microorganismos poseen una variabilidad extraordinaria (Sermonti, 1969; Frobisher et al., 1974), que ha hecho que se busque más bien el establecimiento de cepas mutantes o recombinantes (Sermonti, 1969; Macdonald, 1973); o en su defecto, se han buscado nuevos tipos de metabolitos fúngicos que tengan propiedades inhibitorias, que se produzcan en los hongos silvestres, y que se pueda expresar su antibiosis en medios de cultivo convencionales, esto en el caso de que se logren cultivar los hongos en el laboratorio (ver trabajos de Hervey, 1947; Florey et al., 1949 I,II; Wilkins, 1954; Backus y Stauffer, 1955).

Los registros de la búsqueda y utilización de las condiciones ambientales físicas y químicas óptimas en los cultivos pertenecen propiamente a los inicios de la investigación de los antibióticos, de manera formal (Johnson, 1946; Robbins et al., 1946; Waksman et al., 1946; Raper, 1946; 1952; Florey et al., 1949 I,II; Savage, 1949; Pittenger y Mc Coy, 1953; Backus y Stauffer, 1955), cuando las presiones sociales propiciaron el estudio unidireccional hacia cierto tipo de antibióticos de importancia médica (penicilina y estreptomocina). Una vez que se introdujeron estas condiciones relativamente óptimas, se estimuló el estudio de la genética, con mayor énfasis. Pero no se ha establecido claramente hasta la fecha la influencia de los factores ambientales en la producción

mejorada de este tipo de biomoléculas, en la gran mayoría de los hongos que las producen, principalmente los basidiomicetos, que son extremadamente variables en su fisiología (Turner, 1971).

Por lo mismo, los estudios hechos en la fisiología de la antibiosis han sido escasos y se han desarrollado principalmente en Penicillium, Aspergillus (Raper, 1946; 1952; Florey et al, 1949 I,II; Cochrane, 1958; Caten, 1973) y algunos aspectos vagos en basidiomicetos (Turner, 1975).

En un principio se probó a S. commune para antibiosis con extractos del cuerpo fructífero, y sembrando el micelio en la placa de agar directamente, registrándose como negativo en ambas pruebas (Florey et al, 1949 I). Después (aunque la publicación fue anterior), se detectó la formación de antibiótico contra E. coli y S. aureus, cuando las cepas eran sembradas en un medio peptonado, no así cuando se cambiaba el medio al de licor de maíz (Hervey, 1947). Esta fue la primera manifestación de la influencia de los nutrimentos del medio de cultivo en la antibiosis.

Por último Parag y Parag (1974) encontraron que la temperatura óptima para la expresión de la antibiosis de S. commune frente a B. subtilis y Sarcina sp. correspondía a 32°C. Este antibiótico se diagnosticó como un metabolito de bajo peso molecular por ser volátil y que era capaz de pasar a través de una membrana semipermeable. A este antibiótico se le llamó provisionalmente esquizofilina. Parag y Parag (1974) desarrollaron este trabajo por el método de Grove y Randall (1955) para medir la antibiosis, y empleando los medios de

cultivo convencionales para S. commune (MA y MC).

Por lo tanto se trata de comparar los resultados de Parag y Parag (1974) con los aquí obtenidos y ampliar el estudio sobre el papel de los factores físicos y químicos involucrados en la producción del (los) antibiótico(s) en Schizophyllum.

Influencia de los Factores Físicos y Químicos

Estas pruebas se llevaron a cabo en un tipo de medio (Medio Completo a pH 7.0) para el crecimiento fúngico, y dos diferentes medios (Medio 5 y Agar Nutritivo) para sembrar el organismo de prueba contra el que se probaron diferentes cepas silvestres y mutantes establecidos de S. commune.

La actividad antibiótica expresada a diferentes temperaturas y los períodos de exposición del bacilo con el hongo, se dan en la tabla 5, en donde se observa que existen diferencias fisiológicas determinadas por el cambio en la temperatura. En las dos temperaturas elegidas de 26 y 32°C se presentaron cambios de la actividad antibiótica de las cepas de Schizophyllum, encontrándose una mayor capacidad de antibiosis a 26°C, dada por el aumento en el número de cepas que dieron una respuesta positiva. A las 72 horas de exposición del bacilo, fue mayor la antibiosis que a las 24 horas; esto se debió posiblemente al aumento en la concentración del antibiótico secretado por el hongo durante períodos más largos, que permitieran alcanzar la concentración mínima inhibitoria para el bacilo y por otro lado el metabolismo bacteriano, que también fue afectado por la menor temperatura, provocando un cambio desfavorable que hiciera que las bacterias fueran más

Tabla 5. Variación de la capacidad antibiótica de las diferentes cepas de S. commune, bajo diferentes condiciones de temperatura y periodos de interacción con el organismo de prueba (B. subtilis en Medio 5), usando Medio Completo para Schizophyllum; a pH de 7.0 .

T= 32°C		T= 26°C	
Cepa	Antibiosis	Cepa	Antibiosis
1	-	1	-
2	-	2	-
3	-	3	-
4	-	4	+
5	-	5	-
6	-	6	+
7	-	7	-
8	-	8	+
9	-	9	+
10	-	10	+
11	-	11	+
12	-	12	+
13	-	13	-
14	-	14	-
15	-	15	+
16	-	16	-
17	-	17	-
18	-	18	+
19	-	19	+
20	+	20	+
21	+	21	+
22	+	22	+
23	+	23	+
Lectura	24 horas 72 horas	24 horas 72 horas	

Nota: el organismo de prueba se ensayó después de 96 hrs. de crecimiento del hongo, ambos a la misma temperatura.

sensibles al antibiótico, o la fase estacionaria en la que se encontraba el crecimiento del hongo (Turner, 1971; Smith y Berry, 1974). En el caso de la cepa 21 a la temperatura de 32°C, se observa que aparentemente pierde la capacidad de inhibir al bacilo pero este cambio se debió fundamentalmente al rápido crecimiento del micelio aéreo de la colonia fúngica, que entorpeció la medición de la antibiosis.

Se efectuaron mediciones del tamaño del halo de inhibición en relación a las dimensiones de la colonia del hongo, pero no se obtuvo ninguna relación bien definida; esto debido a que el crecimiento de la mayoría de las colonias del hongo eran de contorno irregular, en otras había micelio aéreo o en ocasiones ambas circunstancias.

Al finalizar los períodos de incubación a 26 y 32°C, se observó un mayor diámetro en general para los halos de inhibición en las cajas de petri incubadas a 26°C; este efecto fue debido a una mejor difusibilidad del antibiótico en la placa de agar a esa temperatura (Calderón, comunicación personal).

Debido a que en el experimento anterior los diámetros de algunas colonias de Schizophyllum alcanzaron dimensiones demasiado grandes que interfirieron con la cuantificación, se llevó a cabo el estudio de la antibiosis, tomando las temperaturas óptimas tanto para el crecimiento del hongo (30°C) (Raper, 1966; Raper y Hoffmann, 1974), como para el crecimiento de la bacteria de prueba (Krueger et al., 1973; Bergey, 1974; Frobisher et al., 1974), con el fin de delimitar las condiciones a las cuales se tomaría la lectura de la antibiosis. Por

Lo tanto en la tabla 6 se presentan los resultados del experimento usando las mismas cepas que en el anterior, pero con un periodo de incubación del hongo de 72 horas a 30°C, efectuando a continuación la siembra del organismo de prueba, y de nuevo incubación a 37°C por 24 horas (temperatura óptima para la mayoría de los microorganismos de prueba usados aquí (Krueger et al, 1973; Bergey, 1974; Frobisher et al, 1974).

La tabla 6 presenta los resultados obtenidos con las pruebas de optimización de la temperatura en un sustrato completo para el crecimiento fúngico (30°C en Medio Completo), y del microorganismo de prueba (37°C en Medio 5 o Agar Nutritivo). Al mismo tiempo comparándose la antibiosis cuando se usó diferente sustrato para el microorganismo de prueba. Los periodos de incubación para estos ensayos se fijaron a 72 horas para el crecimiento fúngico, y 24 horas para el bacilo a las temperaturas de 30 y 37°C respectivamente (30---37°C). Se observa en esta tabla 6 un incremento en la expresión de la antibiosis cuando se usa Agar Nutritivo como sustrato para el organismo de prueba. Se encontró una variación en el comportamiento de algunos mutantes en relación a los datos de la tabla 5 cuando se sembró el bacilo en Medio 5, y asimismo la variación se presentó cuando se usó Agar Nutritivo. En el caso de este último, se encontró que todos los mutantes con signo positivo también formaban parte del patrón seguido por los resultados del experimento anterior (tabla 5 a 26°C, a las 72 horas de exposición al bacilo).

La tabla 6 presenta un mayor número de respuestas positivas en Agar Nutritivo, a pesar de que en el Agar Nutritivo

Tabla 6. Resultados obtenidos de la difusión y acción del antibiótico en diferentes tipos de agar para el organismo de prueba, en mutantes y silvestres establecidos de *S. commune*, en Medio Completo, pH= 7.0 , T= 30---37°C , empleando *E. subtilis* como organismo de prueba.

Cepa	Medio 5	Agar Nutritivo
1	-	-
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	+	+
7	-	-
8	-	+
9	-	-
11	-	-
12	-	+
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	+	+
21	+	+
22	-	-
23	+	+

todavía no se ha alcanzado el nivel relativamente óptimo que se presentó a 26°C con período de exposición del organismo de prueba de 72 horas. La nueva combinación de temperaturas usadas para la incubación y la duración de la exposición del bacilo de prueba en relación a la expresión de la antibiosis da consecuentemente un cambio en la producción del antibiótico en algunos mutantes (ver tabla 5; T= 32°C con lectura a las 24 horas y tabla 6 en Medio 5). Pero también un aumento de la antibiosis cuando se usa Agar Nutritivo, indicando que se trata de un mejor medio para la detección de la antibiosis de S. commune, bajo las condiciones llevadas a cabo en este trabajo.

Al parecer la baja detección de la antibiosis en Agar Nutritivo (tabla 6) en comparación con la del Medio 5 a 26°C a las 72 horas de exposición (tabla 5) se debió principalmente a tres factores:

- a) Cambio en la constitución del medio y su pH.
- b) Menor tiempo de incubación e interacción con el organismo de prueba.
- y c) La combinación de temperaturas que se usaron para provocar la optimización del crecimiento fúngico y del organismo de prueba.

Resultados de Difusibilidad

Dado que se presentaron cambios en la producción del antibiótico contra B. subtilis cuando se utilizaron diferentes substratos para sembrar el organismo de prueba, se procedió a probar si el antibiótico era poco difusible en el agar y qué influencia tendrían los nutrimentos y el cambio en el pH

del medio. Por lo que se estudió su difusibilidad en estas circunstancias, utilizando una membrana artificial permeable al antibiótico. Los resultados se presentan en las tablas 7 y 8 en donde se aprecia un cambio considerable de la antibiosis en las cepas, tanto silvestres como mutantes establecidos en relación a las lecturas anteriores. Se observa que el antibiótico es producido en un número mayor de cepas cuando el pH es bajo, y es estimulado cuando se tiene un medio rico en nutrimentos orgánicos (tabla 8). A pH 5.0 la mayoría de las cepas aumentaron sus posibilidades de producción, dando un mayor número de respuestas positivas.

El pH de 5.0 no fue favorable para todas las cepas, como se observa con la cepa 3 que tuvo mejor rendimiento a pH neutro.

En forma general, el pH fue determinante para la producción del antibiótico contra B. subtilis, ya que el mayor número de respuestas positivas se encontró en los medios Completo y Mínimo a pH de 5.0. Por lo tanto, los resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores con otros microorganismos (Florey et al, 1949 I; Pittenger y Mc Coy, 1953).

Resultados de la Antibiosis de las Cepas Silvestres y de las Mutantes Establecidas

Estas pruebas se llevaron a cabo en KC y MM a pH de 5.0 y 7.0, para observar la actividad antibiótica contra una serie de microorganismos bacterianos gram⁺, gram⁻, de especies diferentes, especies relacionadas y subespecies, tanto patógenas como de vida libre, y una especie de levadura (Candida albicans).

Tabla 7. Resultados de la difusibilidad del antibiótico de S. commune, a través de una membrana de celofán, en diferentes cepas establecidas; usando B. subtilis como organismo de prueba. pH= 7.0 y T= 30---37° C. En Medio Completo y Medio Mínimo para S. commune.

Cepa	Medio Completo	Medio Mínimo
1	+	+
2	+	-
3	+	+
4	+	+
5	-	-
6	+	+
7	+	±
8	+	-
9	-	-
11	+	±
12	+	±
13	+	±
14	+	-
15	-	-
16	+	+
17	-	-
18	+	-
19	+	±
20	+	+
21	+	-
22	±	-
23	+	-

Tabla 8. Resultados de la difusibilidad del antibiótico de S. commune, a través de una membrana de celofán, en diferentes cepas establecidas; usando B. subtilis como organismo de prueba. pH= 5.0 , T= 30---37°C . En Medio Completo y Medio Mínimo para S. commune.

Cepa	Medio Completo	Medio Mínimo
1	+	+
2	+	-
3	±	-
4	+	±
5	+	±
6	+	±
7	+	+
8	+	±
9	+	±
11	+	±
12	+	+
13	+	±
14	+	+
15	+	±
16	+	±
17	±	±
18	+	+
19	+	±
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	-

En la tabla 9 se observa que las cepas de S. commune presentan un mayor espectro de antibiosis cuando se les suministran únicamente los requerimientos mínimos para su crecimiento, existiendo excepciones (por ejemplo la cepa 10).

Este espectro de antibiosis también varía de una cepa a otra en su capacidad de inhibir a los distintos microorganismos. La cepa 20 presentó el rango de inhibición más amplio, puesto que tuvo antibiosis contra los 18 microorganismos probados y la cepa 11, por el contrario, no inhibió a ninguno de ellos. En los microorganismos de prueba se encontró distinta sensibilidad en las distintas cepas, aún entre las bacterias de una misma especie (ver las distintas cepas de E. coli y S. aureus).

En la tabla 10 se observa que cuando se cambió el pH de 7.0 a 5.0, la mayor parte de las cepas de S. commune fueron incapaces de inhibir a los microorganismos que habían inhibido a pH 7.0 (tabla 9). A pH de 5.0 (tabla 10) la cepa 20 mantuvo un alto grado de antibiosis, aunque perdió la acción antibiótica contra dos cepas de E. coli y una especie de Salmonella (S. paratyphi-B). Por otro lado algunas cepas que producían antibiosis a pH 5.0 no lo hacían a pH neutro y viceversa, con excepción de la cepa 20, que se mantuvo más bien estable.

A pH ácido no fue posible obtener resultados para todos los microorganismos de prueba, debido a que unas cepas de bacterias se perdieron y otras no soportaron el pH bajo. En la tabla 10 se señala con asterisco la ausencia de crecimiento de la bacteria correspondiente en MM, cabe aclarar que en los

Tabla 10. Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de las cepas de S. commune, en Medio Completo y Medio Mínimo frente a diferentes microorganismos; pH= 5.0, T= 30--37°C

No. de la cepa	<u>S. subtilis</u>		<u>S. paratyphi-A</u>		<u>S. aureus 6538</u>		<u>Sh. dysenteriae</u>		<u>E. coli poli-B</u>		<u>C. albicans</u>		<u>S. aureus 13150</u>		<u>S. paratyphi-B</u>		<u>S. enteritidis</u>		<u>Sh. sonnei</u>		<u>S. typhi ty2</u>		<u>E. coli SF212A</u>		<u>E. coli PMB9</u>		<u>E. coli PM21</u>		
	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	CM	GM	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CM Medio Completo

* = Sin crecimiento en los controles (ver texto)

41
controles en MM no creció la bacteria, pero se tomó la lectura de las cajas restantes debido a que el hongo ayudó a desarrollarse a la bacteria (en las que aparece cualquier signo de antibiosis). En el caso de Candida albicans, se observó que se desarrolló mejor a pH de 5.0 que a pH de 7.0, y en algunas ocasiones la levadura fue capaz de interferir con el crecimiento de B. subtilis que se encontraba vecino; cuando el pH era neutro, el efecto entre ambos microorganismos fue el contrario.

Discusión

Los basidiomicetos tienen una naturaleza favorable para la producción de metabolitos secundarios (Turner, 1975). Esta propiedad está muy relacionada con las condiciones fisiológicas en las que se encuentren dichos organismos (Bu'Lock, 1975). Si se piensa que es posible establecer una manipulación en los mecanismos enzimáticos, que dependen directamente del estímulo del medio, es muy probable que exista la capacidad de regular ciertos factores como el tipo de nutrimentos en el medio, la acción de la temperatura, el pH, etc. (Cochrane, 1958; Smith y Berry, 1974; Berry, 1975; Bull y Bushell, 1976), para provocar la producción inmoderada de ciertos compuestos químicos que se deseen obtener en grandes cantidades, tanto por acumulación al bloquear unas vías metabólicas, o por el contrario, una síntesis de novo al suministrar moléculas precursoras que hagan factible la formación de nuevas vías para la biosíntesis deseada.

La biosíntesis de antibióticos en los microorganismos en general, y en particular los basidiomicetos, no parece estar

bien entendida, ya que la mayor parte de los autores recientes se han dirigido hacia la selección de cepas mejoradas genéticamente, olvidándose de la capacidad fisiológica para el mejoramiento de la producción de los antibióticos, a pesar de la existencia de bases bien establecidas sobre la alteración fisiológica de la producción de estas sustancias en hongos superiores (Florey et al, 1949 I;II), principalmente por las condiciones del medio de cultivo, que darían cambios en el metabolismo general celular, aún en cepas silvestres que serían capaces de sintetizar algunos antibióticos cuando se encuentren en las condiciones físicas químicas y biológicas adecuadas para ello.

No se trata de establecer aquí una separación entre los aspectos fisiológicos del metabolismo secundario y las características genotípicas de codificación para los sistemas enzimáticos que hacen posible la biosíntesis o degradación de los diferentes sustratos que interactúan en los sistemas intracelulares; sino que se intenta conocer el papel que juegan los factores ambientales en dicha regulación in toto.

Se sabe, que la producción de antibióticos está influida por la plasticidad fisiológica de los microorganismos, que es enorme (Berry, 1975); en los microorganismos productores se puede alterar por factores como el pH, constitución del medio, condiciones físicas y químicas del medio, tiempo de esterilización del medio de cultivo, concentración de O₂ y CO₂, etc. (Florey, et al, 1949 II; Savage, 1949; Pittenger y Mc Coy, 1953) sin contar con otra serie de factores que influyen en la capacidad básica de producción de antibióticos (Backus y Stauffer,

1955).

Por lo tanto se nota que muchos factores actúan en el mejoramiento fisiológico de la productividad de los antibióticos en los microorganismos, como lo mencionan Backus y Stauffer (1955) para Penicillium. El metabolismo secundario puede aumentar cuando el crecimiento disminuye o permanece estático (pero no necesariamente) y en este momento es la oportunidad para obtener con mayor facilidad los antibióticos (Calam, 1973; Berry, 1974). Sermonti (1969) menciona que la mayoría de los antibióticos se obtienen cuando las células productoras se encuentran en el período estacionario de su crecimiento, después de su fase logarítmica; este criterio está de acuerdo con los resultados aquí obtenidos que muestran mayor antibiosis cuando se siembra el hongo y se incuba por un número mayor de días. Como se dijo en los resultados, puede existir también la posibilidad de que la concentración mínima inhibitoria para el organismo de prueba no se alcance en un corto período de incubación del hongo y que el antibiótico, además, sea poco difusible en el agar.

Respecto a la difusibilidad, se ha observado que en ocasiones el antibiótico que sale de la célula, no es difusible a través de membranas de diálisis (Bradley y Jones, 1960); al parecer este no es el tipo de antibiótico(s) que tiene S. commune, como quedó demostrado en los resultados de difusión a través de la membrana, en donde el antibiótico pasó libremente a través de ella hasta llegar al bacilo de prueba, y su síntesis estaba estimulada por el Medio Completo para Schizophyllum y el pH ácido.

Es importante señalar que la biosíntesis de los antibióticos en los microorganismos es fuertemente dependiente de las condiciones de cultivo en la mayoría de los casos, de tal manera que la adición de diferentes sustancias traería consigo la estimulación, inhibición o modificación del antibiótico. (Florey et al, 1949 I,II; Cochrane, 1958; Smith y Berry, 1974; Johnston, 1975).

El efecto de las diferentes concentraciones de hidrogeniones puede ser interpretada en términos de sus efectos en el transporte de los nutrimentos, la solubilidad de los nutrimentos, las reacciones enzimáticas o fenómenos superficiales (Bull y Bushell, 1976) y no como un parámetro unitario con efectos determinados estrictamente (Cochrane, 1958). En los hongos la respuesta al pH puede diferir de acuerdo a su concentración; así que puede tener efecto en la cinética enzimática cuando el pH es bajo, o afectar la solubilidad de los metales en pHs altos, pero al parecer, el efecto más directo del pH externo está en la permeabilidad y otros fenómenos superficiales celulares (Cochrane, 1958).

La célula siempre mantiene un pH diferente en su citoplasma, en relación al medio externo (Berry, 1975), y tal vez en esto radique la mayor parte de su equilibrio metabólico, que permita manejar las concentraciones iónicas para su supervivencia. Los sistemas vivos poseen diferentes pHs óptimos para sus funciones; en el caso de los hongos filamentosos parece haber una tendencia hacia los medios ácidos, por lo que se facilitaría más la producción de metabolitos ácidos (Florey et al, 1949 II) o serían más funcionales estos metabolitos en

los medios ácidos. Por lo tanto, un antibiótico que sea de tipo ácido, puede ser más fácilmente sintetizado por el hongo y a su vez más funcional como sustancia antagónica (Florey et al, 1949 II) si el medio de cultivo también es bajo en su pH; los resultados de los patrones seguidos en la antibiosis por Schizophyllum (tablas 9 y 10 para B. subtilis) no se comportan de esta manera, ya que la producción de antibiótico(s) decayó en el pH 5.0, no así cuando se vio la difusión a través de la membrana, en donde fue mayor la antibiosis en el pH 5.0, lo que hace sospechar más bien de una mala o nula difusión del (los) antibiótico(s) en la placa de agar.

Los efectos de la temperatura son amplios y están correlacionados con otros factores; por ejemplo, en un medio en donde la temperatura es elevada, la concentración de O₂ es menor que en una temperatura baja; de manera similar, los requerimientos nutricionales y el pH favorables para el crecimiento, también se ven influenciados por la temperatura. La inducción o la represión en la biosíntesis celular se altera también por efecto de la temperatura; como ejemplo, se tiene la dependencia de ciertos aminoácidos o vitaminas, que los hongos tienen después de haber perdido la capacidad de sintetizarlos cuando se lleva a cabo la elevación de la temperatura (Bull y Bushell, 1976).

Berry (1975) propone que la tasa de crecimiento máximo se alcanza cuando se restringe la tasa de crecimiento por las características inherentes del propio organismo más que por la disponibilidad de los nutrientes, y debido a las condiciones de crecimiento de los hongos filamentosos, se puede consi-

derar para ellos un tipo de crecimiento exponencial (Righelato, 1975). Bu'Lock (1975) menciona que el metabolismo secundario y el crecimiento no son actividades incompatibles, aunque se presentan frecuentemente como alternativas complementarias en el ciclo de crecimiento.

El metabolismo y el crecimiento pasar por distintas fases (Turner, 1971): Inicialmente en la "trofofase" el organismo crece de una manera exponencial, con captación de los nutrientes esenciales a una velocidad constante, en esta fase raramente hay síntesis de metabolitos secundarios y se termina con el agotamiento de uno de los nutrientes del medio, que puede ser nitrógeno o fósforo e inmediatamente la replicación celular se detiene, cambia el metabolismo y empieza la síntesis de metabolitos secundarios, en este momento se dice que empieza la "idiofase", o sea cuando aparecen los metabolitos secundarios propios de la especie, y que continúa hasta que las reservas de carbohidratos se agotan.

Se ha llegado a la conclusión de que los eventos necesarios para la producción de metabolitos secundarios son los siguientes:

- a) El agotamiento de algún nutriente esencial y por consiguiente la suspensión de la replicación celular.
- b) Una acumulación de intermediarios del metabolismo primario.
- c) Que estos metabolitos intermedios disparen la inducción de las enzimas necesarias para la biosíntesis secundaria o la activación de las enzimas formadas durante la trofofase.

Como se observó en los resultados de la influencia de los

factores físicos y químicos, la temperatura y el tipo de medio tanto para el organismo productor como para el de prueba, tienen una influencia determinante. El metabolismo de Schizophyllum tuvo ciertos cambios, de tal manera que permitieron establecer que la temperatura favorable para producir el antibiótico era la baja (26°C), lo que no está de acuerdo con la encontrada por Parag y Parag (1974). El mejor medio para el organismo de prueba para la detección de la antibiosis, de los dos que se usaron, fue el Agar Nutritivo; en estas conclusiones se encuentran involucradas variables como el tipo de nutrientes del medio, el pH, etc., cuya importancia es fundamental en los procesos metabólicos (Cochrane, 1958; Kates y Wogan, 1967; Smith y Berry, 1974; Olutiola, 1976), y más directamente sobre la producción de antibióticos (Johnson, 1946; Hervey, 1947; Florey et al, 1949 II; Savage, 1949; Pittenger y Mc Coy, 1953).

Los sistemas más susceptibles de modificarse durante la biosíntesis de los antibióticos por acción de la temperatura y la composición del medio, como se dio en los resultados de este trabajo, pueden ser los sistemas enzimáticos (que en última instancia son los que modifican a los metabolitos primarios para llevarlos a las vías secundarias); el efecto de la temperatura en las enzimas está ampliamente comprobado en los seres vivos (Lehninger, 1975). De manera particular, en los hongos, la temperatura actúa en los mecanismos de la germinación, la reproducción y, por consiguiente, en bastantes actividades de los organismos fúngicos durante el crecimiento. Siempre hay un óptimo en la temperatura para el crecimiento;

pero además, cada enzima, sistema enzimático o mecanismo de regulación metabólica, pueden tener su punto de óptima temperatura que también difieren en los diversos microorganismos, por lo tanto cabe la posibilidad de inducir o reprimir ciertos pasos enzimáticos por la acción de diferentes temperaturas, ya sean altas o bajas, según el organismo de que se trate. Por lo general se dice que una baja temperatura abate el metabolismo celular, mientras que una alta aumenta la tasa de actividades celulares, pero no se sabe el papel que tiene en el metabolismo secundario de los hongos, que sería el importante en este caso. En cuanto a la constitución del medio de cultivo, es más complejo el papel que tienen todos y cada uno de los constituyentes.

En los hongos se sabe que la composición y concentración del medio actúa cambiando el metabolismo, por ejemplo, en moniliales y basidiomicetos, en los cuales la capacidad metabólica secundaria es alta (Turner, 1975), y que tiene fuertes cambios en relación al sustrato que las células están manejando; así, por ejemplo, la pigmentación, el crecimiento, etc., se ven influidos por el material rico o pobre en material orgánico e inorgánico y, por lo tanto, hay también una mayor respuesta al medio.

El tipo de sustratos utilizados aquí, está determinado para una clara expresión genética (Raper, 1966) y, por consiguiente, los nutrimentos están balanceados con las concentraciones adecuadas de sales y compuestos orgánicos, para mantener también una aceptable respuesta fisiológica. Por lo mismo, no se va a entrar en mayores detalles en la composición y ac-

ción de cada uno de sus componentes, tanto orgánicos como inorgánicos.

El cambio del pH con fosfato monopotásico (ver Capítulo II) es el que podría originar alguna variación (idea que se ha tomado en cuenta), ya que se sabe que este fosfato es el único asimilable y su captación depende de la acidez del medio, declinando a un pH superior a 6.0 (Berry, 1975).

La antibiosis de S. commune sigue distintos patrones, en donde podemos distinguir tres principales:

Primero; la "antibiosis de Schizophyllum frente a B. subtilis" no parece estar dada por mecanismos de biosíntesis secundaria típica como se conoce para otros microorganismos, en donde un "stress" nutritivo traería consigo el abatimiento del metabolismo primario para dar paso al secundario; aquí todo parece indicar que el antibiótico contra B. subtilis de las cepas utilizadas de S. commune puede producirse en un metabolismo secundario paralelo al primario, por las siguientes razones:

- a) Se detectaron mayor número de cepas con respuesta positiva cuando el medio era rico en material orgánico (ver cuando se usó membrana, tablas 7 y 8).
- b) Fue mayor la actividad antibiótica cuando se usó el pH de 5.0, que es más favorable para los hongos filamentosos, y por consiguiente para un mayor metabolismo y crecimiento.
- c) El tiempo de crecimiento del hongo, fue de 72 horas antes de colocar el bacilo de prueba, o en una ocasión de 96 horas, permite suponer que Schizophyllum se encontraba en la trofofase, en la fase de crecimiento exponencial (de acuerdo

a Berry, 1975; Righelato, 1975).

d) El metabolismo secundario fue más evidente al disminuir el crecimiento a baja temperatura (26°C). Esto daría la idea de que el antibiótico encontrado por Parag y Parag (1974), posiblemente no esté relacionado al (los) aquí encontrado(s), ya que su temperatura óptima fue de 32°C (cerca a la temperatura óptima para el crecimiento de Schizophyllum, que es de 30°C).

El segundo patrón sería el de la "antibiosis de Schizophyllum frente a diferentes microorganismos". Este está más de acuerdo con lo registrado para la producción de antibióticos en la mayoría de los microorganismos productores (Sermonti, 1969; Turner, 1971), en donde la falta de un medio rico en nutrientes o la carencia de algunos que son esenciales provocaría la síntesis secundaria y, por observaciones en el laboratorio, se ha visto que, por lo general, la tasa de crecimiento es mayor en el medio completo que en el medio mínimo (refiriéndose a S. commune), por lo que al retardar el crecimiento facilitaría el paso de la trofofase a la idiofase.

Como se mencionó anteriormente la ausencia de la antibiosis en el medio de pH 5.0, podría estar dada por la falta de difusibilidad, pero existen otras posibles razones también a este respecto, que serían, por ejemplo, la aceleración metabólica por el pH de 5.0, que no permitiera el paso de la trofofase a la idiofase y, por lo tanto la suspensión de la biosíntesis secundaria en las vías que producen el (los) antibiótico(s) contra los distintos microorganismos. Por lo tanto, serían distintos los mecanismos fisiológicos de la "antibiosis frente

a B. subtilis" y de la antibiosis para el resto de los microorganismos estudiados.

Por lo anterior se puede suponer que son distintos los metabolitos antibióticos que se producen en cada cepa, o sea que cada mutante o silvestre parece tener producción de varias moléculas antibióticas, dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre. El estado fisiológico estaría dado por las condiciones físicas y químicas del medio y el estado metabólico o el estado de crecimiento en el que se encuentra Schizophyllum. Asimismo, la regulación de los posiblemente diferentes antibióticos, es distinta también.

Un tercer tipo de regulación y de un posible nuevo antibiótico (tal vez distinto al de los anteriores), sería el que se presenta en la cepa 20 que es de amplio espectro de acción, que se produce en todos los medios y condiciones fisiológicas aquí probados y, que se presenta con más efectividad en medios ácidos. Todo parece indicar que es un antibiótico que está relacionado con el metabolismo de la vía del Shikimateo - Corismato, ya que esta cepa tiene alterada la biosíntesis del triptofano, provocando la formación de indigotina. Se ha comprobado el poder antibiótico del indol en los microorganismos; este indol, al oxidarse en el medio, forma los cristales de indigotina como los que presenta la cepa 20; pero por análisis genéticos, se comprobó que no es el pigmento (la indigotina) el que posee la capacidad antibiótica (ver Capítulo IV). Por lo tanto, es probable que haya otras vías metabólicas secundarias que estén manejando sustratos continuamente, que provengan de esta vía aromática alterada. Pero no se puede desechar

la idea de algún otro origen del (los) antibiótico(s) de esta cepa 20.

Existe también la posibilidad de que se trate de una cepa mutante en donde estén reunidas varias capacidades fisiológicas diferentes de formación de antibióticos, y que el efecto observado sea la suma de todas estas capacidades; para respaldar esta idea se tiene la evidencia de que fue capaz de inhibir a todos los microorganismos probados (ver tablas 9 y 10), y dada la diversidad de éstos, es bastante difícil que actúe un metabolito como inhibidor universal del crecimiento, dada la especificidad de acción de los antibióticos descubiertos hasta ahora (ver Cottlieb y Shaw, 1967 I,II). O sea que, tal vez, esta cepa sea capaz de producir al mismo tiempo varios antibióticos diferentes y no uno universal, y que además la mayoría de ellos sea estable a los cambios de pH. La mayor actividad antibiótica de esta cepa 20 en el medio con pH 5.0, se pudo haber debido a dos razones:

a) Un metabolismo secundario acelerado por la acción de la acumulación de metabolitos intermedios procedentes de una biosíntesis primaria (biosíntesis del triptofano), también acelerada por un pH favorable (pH 5.0), pero alterada por la mutación.

b) Un nuevo tipo de metabolitos secundarios, que sean distintos a los de las demás cepas y que tienen mayor síntesis, mejor actividad y mayor difusión en el agar, cuando el pH es ácido.

Por lo tanto, las distintas cepas de Schizophyllum commune poseen cualidades fisiológicas diferentes para la produc-

ción de antibióticos, según sean sus condiciones fisiológicas propias de respuesta, a los factores externos; o sea que, las cepas aquí usadas, poseen distintos sistemas fisiológicos de regulación de la producción de antibióticos, tanto las silvestres como las mutantes.

en solo fubyo
antaron

Capítulo IV: Genética de la Antibiosis

Estudios previos en Schizophyllum commune

Recientemente Parag y Parag (1974) realizaron el único trabajo publicado hasta la fecha sobre la genética de la antibiosis en Schizophyllum. Encontraron que algunos mutantes inducidos con luz ultravioleta (UV), tenían la propiedad de producir antibiótico contra B. subtilis y Sarcina sp. El gene ant (producción de antibiótico), estaba codificado en el núcleo, fuera del grupo de eslabonamiento E, mapeándose indirectamente al usar el marcador morfológico dom que se encuentra cercano a B (3 unidades, crossing over). Otro aspecto relacionado que se estudió fue la formación de dos tipos de placas líticas en B. subtilis (plg I y plc II) inducidas por Schizophyllum commune, que no estaban producidas por fagos que pudieran obtenerse por técnicas convencionales; también codificadas por el núcleo. El gene ant se encontró recesivo y desligado de los genes plg I y plc II.

Mapeo de Gene(s) de Producción de Antibiótico(s) contra B. subtilis.

Como se observó en las pruebas anteriores, la cepa mutante número 20 tiene una amplia capacidad inhibitoria de los microorganismos que se utilizaron. Esta cepa 20 es un mutante morfológico azul (blue) que tiene alterada la vía de la biosíntesis del triptófano, provocando la acumulación del indol (Miles et al, 1956; Swack y Miles, 1960; Marchant et al, 1976).

Se entrecruzó esta cepa mutante azul (cepa 20), con una cepa silvestre que no había presentado antibiosis (cepa 2) en las primeras pruebas (tablas 5 y 6). El carácter azul del mu-

tante es cromosómico (Raper, 1974) y se tomó como marca de referencia en este mapeo. La segregación de la capacidad antibiótica se muestra en la tabla 11, en donde se aprecia que la segregación del carácter nuclear azul fue de una relación 1 : 1 con el carácter blanco del silvestre, puesto que de 126 cultivos monospóricos obtenidos, 63 fueron blancos y 63 azules. Al mismo tiempo, uno de los 63 azules no produjo antibiótico y 10 de las 63 blancas adquirieron el carácter de producción del antibiótico. Por lo tanto, la segregación del gene ant (producción de antibiótico) contra B. subtilis no fue de tipo mendeliano, si se piensa que estuviera dado por un simple gene. Por lo tanto, puede haber dos explicaciones para esta segregación:

- a) Que sean dos o más los genes ant contra B. subtilis.
- b) Que se trate de una herencia de tipo citoplásmico.

Maneo de Gene(s) de Antibiosis contra Diferentes Microorganismos

Debido a que no se obtuvo una clara segregación nuclear en la antibiosis contra B. subtilis, se efectuó de nuevo la cruce de la cepa número 20 (azul) con la número 2 (silvestre), obteniéndose una progenie de 33 segregantes. Estos micelios se encuentran caracterizados en la tabla 12, en donde se observa el patrón seguido por su actividad antibiótica contra los diferentes microorganismos de prueba. En la parte final de la tabla 12 se dan los patrones de antibiosis obtenidos para los progenitores. Todas las pruebas se efectuaron en MC y MM para Schizophyllum.

Se observa que hay variación en la antibiosis debido al

Tabla 11. Resultados obtenidos de la segregación de la capacidad antibiótica de S. commune, en el entrecruzamiento de las cepas 2 x 20, usando B. subtilis como organismo de prueba. En Medio Completo (MC), T= 30---37°C, pH= 7.0

Cruza			
2 (blanca) x 20 (azul)			
Colonias (color)	Cantidad	Con Antibiótico	Sin Antibiótico
azules	63	62	1
blancas	63	10	53
Total	126	72	54

Nº de la cepa segregante

Tabla 12. Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de los segregantes del entrecruzamiento 2 x 20, en Medio Completo y Medio Mínimo frente a diferentes microorganismos, con el fin de mapear los genes ant, en T= 30---37°C ; pH= 7.0

Nº	<u>B. subtilis</u>	<u>S. paratyphi-A</u>	<u>S. aureus 6538</u>	<u>Sh. dysenteriae</u>	<u>E. coli poli-B</u>	<u>S. lutea</u>	<u>C. albicans</u>	<u>Pseudomonas (a)</u>	<u>Pseudomonas (b)</u>	<u>S. aureus 13150</u>	<u>S. paratyphi-B</u>	<u>S. enteritidis</u>	<u>Sh. sonnei</u>	<u>S. typhi Ty2</u>	<u>E. coli SF2124</u>	<u>E. coli PMB9</u>	<u>E. coli PK121</u>
1																	
2																	
3		+															
4																	
5																	
6	+					+		+		+							
7	+					+											
8	+					+											
9	+					+											
10		+				+											
11		+				+											
12								+									
13		+				+											
14								+									
15	+					+											
16																	
17						+											
18																	

Color del segregante

B A A A B A B A B A B B B B B

Continuación de la tabla 12

	<u>B. subtilis</u>	<u>S. paratyphi-A</u>	<u>S. aureus 6538</u>	<u>Sh. dysenteriae</u>	<u>E. coli poli-B</u>	<u>S. lutea</u>	<u>C. albicans</u>	<u>Pseudomonas (a)</u>	<u>Pseudomonas (b)</u>	<u>S. aureus 13150</u>	<u>S. paratyphi-B</u>	<u>S. enteritidis</u>	<u>Sh. sonnei</u>	<u>S. typhi Ty2</u>	<u>E. coli SF2124</u>	<u>E. coli PMB9</u>	<u>E. coli PML21</u>
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Progenitores																	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Color del segregante
A B A A A A A A B A A B B A B A

tipo de substrato en el que se encuentra el hongo, en ocasiones se produjo la inhibición (ver columna de B. subtilis), cuando el substrato de Schizophyllum fue rico en compuestos orgánicos, o por el contrario, como sucedió con la columna de la Shigella dysenteriae. Puesto que la mayoría de los segregantes con antibiosis y sin antibiosis no presentan una relación mendeliana, el carácter de producción de antibiótico fue de tipo citoplásmico en estas cepas (ver en forma vertical las columnas de cada microorganismo de prueba para observar si se obtiene o no la relación nuclear (+ vs -) en 1 : 1). Además si se toma el patrón de antibiosis de manera horizontal, se observa que los progenitores no se recuperan entre los segregantes, de tal manera que no se podría pensar en un sistema poligénico para toda la antibiosis. Para Sh. dysenteriae en MM y S. aureus 13150 en MC, que parecían tener una segregación nuclear del carácter ant, se encontró lo siguiente: para Sh. dysenteriae; 14 ant : 19 ant⁺, (haciendo la prueba de X^2 da una P 0.98), por lo tanto no fue nuclear. Para S. aureus 13150 se obtuvieron 13 ant : 20 ant⁺ con una P 0.90 ; por lo mismo tampoco fue nuclear.

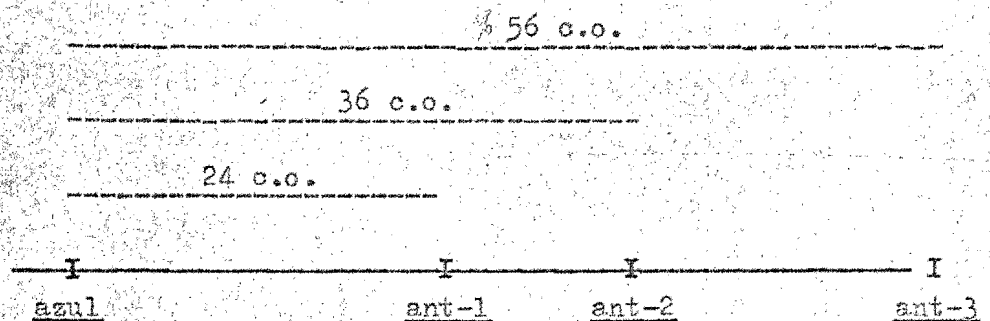
Como referencia se obtuvo la segregación del marcador nuclear azul que dio una relación 1 : 1 (16 blancos y 17 azules).

La tabla 13 contiene los resultados de la segregación de la cruce de las cepas 20 y 1, este entrecruzamiento fue efectuado para probar si la segregación para el carácter de la antibiosis era realmente no mendeliana en la mayoría de los casos (para la mayoría de las bacterias y levadura), o si se encontraba alterada por algún factor de la cepa silvestre 2, ante-

riormente utilizada en la cruce.

Por lo tanto, en la tabla 13 se muestra el patrón de la segregación del nuevo entrecruzamiento, en donde se presentó segregación cromosómica para la antibiosis contra K. pneumoniae, en Medio Mínimo; S. aureus 6538, en Medio Completo; y contra E. coli PML21, en Medio Mínimo.

El mapeo de estos genes fue el siguiente:



ant-1 = antibiótico contra S. aureus 6538

ant-2 = antibiótico contra E. coli PML21

ant-3 = antibiótico contra K. pneumoniae

c.o. = unidades de recombinación

El mapeo se llevó a cabo tomando como referencia la mutación azul, por el método de análisis de tétradas desordenadas.

Como se observa en el mapa, la distancia de ant-3 a azul tiene 56 unidades, por lo que en realidad se considera ant-3 desligado de azul.

El marcador nuclear azul utilizado como referencia se obtuvo con una segregación 1 : 1; lo que indicó que la segregación del (los) gene(s) de antibiosis (ant) contra los demás microorganismos fue de tipo citoplásmico. También se observa que el sustrato cambió la acción antibiótica del hongo y, por:

Tabla 13. Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de los segregantes del entrecruzamiento 1 x 20, en Medio Completo y Medio Mínimo frente a diferentes microorganismos, con el fin de mapear los genes ant, en T= 30---37°C ; pH= 7.0

Nº del segregante	<u>E. subtilis</u>	<u>K. pneumoniae</u>	<u>S. paratyphi-A</u>	<u>S. aureus 6538</u>	<u>Sh. dysenteriae</u>	<u>E. coli poli-B</u>	<u>S. lutea</u>	<u>C. albicans</u>	<u>Pseudomonas (a)</u>	<u>S. aureus 13150</u>	<u>S. paratyphi-B</u>	<u>S. enteritidis</u>	<u>Sh. sonnei</u>	<u>S. typhi Ty2</u>	<u>E. coli SF2124</u>	<u>E. coli PMB9</u>	<u>E. coli FM121</u>
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M

C= Medio Completo
M= Medio Mínimo

Color del segregante
A B B A A B A B B A A B A A A B B B

Continuación de la tabla 13

	<u>B. subtilis</u>	<u>K. pneumoniae</u>	<u>S. paratyphi-A</u>	<u>S. aureus 6538</u>	<u>Sh. dysenteriae</u>	<u>E. coli poli-B</u>	<u>S. lutea</u>	<u>C. albicans</u>	<u>Pseudomonas (a)</u>	<u>S. aureus 13150</u>	<u>S. paratyphi-B</u>	<u>S. enteritidis</u>	<u>Sh. sonnei</u>	<u>S. typhi Ty2</u>	<u>E. coli SF2124</u>	<u>E. coli PMB9</u>	<u>E. coli PMB21</u>
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

B
A
B
B
A
A
A
A
A
A
B
B
A
A
B
A
B
A
B

Continuación de la tabla 13

37	<u>E. subtilis</u>	<u>K. pneumoniae</u>	<u>S. paratyphi-A</u>	<u>S. aureus 6538</u>	<u>Sh. dysenteriae</u>	<u>E. coli poli-B</u>	<u>S. lutea</u>	<u>C. albicans</u>	<u>Pseudomonas (a)</u>	<u>S. aureus 13150</u>	<u>S. paratyphi-B</u>	<u>S. enteritidis</u>	<u>Sh. sonnei</u>	<u>S. typhi Ty2</u>	<u>E. coli SF2124</u>	<u>E. coli PM39</u>	<u>E. coli PM121</u>	
38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A

Progenitores

C= Medio Completo
M= Medio Mínimo

Am. azul
DM
Blanco

lo tanto tuvo un efecto directo en la expresión de los genes ant (por ejemplo, los genes ant-1, ant-2 y ant-3 encontrados aquí). Por lo tanto, sí hubo una interferencia de la cepa 2, que no permitió obtener la segregación nuclear de los genes ant-1, ant-2 y ant-3.

Herencia Citoplásmica

Con el fin de comprobar la segregación citoplásmica de ant, se procedió a sembrar el dicarion establecido de las cru-
zas 20 x 1 y 20 x 2, en Medio Completo y Medio Mínimo + 0.05 y 0.01 M de CuSO_4 para desdicarionizar al micelio como se mues-
tra en el esquema incluido en la tabla 4. Estas pruebas se en-
cuentran en proceso y todavía no se han obtenido los resulta-
dos.

Resultados de la Interacción Complementaria (Cosíntesis) y de la Complementación en la Antibiosis

La complementación implica que haya una transmisión de los caracteres genéticos de una a otra célula y que funcionen equilibradamente en ella (Fincham, 1966), y por consiguiente la cosíntesis no es una complementación verdadera; por esto se adoptó el término de "interacción complementaria" para denominarla de manera más apropiada en este trabajo (ver King, 1974). La formación de los heterocariones establece un equilibrio núcleo-citoplasma verdadero, y a este fenómeno se le considera como una complementación genética y fisiológica bien establecida; por este motivo se llamó complementación a la formación y establecimiento de los dicariones obtenidos por entrecruzamientos entre cepas compatibles de Schizophyllum (Raper, 1966; Raper y Hoffman, 1974).

Interacción Complementaria (Cosíntesis)

Las pruebas de cosíntesis del antibiótico contra B. subtilis se efectuaron en MC y MM en pH de 5.0 y 7.0 .

Las combinaciones se efectuaron con 21 cepas de Schizopyllum y en algunos casos con menor número de cepas, pero todas mantuvieron la numeración con la que fueron designadas para este trabajo.

Se presentan los resultados obtenidos cuando se efectuaron las combinaciones con todas las cepas, contando las activas ant para observar alguna posible interacción de éstas con los metabolitos secretados de las cepas inactivas; y por otro lado los resultados entre las cepas inactivas, la cepa cuyos botones se sometieron a las pruebas y presentaron el halo de antibiosis a su alrededor están señaladas por las flechas (que corresponderían a las cepas activadoras del antibiótico inactivo, según terminología de Delió et al., 1969; Sermoniti, 1969).

Cuando las cepas que en los controles poseían antibiosis y la perdieron en estas pruebas, se señalan con un triángulo en el cuadro de la correspondiente combinación que les produjo esta "coinhibición".

La tabla 14 presenta los resultados de la cosíntesis de las cepas activas e inactivas en Medio Mínimo a pH de 5.0, donde se observan los posibles patrones de la interacción complementaria de las cepas de Schizopyllum. Las cepas que en los controles poseían antibiosis (3, 6, 8, 20, 21) la conservaron generalmente excepto en la 3 en la que se perdió toda la actividad antibiótica al contraponerse con las demás cepas; la 6 que perdió su antibiosis en la combinación con la 22; la

Tabla 14. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Mínimo con un pH=5.0, T= 30---37°C. Usando *B. subtilis* como organismo de prueba. Se presentan también los resultados para las cepas con antibiosis en los controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	-	-	△	-	+↑	+↑	-	+↑	-	-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
2		-	△	-	-	+↑	-	△	-	-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
3			△	△	△	+↑	+↑	+↑	△	△	±↑	△	△	△	△	△	△	△	+↑	△	△	
4				-	-	+↑	-	+↑	-	-	±↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	±↑	-	
5					-	+↑	±	+↑	-	-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
6						+↑	+	+↑	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	△
7							-	+↑	-	-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
8								+↑	△	△	△	△	±	△	△	△	△	△	+↑	△	△	
9									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
11										-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
12											+↑	+	+	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
13												-	-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
14													-	-	-	-	-	-	+↑	△	-	
15														-	-	-	-	-	+↑	△	-	
16															-	-	-	-	+↑	△	-	
17																-	-	-	+↑	△	-	
18																	-	-	+↑	△	-	
19																		-	+↑	△	-	
20																				+↑	+	+
21																					△	△
22																						-

→ = señala a la cepa que presentó el halo de inhibición

△ = coinhibición

Tabla 15. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Mínimo con un pH= 5.0, T= 30---37°C. Usando B. subtilis como organismo de prueba.

	1	2	4	5	7	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	22
1	-	-	-	→	-	-	-	→	-	-	-	-	-	-	-	-
2		-	-	-	-	-	-	→	-	-	-	-	-	-	-	-
4			-	-	-	-	-	→	-	-	-	-	-	-	-	-
5				-	→	-	-	→	-	-	-	-	-	-	-	-
7					-	-	-	→	-	-	-	-	-	-	-	-
9						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11							-	→	-	-	-	-	-	-	-	-
12								→	→	→	-	-	-	-	-	-
13									-	-	-	-	-	-	-	-
14										-	-	-	-	-	-	-
15											-	-	-	-	-	-
16												-	-	-	-	-
17													-	-	-	-
18														-	-	-
19															-	-
22																-

→ = señala a la cepa que presentó el halo de inhibición

Las cepas activas en los controles fueron: 3, 6, 8, 20, 21

Tabla 16. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Completo con un pH= 5.0, T= 30---37°C. Usando *B. subtilis* como organismo de prueba. Se presentan también los resultados para las cepas con antibiosis en los controles.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Δ	-	-	-	-	±↑	-	-	+↑	-	-	
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Δ	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
3			-	-	-	-	-	-	-	-	Δ	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
4				-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
5					-	-	-	-	-	-	Δ	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
6						-	-	-	-	±	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
7							-	-	-	-	Δ	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
8								-	-	-	Δ	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
9									-	-	Δ	-	-	-	-	+↑	-	-	+↑	-	-	
11										-	+↑	-	-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
12											±	±	±	±	±	Δ	Δ	±	+↑	Δ	Δ	
13												-	-	-	±	+↑	±	-	+↑	-	-	
14													-	-	-	-	-	-	+↑	-	-	
15														-	-	-	-	-	+↑	-	-	
16															-	-	-	-	+↑	-	-	
17																-	-	-	+↑	-	-	
18																	-	-	+↑	-	-	
19																		-	+↑	-	-	
20																				+↑	+↑	+↑
21																					-	-
22																						-

→ = señala a la cepa que presentó el halo de inhibición

Δ = coinhibición

Tabla 17. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Completo con un pH= 5.0, T= 30---37°C. Usando B. subtilis como organismo de prueba

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	13	14	15	16	17	18	19	21	22
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6						-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9									-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
11										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13											-	-	-	+	+	+	-	-	-
14												-	-	-	-	-	-	-	-
15													-	-	-	-	-	-	-
16														-	-	-	-	-	-
17															-	-	-	-	-
18																-	-	-	-
19																	-	-	-
21																		-	-
22																			-

→= señala a la cepa que presentó el halo de inhibición

Las cepas activas en los controles fueron: 12, 20

8 al contraponerse con las cepas 2, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, por lo que en estas pruebas se presentó el fenómeno de coinhibición, que representa la inhibición de la producción del (los) antibiótico(s) contra B. subtilis por represión de algún metabolito de otra cepa, que se difunde en el medio de agar; o simplemente por la inactivación de él en el medio.

Asimismo, se presentan en la tabla 15 los resultados de la combinación de cepas no productoras del (los) antibiótico(s) que fueron capaces de formarlo(s) en las combinaciones 5 y 1; 5 y 7; 12 y 1, 2, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14; en donde las cepas que poseían el halo de antibiosis fueron la 5 y la 7.

Los resultados de las combinaciones de los botones de las cepas activas e inactivas en Medio Completo a pH de 5.0 se presentan en la tabla 16. Las cepas activas fueron la 12 y la 20 en los controles, de ellas solo la 12 fue coinhibida en las combinaciones con las cepas 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 20, 21, 22.

Eliminando las cepas activas quedaron todas las combinaciones de las cepas inactivas representadas en la matriz de la tabla 17, donde se observa que hubo una verdadera cosíntesis en las combinaciones 6 y 11; 13 y 16, 17, 18; 17 y 1, 9, 13. Las cepas 6, 13, 17, tuvieron el halo de inhibición como se observa con las flechas marcadas en cada cuadro.

Quando el pH fue neutro (pH 7.0), en Medio Mínimo se obtuvieron los resultados dados en las tablas 18 y 19.

En la tabla 18 se tienen los resultados para las cepas activas e inactivas probadas, los espacios vacíos corresponden

Tabla 18. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Mínimo con un pH= 7.0, T= 30---37°C . Usando B. subtilis como organismo de prueba. Se presentan también los resultados para las cepas con antibiosis en los controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	+	+	±	+	+	+	+	+	+												
2		-	-	-	-	-	-	+	-	-											
3			-	-	-	-	-	△	-	-											
4				-	-	-	-	+	-	-											
5					-	±	+	-	±	-	-										
6						-	-	△	-	-											
7							-	+	-	-											
8								+	+	+							△	+	△	+	±
9									-	-										±	-
11										-										+	-
12																					
13												-	-	+	-					±	-
14													-	+	-					△	-
15														+	+					△	+
16															-					+	-
17																					
18																	-			△	-
19																		-		±	-
20																				△	+
21																					±
22																					

Espacios vacíos= no probados

→= señala la cepa que presentó el halo de inhibición

△= coinhibición

Tabla 19. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Mínimo con un pH= 7.0, T= 30---37°C . Usando B. subtilis como organismo de prueba

	2	3	4	5	6	7	9	11	13	14	16	18	19	21	22
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5				-	±↑	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
6					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9							-	-	-	-	-	-	-	-	-
11								-	-	-	-	-	-	-	-
13									-	-	-	-	-	-	-
14										-	-	-	-	-	-
16											-	-	-	-	-
18												-	-	-	-
19													-	-	-
21														-	-
22															-

→= señala a la cepa que presentó el halo de inhibición

Las cepas con antibiosis en los controles fueron: 1, 8, 15, 20.

a dos cepas (12 y 17) que por motivos de contaminación no fue posible utilizarlas. Se observa que las cepas activas fueron la 1, 8, 15, 20; de éstas fueron coinhibidas la 8, 15, 20; en las combinaciones: 8 y 3, 6, 18; 15 y 18; 20 y 8, 14, 15, 18. Eliminando las cepas que fueron activas en los controles para este medio, se presentan en la tabla 19 los resultados del fenómeno cosintético de las combinaciones: 6 y 4; 5 y 14; siendo las cepas 5 y 6 las que presentaron el halo, con inhibición parcial que correspondió al signo \ddagger .

Quando las cepas se probaron en Medio Completo a pH de 7.0 se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 20): Las cepas con actividad antibiótica en los controles fueron la 1, 15, 20; de ellas sólo la 20 no presentó coinhibición. La cepa 1 fue inactivada con las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7, 8, 9, 13, 14, 16, 17, 18, 19; la inactivación de la cepa 15 fue debida a la presencia de las cepas 8, 11, 21.

La tabla 21 muestra los resultados obtenidos para la co-síntesis con las cepas que eran inactivas en los controles, en las combinaciones: 6 y 13; 8 y 7; 12 y 3; 16 y 14, 16; 17 y 4, en donde las cepas que presentaron el halo de inhibición fueron la 6, 8, 12, 16, 17.

La tabla 22 muestra la acción del cambio en el pH y el medio de cultivo en los homocariones para las pruebas controles, antes de someterlos a la interacción complementaria. La actividad antibiótica se vio afectada por ambos parámetros, presentándose una mayor expresión cuando el medio de cultivo fue Medio Mínimo. La cepa 20 fue activa en las cuatro combinaciones de pH y medio de cultivo, no así las demás. Las cepas

Tabla 20. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Completo con un pH= 7.0, T= 30---37°C. Usando *B. subtilis* como organismo de prueba. Se presentan también los resultados para las cepas con antibiosis en los controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
1	△	△	△	△	△	△	△	△	△	±	±	△	△	±	△	△	△	△	±	±	±	
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
3			-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
4				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	±	-	-	±	-	-	
5					-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
6						-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
7							-	±	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
8								-	-	-	-	-	-	△	-	-	-	-	±	-	-	
9									-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
11										-	-	-	-	△	-	-	-	-	±	-	-	
12											-	-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
13												-	-	±	-	-	-	-	±	-	-	
14													-	±	-	-	-	-	±	-	-	
15															±	±	±	±	±	±	△	±
16																±	-	-	±	-	-	
17																	-	-	±	-	-	
18																		-	±	-	-	
19																			-	±	-	
20																				±	±	±
21																					-	-
22																						-

→ = señala a la cepa que presentó el halo de inhibición
 △ = coinhibición

Tabla 21. Matriz de los resultados obtenidos en la interacción complementaria (cosíntesis), cuando se utilizó Medio Completo con un pH= 7.0, T= 30---37º Usando B. subtilis como organismo de prueba.

	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	16	17	18	19	21	22	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3		-	-	-	→	-	-	-	-	→	-	-	-	-	-	-	-	-	
4			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	→	-	-	-	-	
5				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6					-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7						-	→	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11									-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12										-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13											-	-	-	-	-	-	-	-	
14												-	→	-	-	-	-	-	
16														→	-	-	-	-	
17															-	-	-	-	
18																-	-	-	
19																	-	-	
21																		-	
22																			-

→= señala a la cepa que presentó el halo de inhibición

Las cepas activas en los controles fueron: 1, 15, 20.

Tabla 22. Comparación de las cepas activas para los controles en las pruebas de la interacción complementaria (cosíntesis).

Homocariones activos	pH	Tipo de Medio de Cultivo
3, 6, 8, 20, 21.	5.0	MM
12, 20.	5.0	MC
1, 8, 15, 20.	7.0	MM
1, 15, 20.	7.0	MC

MC= Medio Completo

MM= Medio Mínimo

se comportaron de diferente manera, activando o inhibiendo su antibiosis, por lo que se sugiere un patrón genético distinto para la antibiosis de cada una de ellas.

Complementación

Debido a que el carácter complementario de algunos genes en la célula fúngica se llevan a cabo solamente cuando se encuentran presentes en una misma cepa, se procedió a formar los heterocariones con las cepas con las que se hizo la interacción complementaria anteriormente, seleccionándose las cepas que fueran compatibles como lo establece la tabla 23 en donde se indica con signo + las combinaciones de los homocariones perfectamente compatibles a priori, y marcados con un signo +? los entrecruzamientos dudosamente compatibles; para los incompatibles se utilizó el signo - .

Todas las cruzas + y +? se efectuaron y después de 3 ó 4 días a 30°C se tomaron los dicariones bien establecidos, diagnosticándolos por formación de fíbulas o por fructificación (Fincham y Day, 1965; Raper, 1966; Raper y Hoffman, 1974). De estos posibles dicariones se perdieron algunos por contaminación y otros no presentaron fíbulas ni fructificación en el período dicho anteriormente, por lo que no se utilizaron.

De los dicariones aislados, se tomaron 20 para ser probados para antibiosis contra diferentes microorganismos y el resto de ellos se probaron contra B. subtilis únicamente.

La tabla 24 presenta los resultados de la antibiosis de los dicariones probados contra B. subtilis.

Los signos dentro de los círculos denotan que son resultados provenientes de los dicariones probados en Medio Comple-

Tabla 23. Matriz que presenta la formación teórica de los dicariones, dependiendo de los factores de compatibilidad de las cepas de S. commune

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
2			+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4					+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
5						+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6							+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7								+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8									+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9										-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11											-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
12												+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13													+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
14														+	+	+	+	+	-	-	+	+
15															+	+	+	+	+	+	+	+
16																+	+	+	+	+	+	+
17																	+	+	+	+	+	+
18																		+	+	+	+	+
19																			+	+	+	+
20																				+	+	+
21																					+	+
22																						+
23																						

?= dudosamente compatibles

Tabla 24. Matriz que presenta los resultados de la antibiosis de los dicariones formados en las combinaciones de las cepas homocarióticas de S. commune; usando B. subtilis como organismo de prueba. pH= 7.0 en Medio Completo, T= 30---37°C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
1	○-			-	-	-	○-	±		-	-	○-	○-		+	-	-	○-		-	±		
2		○-	+	±	○-	-				-	-	○-	-	±	+	-	-	○-	±	-			
3			+		-	-		±	±	-	-	-	○-	±	+	±	-	+	-	-	±		
4				-	+	-		-	-	-	-	-	○-	-	+	-	-	+		-	±		
5								-		○-													
6							-	+		-	±		-	-			-	+		-			
7											○-		-		±	-							
8								+					○-										
9											-		-					+	-	-	-		
11											-		-				+		-	-	-		
12											-		-						○-	-	-	-	
13												-	-						+	-	-	-	
14													-							-			
15																				+		○-	-
16																				○-		-	-
17																				+	+	-	±
18																				-	+	-	
19																					+	-	-
20																						○-	+
21																							
22																							-
23																							

Espacios vacíos= no probados
 ○ = datos tomados de la tabla 25

to, contra varios microorganismos de la tabla 25. En la tabla 24 se observa que la mayoría de los dicariones en donde intervino la cepa 20 mostraron antibiosis de ellos 10 que provenían de 16 sin antibiosis en los homocariones; lo mismo sucedió para la 17 que tuvo 9 con antibiosis de un total de 13 dicariones probados. La cepa 9 presentó también antibiosis en la mitad de los entrecruzamientos en los que estuvo su carga cromosómica presente.

También se encontró antibiosis en algunos dicariones formados por cepas silvestres (2 x 4 y 3 x 4); y escasamente en algunos otros entrecruzamientos de silvestres con mutantes y mutantes con mutantes.

Las cepas homocarióticas de Schizophyllum usadas para dicariosis se pueden separar en 4 grupos: silvestres (1 - 4), mutantes en loci de incompatibilidad (4 - 8), auxótrofos (6 - 18), y morfológicos (19 - 23). Tomando estos grupos como posibles productores de antibiótico al estar en dicariosis y tomando en cuenta sus tipos de marcadores genéticos, no fue posible establecer una relación entre las mutaciones dadas en los genotipos de la tabla 1 y su intervención en la complementación para formar o no el antibiótico; más bien parece ser que el comportamiento de producción de antibiótico es un carácter propio de algunas cepas como la 17 y la 20.

La tabla 25 muestra los resultados obtenidos en las pruebas de antibiosis de 20 dicariones establecidos, contra diferentes microorganismos en MC y MM a pH de 7.0. Se nota que la mayoría de los dicariones con antibiosis se expresaron en MM, ya que hay 14 respuestas + ó ± en MM y 11 en MC.

Tabla 25. Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de los 20 dicariones formados.
 En Medio Completo y Medio Mínimo, frente a diferentes microorganismos; en T= 30---37; pH= 7.0

Não de la cepa	B. subtilis		S. paratyphi-A		S. aureus 6538		Sh. dysenteriae		E. coli poli-B		S. lutea		C. albicans		Pseudomonas (a)		S. aureus 13150		S. paratyphi-B		S. enteritidis		Sh. sonnei		S. typhi Ty2		E. coli SF2124		E. coli PMB9		E. coli PML21	
	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M	C	M		
1	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
2	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
3	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
4	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
5	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
6	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
7	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
8	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
9	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
10	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
11	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
12	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
13	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
14	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
15	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
16	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
17	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
18	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
19	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
20	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		

C= Medio Completo
 M= Medio Mínimo

Los dicariones que presentaron antibiosis fueron: 12 x 20, 6 x 20, 1 x 8, 4 x 15, 2 x 6, 1 x 15, y 1 x 20. Los dicariones 12 x 20 y 6 x 20 fueron los que mostraron un rango de inhibición mayor contra diferentes microorganismos.

La tabla 26 presenta la correspondencia de la nomenclatura usada para los dicariones de la tabla 25.

Inducción de mutantes ant

Se trató de obtener mutantes que produjeran antibiótico, pero que no tuvieran ninguna mutación auxótrofa para que se facilitara su manipulación; por lo tanto se irradió con UV la cepa silvestre número 1 y se probaron los sobrevivientes obtenidos en Medio Mínimo a pH de 7.0 a las dosis de UV dadas en el Capítulo II, contra B. subtilis; en este experimento el resultado fue negativo, no obteniéndose ninguna cepa mutante con antibiosis contra B. subtilis.

Discusión

La producción de los antibióticos por los microorganismos, ha sido tratada en su mayor parte por procesos genéticos que van desde la inducción de mutantes productores o mejorados, hasta el aprovechamiento de los fenómenos de recombinación, tanto meiótica como mitótica para establecer cepas con la codificación genética deseada.

Estos estudios pertenecen en su mayor parte a actinomicetos y a mohos asexuales (Sermonti, 1969), por lo tanto hay escasos registros de hongos superiores con fase sexual, y sobre todo basidiomicetos que se hayan utilizado para estudios genéticos de esta índole.

La actividad de los mutágenos es diferente en cada orga-

Tabla 26. Correspondencia entre los dicariones formados para la prueba de antibiosis frente a diferentes microorganismos, y el número establecido de ellos para estas pruebas.

Número utilizado en la tabla 25	Número de los homocariones utilizados para formar el dicarion
1b	15 x 22
2b	20 x 22
3b	7 x 13
4b	2 x 14
5b	1 x 8
6b	6 x 20
7b	16 x 20
8b	2 x 3
9b	5 x 12
10b	8 x 15
11b	4 x 15
12b	3 x 13
13b	2 x 6
14b	1 x 2
15b	1 x 15
16b	12 x 20
17b	1 x 20
18b	1 x 14
19b	2 x 20
20b	3 x 15

nismo de que se trate; por este y otros motivos se han llevado a cabo grandes procesos de selección por medio de tratamientos mutagénicos, como el caso de la Familia Wisconsin de las cepas de Penicillium chrysogenum (Backus y Stauffer, 1955; Sermoniti, 1969); o los procesos de selección en la obtención de variantes activas en Streptomyces aureofaciens (Alikhanian et al, 1959), en donde se combinan los diferentes tratamientos de los mutágenos para lograr obtener más y mejores cepas productoras. Asimismo, Elander (1975) presenta los procesos de selección por mutágenos de los organismos productores de cefalosporina, a partir de cepas con bajo índice de producción, para lograr las variantes mejoradas.

No necesariamente se debe partir de cepas que hayan tenido alguna actividad antibiótica en forma natural, sino que también estos agentes pueden inducir esta actividad en cepas que no eran activas (Shier et al, 1969; Chakrabarty y Nandi, 1971; Parag y Parag, 1974); o inducir la formación de antibióticos diferentes, pero estructuralmente semejantes a otros que ya producía la célula (White et al, 1974).

Las mutaciones que interfieren de una manera positiva o negativa en la síntesis de los antibióticos son sumamente variadas, como lo demuestra la cantidad de mutaciones que se manejan en Penicillium, Aspergillus, Cephalosporium y Streptomyces (Alikhanian et al, 1959; Sermoniti, 1959; 1969; Macdonald et al, 1964; Macdonald, 1973; Elander, 1975). Por lo general, las mutaciones que afectan de manera más drástica y negativamente la producción de antibióticos, son principalmente las auxotróficas (Macdonald, 1964); en Penicillium chrysogenum

se ha encontrado una gradación en el tipo de mutación y la síntesis de penicilina, de tal manera que los auxótrofos para vitaminas, aminoácidos y, bases púricas, presentan un decremento en la cantidad de penicilina sintetizada, en ese orden (Sermonti, 1969). Es posible suponer que tales mutaciones estén bloqueando procesos metabólicos, que de alguna manera reduzcan o anulen la síntesis de penicilina (O' Sullivan y Pirt, 1973), produciendo efectos pleiotrópicos (Macdonald, 1973). Se conoce la dependencia de algunos aminoácidos como la lisina en la formación de la penicilina, pero no se ha establecido hasta ahora toda la secuencia metabólica para la biosíntesis de esta última y, por lo tanto, las posibles mutaciones que puedan alterarla (O' Sullivan y Pirt, 1973). Lo mismo sucede en la síntesis de cefalosporina (una β lactama similar a la penicilina), que se ve afectada por la presencia o ausencia de la lisina y la metionina (Elander, 1975).

En Streptomyces antibioticus (Polsinelli et al, 1965), las mutaciones bioquímicas auxótrofas para uno de los aminoácidos de la actinomicina, fue suficiente para causar un brusco descenso en la producción del antibiótico; Streptomyces aureofaciens ha mostrado una dependencia estricta de la arginina y en menor grado de la isoleucina y la valina para la formación de la clortetraciclina.

Se consideran como mutaciones positivas aquellas que aumentan la cantidad de antibiótico sintetizado, o las que inducen su formación de novo en los microorganismos; en esto, se tienen las observaciones de mutaciones morfológicas de crecimiento tardío, pobre desarrollo, o defectos en la formación.

de las esporas (Sermonti, 1969; Basu Chaudhary y Gupta, 1971; Elander, 1975), que en la mayoría de los casos dan variantes mejoradas. En el caso del presente estudio, no fue posible encontrar ninguna correlación de este tipo, debido al comportamiento tan particular de cada una de las cepas de S. commune estudiadas.

Las propiedades de recombinación en la parasexualidad y en la sexualidad de los Streptomyces y hongos productores, se ha tomado como una herramienta para la manipulación genética, buscando formar cepas ideales con una extraordinaria codificación genómica, que las haga altos productores, resistentes a parásitos y que su cultivo y crecimiento sean inmejorables en condiciones fisiológicas estándares.

Una vez obtenidos por mutación los genes de antibiosis mejorada, se han hecho intentos por formar heterocariones, diploides o recombinantes que provoquen un aumento en la producción del antibiótico y una especialidad genética de las cepas. Penicillium y Aspergillus son los hongos en los que estos estudios han sido llevados a cabo en su mayor parte.

Penicillium chrysogenum, no posee una sexualidad verdadera, pero tiene la capacidad de llevar a cabo la recombinación mitótica en su parasexualidad (Sermonti, 1959), por esto se ha intentado formar heterocariones que permitan la formación de diploides estables y recombinantes que tengan mayor producción de penicilina (Sermonti, 1959; 1969; Macdonald, 1964; 1973; Macdonald et al, 1964); sin embargo poco ha sido el éxito, debido a las siguientes razones:

- a) La ausencia de la sexualidad sólo ha permitido que los

procesos de recombinación se lleven a cabo con una frecuencia baja (Sermonti, 1959; 1969; Macdonald et al, 1964).

b) En la formación de heterocariones y/o diploides heterócigos, se obtiene en la mayoría de los casos menor producción de penicilina, debido a efectos pleiotrópicos (Sermonti, 1969; Macdonald, 1973).

c) Los genes de producción y mejoramiento son de alta recesividad (Sermonti, 1959; 1969; Macdonald, 1964; 1973; Macdonald et al, 1964).

d) Después de haber obtenido los diploides heterócigos, los procesos de aneuploidía son escasos, a pesar de su inducción con agentes físicos y químicos (Macdonald, 1968; 1973).

e) Por último, que la mayoría de la progenie obtenida como segregantes de los diploides heterócigos, tienen difícilmente recombinación, y por lo tanto se obtiene un alto índice de segregantes que es de tipo progenitor (Sermonti, 1959; 1969; Macdonald, 1964; 1968; 1971). Efecto que tal vez sea debido a pequeñas diferencias cromosómicas por causas de los mutágenos (Macdonald, 1968; 1973); pero a pesar de ello se han logrado formar diploides en Penicillium chrysogenum, con una producción ligeramente mayor que los homocariones (Sermonti, 1959; 1969).

En Aspergillus nidulans se sabe que se produce también penicilina, pero en menor cantidad. Este es un hongo que posee una sexualidad verdadera y procesos parasexuales, por lo tanto se puede estudiar usando la recombinación meiótica y la mitótica. Por medio del análisis cleistotecial (meiosis) se ha establecido el mapeamiento de genes de la biosíntesis y me-

mejoramiento de la penicilina, con relación al centrómero (Macdonald, 1973).

Se sabe también que la producción de penicilina en Aspergillus nidulans, tiene efectos pleiotrópicos, y que al igual que en Penicillium chrysogenum, se disminuye la cantidad de penicilina producida (Macdonald, 1964; Cole et al, 1976).

Un fenómeno que presenta A. nidulans, es la compatibilidad del heterocarion (aunque se le considera homotálico), que no es una compatibilidad estricta, como en otros hongos, sino una alteración en cierto grado del número de cleistotecios formados en los entrecruzamientos (Clutterbuck, 1974); estableciéndose así grupos de compatibilidad reconocidos. Respecto a esto, se conoce en parte la influencia de algunos loci de compatibilidad del heterocarion en la producción de penicilina (Cole et al, 1976).

En otros hongos como Mucor racemosus (Harris, 1948), se ha encontrado una estrecha relación entre la producción de antibiótico y los factores de compatibilidad.

Los actinomicetos, en general, producen una amplia variedad de antibióticos, pero su estudio está casi completamente confinado a los laboratorios industriales (Sermonti, 1969), por ello la información es escasa.

Los programas genéticos de producción y mejoramiento, están orientados en su mayor parte a la inducción por medio de mutágenos, combinación de mutágenos y selección (Alikhanian et al, 1959; Sermonti, 1969).

La actividad antimicrobiana de Streptomyces, se ha estudiado recientemente como un aspecto colateral de los mecanis-

mos genéticos de la recombinación (Alikhanian et al., 1959; 1961; Sermonti, 1969), hibridización interespecífica (Lomovskaya et al., 1977), interacción complementaria (Delić et al., 1969; Sermonti, 1969; Kirby et al., 1975; Kirby y Hopwood, 1977), partículas citoplásmicas (Vivian, 1971; Akagawa et al., 1975; Kirby et al., 1975; Wright y Hopwood, 1976 a,b; Freeman et al., 1977; Lomovskaya et al., 1977), y fertilidad (Vivian, 1971; Hopwood et al., 1973).

En Streptomyces se ha estudiado un efecto de biosíntesis cooperativa (cosíntesis o interacción complementaria) para la formación de los antibióticos, metilenomicina A en S. coelicolor A₃(2) (Kirby et al., 1975), y tetraciclinas en S. aureofaciens y S. rimosus (Delić et al., 1969; Sermonti, 1969). Este efecto se refiere a la estructuración de la molécula del antibiótico en el medio de cultivo, a partir de la formación de dos subunidades en dos cepas distintas, con alteraciones diferentes en los pasos metabólicos de la biosíntesis, dando como resultado cepas secretoras (las que producen el metabolito inactivo), y cepas convertidoras (las que activan el metabolito para hacerlo funcional). Las segundas (las convertidoras), están bloqueadas en pasos metabólicos anteriores a las primeras.

Se han encontrado en S. rimosus y S. aureofaciens dos tipos de mutaciones en la producción de tetraciclina:

- a) Las que complementan con todas las cepas
- b) Las que son incapaces de actuar como convertidoras y por lo tanto no complementan.

Las mutaciones encontradas en S. coelicolor A₃(2) para

la biosíntesis de la metilenomicina A, presentan un patrón de complementación mucho más reducido (Kirby y Hopwood, 1977), haciendo difícil la formación del antibiótico a partir de las cepas mutantes inactivas, ya que de 16 de estas cepas diferentes, sólo se obtuvo una que actuó como convertidor (Kirby y Hopwood, 1977).

Uno de los propósitos implícitos en estos fenómenos de cosíntesis, está relacionado, como se mencionó anteriormente, con el estudio de los procesos de regulación genética de plásmidos. El plásmido SCP1 de S. coelicolor carga los genes estructurales para la síntesis de la metilenomicina (Kirby y Hopwood, 1977), y tiene un comportamiento sexual parecido al factor F de las enterobacterias (Vivian, 1971, 1973; Kirby et al, 1975).

En los hongos no hay registros de partículas citoplásmicas para la producción de antibióticos; en P. chrysogenum y A. nidulans, los genes para la biosíntesis de la penicilina son de tipo cromosómico (Sermonti, 1959; 1969; Macdonald, 1973). En cambio en Streptomyces, se encuentran de tipo cromosómico como la actinórrodina en S. coelicolor A₃(2) (Wright y Hopwood, 1976b), y de tipo citoplásmico en S. venezuelae (Akagawa et al, 1975), y en S. coelicolor A₃(2) (Kirby et al, 1975; Wright y Hopwood, 1976a; Kirby y Hopwood, 1977; Lomovskaya et al, 1977). semejantes a algunas bacterias como Streptococcus lactis (Fuchs et al, 1975)..

En A. nidulans se encontró una relación entre la compatibilidad del heterocarion y la producción de penicilina (Cole et al, 1976); en S. coelicolor A₃(2) el factor de fertilidad SCP1 produce la metilenomicina A. En Mucor racemosus (Harris, 1948), se encontró que la antibiosis estaba confinada a uno

de los factores de compatibilidad (cepa -); por lo tanto, no es difícil sospechar que los caracteres genéticos de la producción de los antibióticos, estén relacionados con otros procesos aparentemente distantes, o que se encuentren influenciados por los procesos regulatorios de ellos; pero este aspecto de la antibiosis relacionada a la compatibilidad no fue cubierto en el presente estudio.

Por lo tanto como se observó en los resultados aquí obtenidos, existen patrones de antibiosis contra B. subtilis que no siguen aparentemente el comportamiento nuclear encontrado por Parag y Parag (1974), para el gene de la biosíntesis de la esquizofilina. Desde luego, puede haber divergencia en los resultados, puesto que esos autores indujeron la mutación nuclear a partir de homocariones silvestres, a diferencia de la metodología seguida aquí, que consistió en tomar y probar los silvestres y mutantes establecidos, para seleccionar las cepas productoras, especialmente la cepa 20, que dió un resultado no mendeliano para el carácter ant contra B. subtilis; sin embargo, se encontró posteriormente en la "antibiosis frente a diferentes microorganismos", que la cepa 2 también tiene una interferencia genética en la expresión de la antibiosis de los segregantes de la cruce 20 x 2, ya que en la progenie de la cruce 20 x 1 sí se encontró el comportamiento nuclear de los genes ant-1, ant-2 y ant-3. A pesar de haber ligeras diferencias en la metodología de la "antibiosis frente a B. subtilis" y la "antibiosis frente a diferentes microorganismos", no se obtuvo en ninguno de los dos procesos un comportamiento nuclear 1 : 1 en la inhibición de B. subtilis, por lo que se conside-

raría esta inhibición como un fenómeno genético de probable origen citoplásmico, que no se ha registrado anteriormente en los hongos.

La interacción complementaria (cosíntesis) se vió afectada por el pH y el Medio de Cultivo (ver discusión en el Capítulo III), por razones fisiológicas, ocasionando cambios en la expresión genética de las cepas (ver tabla 22). Sin embargo sí se pudieron obtener fenómenos cosintéticos, pero que dado que el número de cepas que los presentaron fue escaso, no se estableció ningún patrón de complementación comparativo al obtenido por Deli^ć et al (1969). Fue notorio el aumento en la capacidad de cosíntesis en el Medio Mínimo con pH de 5.0 . Los resultados de la cosíntesis obtenidos en este trabajo, no siguieron un patrón claro, para establecer adecuadamente una interpretación general.

Una posible interpretación de estos resultados es la siguiente: Las cepas utilizadas tenían distintos patrones genéticos, que probablemente no se ajustaron para la formación de una molécula determinada (que sería el antibiótico contra B. subtilis, ya que se desconoce la estructura y comportamiento químicos de la(s) molécula(s) antibiótica(s) de S. commune.

Se ha registrado también que aun diferentes mutaciones en los mismos genes para antibiosis, en otros microorganismos, tienen una escasa complementación química , usando el método de la placa de agar (Kirby y Hopwood, 1977).

Otro punto importante que no se había registrado, por lo menos en los hongos, es la inactivación del antibiótico, por medio de los metabolitos secretados por otras cepas inactivas,

o sea, la coinhibición que se presentó en estas cepas de S. commune. Esto denota la presencia de metabolitos secundarios diversos que son secretados por las distintas cepas, que probablemente se complementan químicamente en el medio, restableciendo la molécula normal, que podría ser un polipéptido, un ácido orgánico, etc., que se encontraba incompleta y por lo tanto podía actuar como antibiótico; o también se puede pensar en la inactivación directa del antibiótico de la cepa mutante, sin restablecer el carácter "silvestre" de la molécula, sino dando un derivado cualquiera inactivo.

En algunas ocasiones, se presentó un estado de cosíntesis entre los dos botones de una misma cepa inactiva (ver tablas 20 y 21, cepa 16 vs 16), y en otras la coinhibición entre los dos botones de una cepa inactiva (ver tabla 18, cepa 20 vs 20), la explicación a este fenómeno puede ser la presencia de una zonación genética o fisiológica en el micelio de donde se tomaron los botones para las pruebas; tal efecto no ha sido desechado de la interpretación de los resultados de la cosíntesis, ya que se sabe hay un crecimiento diferente en las zonas periféricas y las centrales en las colonias de hongos filamentosos (Sermoniti, 1969), influenciado también por la acción de los factores ambientales (Brandt, 1953), y por lo tanto sería diferente el metabolismo dentro de la misma cepa. Por otro lado, es muy conocida la formación de sectores en las colonias de hongos filamentosos, que llevan diferencias en su carga genética, respecto al resto de la colonia; y dado que la herencia de la inhibición de B. subtilis, en la cruce de las cepas 20 x 1, durante el mapeo de los genes ant (ant-1, ant-2 y ant-3), tuvo una segregación que se podría pensar como citoplásmica,

se consideraría que estas cepas posiblemente puedan tener una interferencia de algún tipo de ADN extranuclear, o que el antibiótico que forman (sobretudo la cepa 1) está ligado a un sistema metabólico secundario, que sería muy susceptible de reprimir o inducirse por la manipulación de las cepas en el laboratorio.

La partícula citoplásmica SCP1⁺, que carga la información para la síntesis del antibiótico en S. coelicolor A₃(2), actúa de manera infecciosa en las cepas inactivas SCP1⁻, incluso en cruza interespecíficas (Kirby y Hopwood, 1977). Esto no se compara con los resultados de complementación genética en las pruebas hechas aquí, puesto que al formar los heterocarios, la mayor parte de las cepas perdieron su actividad, denotando más bien una recesividad de los genes de antibiosis en heterocigosis (por ejemplo en algunos dicarios en donde intervino la cepa 20), a semejanza de los procesos genéticos que se conocen en las cepas de Penicillium chrysogenum y Aspergillus nidulans, en la producción de penicilina. No se presentó un patrón bien definido del comportamiento genético de los dicarios que presentaron la antibiosis, puesto que probablemente cargaban los genes para antibiosis de manera homociga, codominante o heterociga dominante, pero dado que se desconocía la carga genética para la antibiosis de las diferentes cepas de S. commune, no se puede hacer una extrapolación, hasta determinar más extensamente las propiedades genéticas de estas cepas e isogenizarlas para el carácter ant, pensando en la posible intervención de distintos genes ant que se encuentren en cada una de ellas.

El proceso de mapeamiento de los genes ant-1, ant-2 y ant-3, permitió observar que son varios los caracteres genéticos con potencialidad antibiótica, pero también que hay un comportamiento probablemente citoplásmico para otros genes de antibiosis, que no se habían observado en los hongos, y puede estar dado por el material genético de algunos organelos como la mitocondria, microorganismos endosimbiontes, o partículas de ADN citoplásmicas libres (algún tipo de virus o plásmido). Los estudios para determinar el origen y comportamiento genético profundo de la antibiosis, están en proceso en este laboratorio.

Los intentos para inducir con UV cepas ant activas, contra B. subtilis, fueron negativos, a diferencia de los resultados de Parag y Parag (1974), en donde la UV fue un mutágeno eficaz para la inducción de cepas ant nucleares.

Pueden ser dos las razones que expliquen la incapacidad de la UV:

a) La cepa silvestre probada (cepa 1), no es susceptible de formar el antibiótico específico contra B. subtilis cuando se usa la UV como único agente mutagénico, sino que se necesita otro agente sinérgico, como se ha observado para otros microorganismos, para obtener mejores resultados (Alikhanian et al., 1959).

b) Posiblemente no exista en esa cepa de S. commune la codificación genética para la formación de tal antibiótico, a semejanza de la incapacidad de formación de la metilnomicina A en S. coelicolor A₃(2), donde las cepas SCP1⁻ no pueden ser inducidas a producir el antibiótico, puesto que carecen de los

genes estructurales para formarlos (Kirby et al., 1975).

Capítulo V: Papel de la Cafeína en la Antibiosis

Trabajos Previos

La cafeína es un análogo de las purinas, con grupos metilo en las posiciones 1, 3 y 7 (Kihlman, 1974). Se conoce actualmente su actividad como mutágeno que actúa inhibiendo a las enzimas reparadoras del ADN durante la fotorreparación (Doneson y Shankel, 1964; Kihlman, 1974), y su posible efecto antimutagénico (Barfknecht y Shankel, 1975); y en Schizophyllum propiamente, también en la reparación oscura (Dubovoy y Muñoz, en preparación).

Otros papeles sumamente importantes son: el que tiene en la elevación de los niveles del Adenosín 3' - 5' - Monofosfato Cíclico (AMPcíclico), al inhibir a la fosfodiesterasa, que es la enzima degradadora. También el de la inhibición de la síntesis de proteínas, como se ha demostrado en levaduras y en E. coli (Putrament et al, 1972).

Se sabe que la cafeína tiene una inespecificidad enorme dentro de la célula, y esta toxicidad se ha encontrado que actúa en la susceptibilidad de los microorganismos a algunos antibióticos. Sundar-Raj y Dhala (1965) encontraron que la cafeína hace sensibles a ciertos antibióticos a algunas bacterias que eran resistentes y en otros casos la cafeína favorecía la supervivencia de las bacterias cuando se trataba de otro antibiótico. Encontraron que el efecto antimicrobiano fue elevado cuando se trató con cafeína y tetraciclina; de manera inversa, encontraron que la estreptomycin tenía poco efecto cuando se encontraba la cafeína en el medio.

En el presente estudio, se observó la presencia de la ca-

feína como un posible efecto sobre la expresión de la actividad antibiótica de 22 cepas de Schizophyllum (silvestres y mutantes establecidos); y por otro lado, el papel de la cafeína como mutágeno para una posible obtención de cepas productoras de antibióticos.

Cafeína como Suplemento en el Medio

Se probaron 22 de los 23 homocariones dados en la tabla 1, con el fin de comparar su patrón de antibiosis a las concentraciones de cafeína en el medio (Medio Mínimo) de 1.0 y 0.5 mg/ml. Los resultados de dichas pruebas se encuentran en la tabla 27, donde se observa que la mayor parte de los signos de antibiosis positiva obtenidos en medio sin cafeína (ver Capítulo III) no se presentan, y la cepa 20 mantiene el mayor espectro de antibiosis (S. aureus, S. lutea y E. coli, en ambas concentraciones de cafeína), la cepa 12 presenta antibiosis contra S. typhi Ty2 en 1.0 y 0.5 mg/ml; y la cepa 23 presenta antibiosis en la baja concentración de cafeína contra C. albicans, haciendo notar que en medio sin cafeína no posee esta propiedad.

Cafeína y/o UV como Mutágenos

Como anteriormente se mencionó, se ha comprobado el papel mutagénico de la cafeína por intervenir en la función de la fotorreparación, la reparación obscura y la reparación recombinacional (postreplicación) del ADN, cuando se provocan lesiones con UV. Algunos autores han tratado de establecer si también por ser un análogo de las purinas, es posible que entre a formar parte del ADN íntegramente y cause las mutaciones de esta manera; pero la mayoría de los autores se inclina por la inhibición de la reparación, que ha sido ampliamente comproba-

Tabla 27. Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de los silvestres y mutantes establecidos, en Medio Mínimo + 1.0 y 0.5 mg/ml de cafeína, frente a diferentes microorganismos, en T-30 37°C; pH= 7.0

Nº de la cepa	<i>E. subtilis</i>	<i>S. paratyphi-A</i>	<i>S. aureus</i> 6538	<i>Sh. dysenteriae</i>	<i>E. coli</i> poli-B	<i>S. lutea</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Pseudomonas</i> (a)	<i>S. aureus</i> 13150	<i>S. paratyphi-B</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>Sh. sonnei</i>	<i>S. typhi</i> Ty2	<i>E. coli</i> SF2124	<i>E. coli</i> PMD9	<i>E. coli</i> PML21
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* = 1 mg/ml cafeína

Tabla 28. Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de los 15 mutantes supresores, obtenidos por acción de UV y/o cafeína (trabajo en preparación de Dubovoy y Muñoz); frente a diferentes microorganismos, en Medio Completo y Medio Mínimo a T= 30—37°C ; pH= 7.0

Nº de la cepa	<u>B. subtilis</u>	<u>S. paratyphi-A</u>	<u>S. aureus 6538</u>	<u>Sh. dysenteriae</u>	<u>E. coli poli-B</u>	<u>S. lutea</u>	<u>C. albicans</u>	<u>Pseudomonas (a)</u>	<u>S. aureus 13150</u>	<u>S. paratyphi-B</u>	<u>S. enteritidis</u>	<u>Sh. sonnei</u>	<u>S. typhi Ty2</u>	<u>E. coli SF2124</u>	<u>E. coli PMB9</u>	<u>E. coli PM121</u>
1 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 a	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M	C M

C= Medio Completo
M= Medio Mínimo

da, y cuyo efecto también depende de la concentración de la cafeína (Barfknecht y Shankel, 1975).

Por lo tanto, se tomaron al azar 15 cepas mutantes obtenidas por diversos tratamientos de cafeína y/o UV (Dubovoy y Muñoz, en preparación) que están representadas en la tabla 2, para probar su actividad antibiótica contra diferentes microorganismos en MC y MM a pH de 7.0 .

Los resultados de dichas pruebas se encuentran en la tabla 28, que contiene únicamente una cepa (8a) que tuvo actividad antibiótica contra S. aureus 6538 en MM, y contra S. lutea en MC. Por lo tanto, la producción de antibiótico(s) en estos mutantes fue sumamente escasa.

Discusión

Los procesos de diferenciación y metabolismo secundario están muy ligados (Smith y Berry, 1974), y la cafeína como suplemento en el medio de cultivo ha probado ser un factor que detiene la diferenciación en Schizophyllum commune (Dubovoy y Muñoz, 1977 en prensa), por lo tanto, los resultados que se obtuvieron en las pruebas de Medio Mínimo + 1.0 y 0.5 mg/ml de cafeína, en donde la mayoría de las cepas productoras se inactivaron, prueban que los antibióticos de S. commune son productos de los procesos metabólicos secundarios de las cepas; y para el caso de las cepas que mantuvieron la antibiosis (por ejemplo la cepa 20), o se indujeron como productoras (cepa 23), se puede pensar en un sistema de producción resistente a la cafeína; tal vez una síntesis de proteínas específica resistente a la cafeína, ya que Putrament et al (1972) la han registrado como inhibidora de síntesis de proteínas en levadura y en

E. coli.

En el caso de la cepa que se indujo como productora, se puede postular la aparición de un nuevo patrón metabólico, inducido fisiológicamente, al inhibirse la síntesis de proteínas de las vías primarias y la mayoría de las secundarias, que siendo resistente a la acción de la cafeína, fue favorecido para presentarse en el medio de cultivo que tuvo un papel "selectivo". Por otro lado, está la potencialidad mutagénica de la cafeína, que se ha reconocido en S. commune (Dubovoy y Muñoz, 1977 en prensa), que pudo haber inducido a esta cepa como un nuevo mutante productor, con la antibiosis resistente a la cafeína.

Es importante hacer notar la acción de la cafeína sobre los organismos de prueba, pues se conoce la alteración que puede tener esta metilxantina en la respuesta bacteriana de la sensibilidad a los antibióticos (Sundar-Raj y Dhala, 1965), por lo tanto, es factible que algunas de las cepas que eran sensibles, se les haya conferido resistencia por medio de la cafeína, provocando cambios en el patrón de antibiosis de las cepas de S. commune.

Se ensayó el efecto sinérgico de la cafeína, con la mutagenicidad de la luz ultravioleta (Dubovoy y Muñoz, en preparación) para obtener mutantes supresores y revertantes de ciertos loci, independiente de los loci ant; pero dado que hay diferentes respuestas entre los microorganismos a los mutágenos, se ha ensayado la acción de diferentes de ellos en forma aislada o bajo tratamientos, combinando su acción (Alikhanian et al., 1959; Sermonti, 1969), con el fin de obtener sinérgico-

mo en la obtención de las mutaciones de producción y mejoramiento de los antibióticos, por lo tanto, como se observó en los resultados de las cepas mutantes supresoras de niacina (tabla 28), los tratamientos con diferentes combinaciones de UV y/o cafeína, fueron poco eficaces para obtener cepas ant. Haciendo notar que la UV como único mutágeno (Capítulo IV) y la actividad de la cafeína en el medio (mencionado anteriormente, también como único posible mutágeno), fueron de igual modo poco eficaces.

Discusión General

La continuación de los estudios genéticos, fisiológicos y bioquímicos de la producción de antibióticos en Schizophyllum commune, darían posibilidades de abrir nuevos campos de investigación en otros hongos diferentes de Penicillium, Aspergillus y Cephalosporium.

Son bastantes los registros de hongos productores que se han encontrado en forma natural (Hervey, 1947; Locquin y Locquin, 1947II,III; 1948IV; Florey et al., 1949I,II; Broadbent, 1966), desde hongos inferiores (Harris, 1948; Florey et al., 1949I; Van Dijk y Somer, 1958; Broadbent, 1966; Wang et al., 1972; Ellis et al., 1974), hasta superiores, tanto ascomicetos (Hervey, 1947; Locquin y Locquin, 1947II,III; 1948IV; Florey et al., 1949I,II; Fasolo et al., 1972; Nair y Carey, 1975II,IV; Carey y Nair, 1975III,V), como basidiomicetos (Hervey, 1947; Locquin y Locquin, 1947II,III; 1948IV; Locquin et al., 1948; Florey et al., 1949I; Burton, 1950; Wilkins, 1954; Santoro y Casida, 1962; Broadbent, 1966; Gasco et al., 1974). Dado que los antibióticos se presentan sin un patrón de relación filo-

genética, más bien parece ser un carácter que se adquiere al azar. Los otros microorganismos que presentan una gran capacidad de formación de antibióticos son los Streptomyces; y es también abundante el aislamiento de especies o cepas nuevas, con propiedades de antibiosis, que se están efectuando constantemente (Vanék et al, 1958; Kanda et al, 1975; Kitahara y Kandal 1975; Kubota et al, 1975; Omura et al, 1976).

La variabilidad genética que permite la elaboración de los antibióticos en la Naturaleza, no está bien entendida; sin embargo los descubrimientos de la transferencia de ADN para producción y resistencia a los antibióticos (Kirby et al, 1975; Courvalin et al, 1977; Lomovskaya et al, 1977), hace suponer que no solamente han habido cambios a nivel de mutaciones en el ADN (y por lo tanto en los patrones fisiológicos) de la codificación genética cromosómica, sino también la intervención de ADN extraño en la célula inactiva, para convertirla en productora por la presencia de esta partícula (u organismo) con ADN.

La mutación azul que presenta la cepa 20, tal vez intervenga en toda o la mayor parte de su potencialidad inhibitoria, y por lo tanto, sería interesante conocer a qué nivel, si existe, de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Tatum y Bonner, 1944; Hütter y DeMoss, 1967; Crawford, 1975; Tilby, 1976) se desprende la formación del(los) antibiótico(s), puesto que se sabe que estos mutantes azules de S. commune son frecuentes en la Naturaleza (Swack y Miles, 1960).

Puesto que hay grandes dificultades para la iniciación de los trabajos genéticos y fisiológicos en cepas silvestres,

sería bastante adecuada la experimentación de la acción antibiótica, haciendo uso de las cepas establecidas para fines genéticos, dado que el número de cepas existentes de los distintos hongos que así se trabajan, es considerable.

Son tres los puntos principales que fundamentan el interés por la investigación de los mecanismos de la antibiosis:

- a) El farmacéutico, para encontrar nuevas variantes en la gama de antibióticos con fines médicos.
- b) El uso de ellos como nuevas herramientas en la investigación de los sistemas celulares, por ejemplo, la inhibición de ciertas vías metabólicas, la acción mutagénica de algunos, etc.
- c) La interpretación de los procesos evolutivos y ecológicos en los seres vivos, sobretodo en los microorganismos de los suelos.

Bibliografía.

- Alexopoulos, C.J. 1962. Introductory Mycology, 2^a Ed. Wiley. Nueva York.
- Alikhanian, S.I. y L.N. Borisova. 1961. Recombination in Actinomyces aureofaciens. J. Gen. Microbiol. 26: 19-28.
- Alikhanian, S.I., Mindlin, S.Z., Goldat, S.U. y A.V. Vladimirov. 1959. Genetics of organisms producing tetracyclines. Some regularities in induced variation and selection of tetracycline producing actinomycetes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 81: 914-949.
- Akagawa, H., Okanishi, M. y H. Umezawa. 1975. A plasmid involved in chloramphenicol production in Streptomyces venezuelae: Evidence from genetic mapping. J. Gen. Microbiol. 90: 336-346.
- Arkin, H. y R.R. Colton. 1967. Tables for Statisticians, 2^a Ed. Barnes & Noble. Nueva York.
- Backus, M.P. y J.F. Stauffer. 1955. The production and selection of a family of strains in Penicillium chrysogenum. Mycologia 47: 429-463.
- Ball, C. 1973. The genetics of penicillin production in Penicillium chrysogenum. (Resumen). Heredity 31: 132.
- Basu Chaudhary, K.C. y S. Gupta. 1971. Mutagenic effect of UV-light and X-rays on Streptomyces nigrifaciens and yield of the antifungal substance. Experientia 27: 706-707.
- Barfknecht, T.R. y D.M. Shankel. 1975. The effect of streptomycin resistance, caffeine and acriflavine on ultraviolet light-induced reversion to tryptophan independence in strains of Escherichia coli B/r. Mut. Res. 30: 163-176.

- Bergey. 1974. Manual of Determinative Bacteriology, 8^a Ed. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Berry, D.R. 1975. The Environmental Control of the Physiology of Filamentous Fungi. In The Filamentous Fungi, vol. I, Industrial Mycology, pp. 16-32. Editado por J. E. Smith y D.R. Berry. Londres. Arnold.
- Bradley, S.G. y L.A. Jones. 1960. Mechanisms of action of antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 89: 122-133.
- Brandt, W.H. 1953. Zonation in a prolines strain of Neurospora. Mycologia 45: 194-208.
- Broadbent, D. 1966. Antibiotics produced by fungi. Bot. Rev. 32: 219-242.
- Bull, A.T. y M.E. Bushell. 1976. Environmental Control of Fungal Growth. In The Filamentous Fungi, vol. II, Biosynthesis and Metabolism, pp. 1-31. Editado por J.E. Smith y D.R. Berry. Londres. Arnold.
- Bu'Lock, J.D. 1975. Secondary Metabolism in Fungi and its Relationships to Growth and Development. In The Filamentous Fungi, vol. I, Industrial Mycology, pp. 33-58. Editado por J.E. Smith y D.R. Berry. Londres. Arnold.
- Burton, H.S. 1950. An antibiotic, thermophilin, from Leizites thermophila. Nature 165: 570.
- Chakrabarty, S.L. y P. Nandi. 1971. A new actinomycin-like antibiotic produced by a mutant strain of Streptomyces indicus. Experientia 27: 595-596.
- Calam, G.T. 1973. Changes in the metabolism of mutants during strain improvement programmes. (Resumen). Heredity 31: 132.

- Calderón, S. Comunicación personal.
- Carey, S.T. y M.S.R. Nair. 1975. Metabolites of Pyrenomyces III. Production of (+) skyrin by Hypomyces trichothecoides. Lloydia 38: 357-358.
- Carey, S.T. y M.S.R. Nair. 1975. Metabolites of Pyrenomyces V. Identification of an antibiotic from two species of Nectria, as cephalochromin. Lloydia 38: 448-449.
- Cochrane, V.W. 1958. Physiology of Fungi. Wiley. Nueva York.
- Cohen, B.L. 1973. Control of extracellular protease in Aspergillus nidulans. (Resumen). Heredity 31: 132-133.
- Cole, D.S., Holt, G. y K.D. Macdonald. 1976. Relationship of the genetic determination of impaired penicillin production in naturally occurring strains to that in induced mutants of Aspergillus nidulans. J. Gen. Microbiol. 96: 423-426.
- Courvalin, P., Weisblum, B. y J. Davies. 1977. Aminoglycoside-modifying enzyme of antibiotic-producing bacterium acts as a determinant of antibiotic resistance in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 999-1003.
- Crawford, I.P. 1975. Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. Bacteriol. Rev. 39: 87-120.
- Clutterbuck, A.J. 1974. Aspergillus nidulans. In Handbook of Genetics, vol. I, Bacteria, Bacteriophages and Fungi, pp. 447-510. Editado por R.C. King. Londres y Nueva York. Plenum Press.

- Delić, V., Pigac, J. y G. Sermonti. 1969. Detection and study of cosynthesis of tetracycline antibiotics by an agar method. *J. Gen. Microbiol.* 55: 103-108.
- Doneson, I.N. y D.M. Shankel. 1964. Mutational synergism between radiations and methylated purines in Escherichia coli. *J. Bacteriol* 87: 61-67.
- Dubovoy, C. 1973. A class of genes controlling B-factor regulated development in Schizophyllum commune. Tesis Doctoral. Universidad de Harvard, Cambridge, Mass.
- Dubovoy, C. 1976. A class of genes affecting B factor-regulated development in Schizophyllum commune. *Genetics* 82: 423-428.
- Dubovoy, C. y A. Muñoz. 1977. Anormalidades de los cuerpos fructíferos de Schizophyllum commune Fr. en medios con metilxantinas. *Bol. Soc. Mex. Micol.* 12 (en prensa.)
- Dubovoy, C. y A. Muñoz. Efecto de la luz ultravioleta y la cafeína en Schizophyllum commune Fr. en preparación.
- Elander, R.P. 1975. Genetic Aspects of Cephalosporin and Cephamycin-Producing Microorganisms. *In* Development in Industrial Microbiology, vol. 16, pp. 356-374. Editado por American Institute of Biological Sciences. Washington, D.C.
- Ellis, J.J., Wang, H.L. y C.W. Hesseltine. 1974. Rhizopus and Chlamydomucor strains surveyed for milk-clotting, amylolytic, and antibiotic activities. *Mycologia* 66: 593-599.
- Fasolo Bonfante, P., Ceruti Scurti, J. y F. Obert. 1972. Interazione di Tuber melanosporum Vitt. con miceli di altri funghi. *Allionia* 18: 53-59.

- Fincham, J.R.S. y P.R. Day. 1965. Fungal Genetics, 2^a Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Fincham, J.R.S. 1966. Genetic Complementation. W.A. Benjamin. Nueva York.
- Florey, H.W., Chain, E., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P., y M.E. Florey. (Eds). 1949. Antibiotics, vol I y II. Oxford University Press. Londres.
- Freeman, R.F., Bibb, M.J. y D.A. Hopwood. 1977. Chloramphenicol acetyltransferase-independent chloramphenicol resistance in Streptomyces coelicolor A₃(2). J. Gen. Microbiol. 98: 453-465.
- Frobisher, M., Hinsdill, R.D., Crabtree, K.T. y C.R. Goodheart. 1974. Fundamentals of Microbiology, 9^a Ed. Saunders. Philadelphia.
- Fuchs, P.G., Zajdel, J. y W.T. Dobrzański. 1975. Possible plasmid nature of the determinant for production of the antibiotic nisin in some strains of Streptococcus lactis. J. Gen. Microbiol. 88: 189-192.
- Gasco, A., Serafino, A., Mortarini, V., Menziani, E., Bianco, M.A. y J. Ceruti Scurti. 1974. An antibacterial and antifungal compound from Galvatia lilacina. Tetrahedron Lett. 38: 3431-3432.
- Gottlieb, D. y P.D. Shaw. (Eds.). 1967. Antibiotics, vol. I: Mecanism of Action, vol. II: Biosynthesis. Springer-Verlag. Nueva York.
- Grove, D.C. y W.A. Randall. 1955. Assay Methods of Antibiotics. Medical Encyclopaedia. Nueva York.

- Harris, H.A. 1948. Heterothallic antibiosis in Mucor racemosus. Mycologia 40: 347-351.
- Herrera, T., comunicación personal.
- Herrera, T. y M. Ulloa. 1975. Antagonismo del pozol y de Agrobacterium azotophilum sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre. Rev. Lat-amer. Microbiol. 17: 143-147.
- Hervey, A.H. 1947. A survey of 500 basidiomycetes for antibacterial activity. Bull. Torrey Bot. Club. 74: 476-503.
- Holt, G. y K.D. Macdonald. 1968. Isolation of strains with increased penicillin yield after hybridization in Aspergillus nidulans. Nature 219: 636-637.
- Hopwood, D.A., Chater, K.F., Dowding, J.E. y A. Vivian. 1973. Advances in Streptomyces coelicolor genetics. Bacteriol. Rev. 37: 371-405.
- Hütter, R. y J.A. DeMoss. 1967. Organization of the tryptophan pathway: a phylogenetic study of the fungi. J. Bacteriol. 94: 1896-1907.
- Johnson, M.J. 1946. Metabolism of penicillin-producing molds. Ann. N.Y. Acad. Sci. 48: 57-66.
- Johnston, J.R. 1975. Strain Improvement and Strain Stability in Filamentous Fungi. In The Filamentous Fungi, vol. I, Industrial Mycology, pp. 59-78. Editado por J.E. Smith y D.R. Berry. Londres. Arnold.
- Kanda, N., Ishizaki, N., Inoue, N., Oshima, M., Handa, A., y T. Kitahara. 1975. DB-2073. a new alkylresorcinol antibiotic I. Taxonomy, isolation and characterization. J. Antibiot. 28: 935-942.

- Kihlman, B.A. 1974. Effects of caffeine on the genetic material. *Mut. Res.* 26: 53-71.
- King, R.C. 1974. *A Dictionary of Genetics*, 2^a Ed. Oxford University Press. Nueva York.
- Kirby, R. y D.A. Hopwood. 1977. Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of Streptomyces coelicolor A₃(2). *J. Gen. Microbiol.* 98: 239-252.
- Kirby, R., Wright, L.F. y D.A. Hopwood. 1975. Plasmid determined antibiotic synthesis and resistance in Streptomyces coelicolor. *Nature* 254: 265-267.
- Kitahara, T. y N. Kanda. 1975. DB-2073, a new alkylresorcinol antibiotic II. The chemical structure of DB-2073. *J. Antibiot.* 28: 943-946.
- Krueger, R.G., Gillham, N.W. y J.H. Coggin. 1973. *Introduction to Microbiology*, Macmillan. Nueva York.
- Kubota, T., Hino, H., Mayama, M., Motokawa, K., e Y. Yasuda. 1975. Antibiotic A-130, Isolation and characterization. *J. Antibiot.* 28: 931-934.
- Lehninger, A.L. 1975. *Biochemistry*, 2^a Ed. Worth. Nueva York.
- Locquin, J. y M. Locquin. 1947. Les antibiotiques d'origine fungique. *Revue bibliographique II. Revue Mycol.* 12: 83-96.
- Locquin, J. y M. Locquin. 1947. Les antibiotiques d'origine fungique. *Revue bibliographique III. Revue Mycol.* 12: 146-158.

- Locquin, J. y M. Locquin. 1948. Les antibiotiques d'origine fungique. Revue bibliographique IV. Revue Mycol. 13: 135-144.
- Locquin, M., Locquin, J. y A.R. Prevost. 1948. Recherches sur l'acide unguinique (= acide polyporénique A) antibiotique produit par Ungulina betulina. Revue Mycol. 13: 3-9.
- Lomovskaya, N.L., Voeykova, T.A. y N.M. Mkrtumian. 1977. Construction and properties of hybrids obtained in interspecific crosses between Streptomyces coelicolor A3(2) and Streptomyces griseus Kr. 15. J. Gen. Microbiol. 98: 187-198.
- Macdonald, K.D. 1964. Preservation of the heterozygous diploid condition in industrial micro-organisms. Nature 204: 404-405.
- Macdonald, K.D., Hutchinson, J.M. y W.A. Gillett. 1964. properties of heterozygous diploids between strains of Penicillium chrysogenum selected for high penicillin yield. Antoine van Leeuwenhoek 30: 209-224.
- Macdonald, K.D. 1968. The persistence of parental genome segregation in Penicillium chrysogenum after nitrogen mustard treatment. Mut. Res. 5: 302-305.
- Macdonald, K.D. 1971. Segregants from a heterozygous diploid of Penicillium chrysogenum following different physical and chemical treatments. J. Gen. Microbiol. 67: 247-250.

- Macdonald, K.D., Ditchburn, P. y G. Holt. 1973. The genetics of penicillin production in Aspergillus nidulans. (Resumen). *Heredity* 31: 131-132.
- Macdonald, K.D. 1973. Genetics of Penicillin Production in Penicillium chrysogenum and Aspergillus nidulans. In *Genetics of Industrial Microorganisms*, pp. 255-264. Editado por Z. Vanék, Z. Hostalek y J. Cudlín. Praga. Academia.
- Marchant, R., Raudaskoski, M., e Y. Shneyour. 1976. Ultrastructure of an indigotin-producing dome mutant of Schizophyllum commune. *J. Gen. Microbiol.* 96: 333-339.
- Mateles, N.I. y G.N. Wogan. 1967. Aflatoxins. In *Advances in Microbial Physiology*, vol. I, pp. 25-37. Editado por Rose A.H. y J.F. Wilkinson. Londres y Nueva York. Academic Press.
- Merrick, M.J. 1975(a). Hybridization and selection for increased penicillin titre in wild-type isolates of Aspergillus nidulans. *J. Gen. Microbiol.* 91: 278-286.
- Merrick, M.J. 1975(b). The inheritance of penicillin titre in crosses between lines of Aspergillus nidulans selected for increased productivity. *J. Gen. Microbiol.* 91: 287-294.
- Merrick, M.J. y C.E. Caten. 1975. The inheritance of penicillin titre in wild type isolates of Aspergillus nidulans. *J. Gen. Microbiol.* 86: 283-293.
- Miles, P.G., Lund, H. y J.R. Raper. 1956. The identification of indigo as a pigment produced by a mutant culture of Schizophyllum commune. *Arch. Biochem. Biophys.* 62: 1-5.

- Mitsubishi, S. (Ed.). 1975. Drug Action and Drug Resistance in Bacteria, vol. II: Aminoglycoside Antibiotics. University of Tokyo Press. Japan.
- Nair, M.S.R. y S.T. Carey. 1975. Metabolites of Pyrenomyces II: Nectriapyrone, an antibiotic monoterpene. Tetrahedron Lett. 19: 1655-1658.
- Nair, M.S.R. y S.T. Carey. 1975. Metabolites of Pyrenomyces IV: Rosellisin, an antibiotic α -pyrone from Hypomyces rosellus. Tetrahedron Lett. 41: 3517-3518.
- O'Sullivan, Ch. y S.J. Pirt. 1973. Penicillin production by lysine auxotrophs of Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol. 76: 65-75.
- Olutiola, P.O. 1976. Some environmental and nutritional factors affecting growth and sporulation of Aspergillus flavus. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 131-136.
- Omura, S., Kitao, Ch., Tanaka, H., Oiwa, R., Takahashi, Y., Nakagawa, A., Shimada, M. e Y. Iwai. 1976. A new antibiotic, asukamycin, produced by Streptomyces. J. Antibiot. 29: 876-881.
- Parag, Y. y G. Parag. 1974. Plaque formation in Bacillus subtilis, and growth inhibition of Bacillus subtilis and Sarcina sp., induced by Schizophyllum commune. Can. J. Microbiol. 20: 1754-1757.
- Petit, C. y G. Pevost. 1972. Genética y Evolución, 2^a Ed. Omega. Barcelona.
- Pittenger, R.C. y E. McCoy. 1953. Variants of Streptomyces griseus induced by ultraviolet radiations. J. Bacteriol. 65: 56-64.
- Polsinelli, M., Albertini, A., Cassani, G. y O. Ciferri. 1965. Relation of biochemical mutations to actinomycin

synthesis in Streptomyces antibioticus. J. Gen. Microbiol. 39: 239-246.

- Putrament, A., Baranovska, H., Biliński, T. y W. Prazmo. 1972. On the specificity of caffeine effects. Inhibition by caffeine of RNA and protein synthesis in yeast and Escherichia coli. Molec. Gen. Genet. 118: 373-379.
- Raper, R. J. 1966. Genetics of Sexuality in Higher Fungi. Ronald. Nueva York.
- Raper, J.R. y R.M. Hoffman. 1974. Schizophyllum commune. In Handbook of Genetics, vol. I: Bacteria, Bacteriophages and Fungi, pp. 597-626. Editado por R.C. King. Londres y Nueva York. Plenum Press.
- Raper, K.B. 1946. The development of improved penicillin producing molds. Ann. N.Y. Acad. Sci. 48: 41-55.
- Raper, K.B. 1952. A decade of antibiotics in America. Mycologia 44: 1-59.
- Righelato, R.C. 1975. Growth Kinetics of Mycelial Fungi. In The Filamentous Fungi, vol. I, Industrial Mycology, pp. 79-103. Editado por J.E. Smith y D.R. Berry. Londres. Arnold.
- Robbins, W.J., Kavanagh, F. y A. Hervey. 1946. Production of antibiotic substances by basidiomycetes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 48: 67-72.
- Salinas, C., comunicación personal.
- Santoro, T. y L.E. Casida. 1962. Elaboration of antibiotics by Boletus luteus and certain other mycorrhizal fungi. Can. J. Microbiol. 8: 43-48.

- Savage, G.M. 1949. Improvement in streptomycin-producing strains of Streptomyces griseus by ultraviolet and X-ray energy. J. Bacteriol. 57: 429-441.
- Sermonti, G. 1959. Genetics of penicillin production. Ann. N.Y. Acad. Sci. 81: 950-966.
- Sermonti, G. 1969. Genetics of Antibiotic-Producing Microorganisms. Wiley-Interscience. Londres.
- Shier, W.T., Rinehart, K.L. y D. Gottlieb. 1969. Preparation of four new antibiotics from a mutant of Streptomyces fradiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 63: 198-204.
- Smith, J.E. y D.R. Berry. 1974. An Introduction to Biochemistry of Fungal Development. Academic Press, Londres y Nueva York.
- Somkuti, G.A. y M.M. Walter. 1970. Antimicrobial polypeptide synthesized by Mucor pusillus NRRL 2543 (34563). Proc. Soc. Exp. Biol. 133: 780-785.
- Sundar-Raj, C.V. y S. Dhala. 1965. Effect of naturally occurring xantines on bacteria. I. Antimicrobial action and potentiating effect on antibiotic spectra. Appl. Microbiol. 13: 432-436.
- Swack, N.S. y P.G. Miles. 1960. Conditions affecting growth and indigotin production by strain 130 of Schizophyllum commune. Mycologia 52: 574-583.
- Tatum, E.L. y D. Bonner. 1944. Indole and serine in the biosynthesis and breakdown of tryptophane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 30: 30-36.
- Tilby, M.J. 1976. Tryptophan biosynthesis in Coprinus lagopus: A genetic analysis of mutants. J. Gen. Microbiol. 93: 126-132.

- Turner, W.B. 1971. Fungal Metabolites. Academic Press. Londres y Nueva York.
- Turner, W.B. 1975. Commercially Important Secondary Metabolites. In The Filamentous Fungi, vol. I, Industrial Mycology, pp. 122-139. Editado por J.E. Smith y D.R. Berry. Londres. Arnold.
- Vanek, Z., Dolezilova, L. y Z. Rehacek. 1958. Formation of a mixture of antibiotic substances including antibiotics of a poliene character, by strains of Actinomycetes freshly isolated from soil samples. J. Gen. Microbiol. 18: 649-657.
- Van Dijck, P.J. y P. de Somer. 1958. Ramycin: A new antibiotic. J. Gen. Microbiol. 18: 377-381.
- Vivian, A. 1971. Genetic control of fertility in Streptomyces coelicolor A₃(2): plasmid involvement in the interconversion of UF and IP strains. J. Gen. Microbiol. 69: 353-364.
- Vivian, A. 1973. A new kind of donor strain in Streptomyces coelicolor. (Resumen). Heredity 31: 136.
- Waksman, S.A., Schatz, A. y D.M. Reynolds. 1946. Production of antibiotic substances by actinomycetes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 48: 73-85.
- Wang, H.L., Ellis, J.J. y C.W. Hesseltine. 1972. Antibacterial activity produced by molds commonly used in oriental food fermentations. Mycologia 64: 218-221.
- White, R.J., Martinelli, E. y G. Lancini. 1974. Ansamycin biogenesis: studies on a novel rifamycin isolated from a mutant strain of Nocardia mediterranei. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 3260-3264.

Wilkins, W.H. 1954. Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of the thirteenth 100 species, all Basidiomycetes. Brit. J. Exp. Path. 35: 28-31.

Wright, L.F. y D.A. Hopwood. 1976(a). Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of Streptomyces coelicolor A₃(2). J. Gen. Microbiol. 95: 96-106.

Wright, L.F. y D.A. Hopwood. 1976(b). Actinorhodin is a chromosomally-determined antibiotic in Streptomyces coelicolor A₃(2). J. Gen. Microbiol. 96: 289-297.