

ESTUDIO FISIOLÓGICO DE LA ANTIBIOSIS
DE *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* *

Por Alfredo Muñoz** y
Celia Dubovoy***

PHYSIOLOGICAL STUDY OF THE ANTIBIOTIC PRODUCTION OF *Schizophyllum commune*

SUMMARY

Schizophyllum commune Fr. a basidiomycete fungus that has been studied in the relative to genetics of the compatibility factors, gives new outlooks for production of antibiotic substances. The record of production of these metabolites is scant. In this work it was tried to know some possibilities of management of *ant* strains (antibiotic production genes) in a physiological point of view (inducing changes in secondary metabolism properties by changes in pH, temperature and culture media composition); to improve antibiotics production.

RESUMEN

El hongo basidiomiceto *Schizophyllum 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 fisiológicamente, para aprovechar las cepas con genes *ant* (antibiosis), 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.

- * Modificación del trabajo de tesis profesional, presentado por A. Muñoz, para obtener el título de Biólogo, en la U.N.A.M.
- ** Departamento de Botánica, Instituto de Biología, U.N.A.M., México, D. F.
- *** Fallecida el 18 de septiembre de 1977.

INTRODUCCION

Schizophyllum commune Fr. es un basidiomiceto Agarical, cuyo ciclo de vida consiste de las siguientes fases (Raper, 1966; Raper y Hoffman, 1974): espora → micelio homocariótico haploide → micelio dicariótico → cuerpo fructífero → basidios (en donde sucede la cariogamia y la meiosis) → esporas. 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 ($A \neq B$) entre uno y otro homocarion, y así se establezcan la migración nuclear de un micelio hacia el otro durante la cruce.

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

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 sustrato; 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 aquél que es necesario para la sobrevivencia del organismo; metabolismo secundario, aquél 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 apoya la idea de que sean el producto de la biosíntesis de las diferentes vías metabólicas secundarias.

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), 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 (Hervey, 1947; Florey *et al.*, 1949; Wilkins, 1954; Backus y Stauffer, 1955).

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; Calam, 1973) y algunos aspectos vagos en basidiomicetos (Turner, 1975).

En un principio se probó *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). Después (Hervey, 1947) (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. 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* (medio completo = MC, y medio mínimo = MM).

El presente trabajo se refiere a la producción de metabolitos de *Schizophyllum commune* con propiedades antibióticas. 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 de los antibióticos en *Schizophyllum*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

Las cepas de *Schizophyllum commune* usadas para el desarrollo de este trabajo, fueron donadas por C. A. Raper. Los 38 tipos de cepas de *S. commune*, comprendían homocariones silvestres y mutantes establecidos, de diferente constitución genética, como se observa en la tabla 1, en donde se presentan la numeración de las cepas como se manejaron en este trabajo, el número original de las cepas, el genotipo y los mutágenos con los que fueron obtenidas.

Para probar la acción antibiótica se utilizaron 18 diferentes tipos de microorganismos (17 bacterias y una levadura), que fueron donados por S. Calderón y Ch. Thomas, y cuyas características se dan en la tabla 2.

Medios de cultivo

Los medios usados fueron los siguientes: medio completo (MC), medio mínimo (MM), medio mínimo + requerimientos (MM+ -); con pH de 5.0 y de 7.0. 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, 2 g. de peptona, 0.5 g. de $MgSO_4$, amortiguador de fosfatos 0.01 M (0.46 g. de KH_2PO_4 y 1 g. de K_2HPO_4 , para proporcionar un pH de 7.0) y 20 g. de agar en 1 000 ml. de agua destilada.

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 $pH\ 5.0 \pm 0.1$, 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.

Para la siembra de los organismos de prueba se utilizaron:

a) Agar nutritivo, cuyos constituyentes son 3 g. de extracto de carne, 5.0 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 en caja de petri un inóculo central de *Schizophyllum* y se incubó a 30°C por 72 horas; una vez que el micelio 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 periodo de 24 horas. En todas las pruebas se hicieron simultáneamente las cajas control adecuadas.

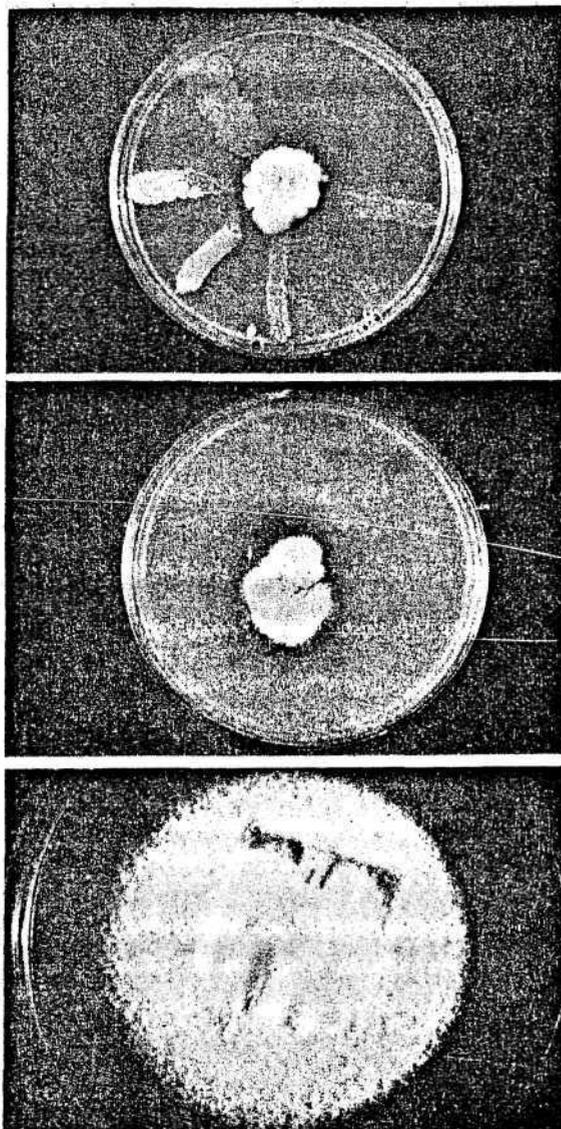
Antibiosis frente a Bacillus subtilis

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 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. 4 ml. 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 periodos 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 (ver figura 2).

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 fun-



FIGS. 1-3. 1: Colonia de *Schizophyllum commune* (centro) con seis cepas de levadura y bacterias. 2: Prueba de *S. commune* con *Bacillus subtilis*. 3: Técnica para estudiar la difusión del antibiótico sobre *S. commune*.

gico durante 72 horas. y a 37°C inmediatamente después de sembrar el bacilo (ver figura 3).

Criterio de cuantificación de la antibiosis

La nomenclatura adoptada fue la siguiente: + cuando hubo una inhibición del crecimiento del organismo de prueba, que fue clara, formando un halo alrededor de la cepa productora del antibiótico. El signo ±, 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.

RESULTADOS

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 3, 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 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 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 observó 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 era de contorno irregular, en otras había micelio aéreo o en ocasiones ambas circunstancias.

TABLE 2
Diferentes tipos de microorganismos de prueba usados

Microorganismo	Marcador
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+
<i>Salmonella paratyphi-A</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+
<i>Escherichia coli</i> poli-B	+
<i>Sarcina lutea</i>	+
<i>Candida albicans</i>	+
<i>Pseudomonas</i> sp. (a)	+
<i>Pseudomonas</i> sp. (b)	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC13150	+
<i>Salmonella paratyphi-B</i>	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+
<i>Shigella sonnei</i>	+
<i>Salmonella typhi</i> Ty2	+
<i>Escherichia coli</i> SF2124	<i>col</i> ⁺ (producción de colicinas)
<i>Escherichia coli</i> PMB9	<i>tetr</i> ⁺ (resistencia a tetraciclina)
<i>Escherichia coli</i> PML21	<i>ban</i> ⁺ (resistencia a banomicina)

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 Hoffman, 1974), como para crecimiento de la bacteria de prueba con el fin de delimitar las condiciones a las cuales se tomaría la lectura de la

antibiosis. Por lo tanto en la tabla 4 se presentan los resultados del experimento usando las mismas cepas que en el anterior, pero con un período 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).

La tabla 4 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 períodos 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 4 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 3 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 3 a 26°C, a las 72 horas de exposición al bacilo).

La tabla 4 presenta un mayor número de respuestas positivas en agar nutritivo, a pesar de que en el agar nutritivo 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 3, T= 32°C con lectura a las 24 horas y tabla 4 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 4) en comparación con la del medio 5 a 26°C a las 72 horas de exposición (tabla 3) 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.
- c) La combinación de temperaturas que se usaron para provocar la optimización del crecimiento fúngico y del organismo de prueba.

Difusibilidad

Dado que se presentaron cambios en la producción del antibiótico contra *B. subtilis* cuando se utilizaron diferentes sustratos para sembrar el organismo

TABLA 3

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

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

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

TABLA 4

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 *B. 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	±	+

TABLA 5

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, 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 6

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	+	-

de prueba, se procedió a probar si el antibiótico era poco difusible en el agar y qué influencia tendrían los nutrientes 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 5 y 6 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 nutrientes orgánicos (tabla 6). 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 en 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; Pittenger y McCoy, 1953).

Antibiosis de las cepas silvestres y de las mutantes establecidas

Estas pruebas se llevaron a cabo en MC 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*).

En la tabla 7 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 8 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 de 7.0 (tabla 7). 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 8 se señala con asterisco la ausencia de creci-

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
		de compatibilidad	de compatibilidad			
1	1-12	$A_{\alpha_1} - \beta_6$	$B_{\alpha_1} - \beta_1$		+	
2	1-60	$A_{\alpha_1} - \beta_5$	$B_{\alpha_3} - \beta_6$		+	
3	1-86	$A_{\alpha_2} - \beta_{22}$	$B_{\alpha_1} - \beta_1^2$		+	
4	3-2	$A_{\alpha_1} - \beta_6$	$B_{\alpha_2} - \beta_1$		+	
5	4-13	$A_{\alpha_1} - \beta_1$	$B_{\alpha_1} - \beta_2$		MIV-11	?
6	4-14	$A_{\alpha_1} - \beta_{110}$	$B_{\alpha_3} - \beta_2$		pub	?
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	$A_{\alpha_3} - \beta_1$	$B_{\alpha_3} - \beta_6$		adc-1	Ultravioleta?
10	8-6	A_{α_1}	B_{11}		arg-6	Ultravioleta?
11	8-7	$A_{\alpha_3} - \beta_5$	$B_{\alpha_3} - \beta_2$		arg-7	Ultravioleta?
12	8-8	$A_{\alpha_3} - \beta_5$	$B_{\alpha_3} - \beta_2$		ino	?
13	8-10	$A_{\alpha_1} - \beta_1$	$B_{\alpha_7} - \beta_4$		nic-3	Ultravioleta?
14	8-11	$A_{\alpha_3} - \beta_5$	$B_{\alpha_3} - \beta_2$		nic-1	Ultravioleta?
15	8-17	$A_{\alpha_1} - \beta_1$	$B_{\alpha_3} - \beta_2$			Ultravioleta?
		ϕ	ϕ		bio	
16	8-20	$A_{\alpha_4} - \beta_6$ $A_{\alpha_1} - \beta_1$	$B_{\alpha_1} - \beta_1$ $B_{\alpha_3} - \beta_2$		pan	Etilmetano
17	8-26	$A_{\alpha_1} - \beta_6$ $A_{\alpha_2} - \beta_2$	$B_{\alpha_1} - \beta_1$ $B_{\alpha_2} - \beta_2$		adc-7	Sulfonato Etilmetano Sulfonato
18	8-28	$A_{\alpha_1} - \beta_1$	$B_{\alpha_3} - \beta_2$		his	Ultravioleta?
19	9-1	$A_{\alpha_3} - \beta_5$	$B_{\alpha_2} - \beta_2$		dom-2	Ultravioleta
20	9-6	A_{10}	B_{10}		blac	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: *MIF*, modificador IV; *pub*, ácido para aminobenzoico; *ALX*, modificador IX; *dik*, diarilosis; *ura*, uracilo, *nic*, ácido nicotínico; *adc*, adenina; *arg*, arginina; *ino*, inositol; *bio*, biotina; *pan*, ácido pantoico; *his*, histina; *dom*, cepulas; *blac*, azul; *fir*, abaco; *puff*, hinchado; *compact*, compacto. Ver Finckham y Bay (1965), Kaper (1966), Kaper y Hoffman (1974) y Dubovoy (1975, 1976).

TABLA 7

Resultados obtenidos para las pruebas de antibiosis de las cepas de *S. commune*, en medio completo y medio mínimo frente a diferentes microorganismos; pH= 7.0, T= 30-37°C.

Número de la cepa	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. paratyphi-A</i>	<i>S. aureus</i> 6538	<i>S. aureus</i> 6538	<i>E. coli</i> poli-B	<i>S. lutea</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Pseudomonas</i> (a)	<i>Pseudomonas</i> (b)	<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> PMB9	<i>E. coli</i> PML21
1																		
2																		
3																		
4			+															
5																		
6																		
7																		
8			+															
9																		
10	+																	
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21																		
22																		
23																		
	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 M

C= medio completo M= medio mínimo

TABLA 8

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

Número de la cepa	<i>B. subtilis</i>	<i>S. paratyphi-A</i>	<i>S. aureus</i> 6538	<i>Sh. dysenteriae</i>	<i>E. coli</i> poli-B	<i>C. albicans</i>	<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> PM121
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	*	+	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	+	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	—	*	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	*	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	—	*	—	*	—	—	+	—	—	—	—	—	—
14	—	*	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	—	*	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	++	++	++	++	—	++	++	—	+	+	—	+	+
21	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
22	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

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

M = medio mínimo
C = medio completo

* = Sin crecimiento en los controles

miento de la bacteria correspondiente en MM. Cabe aclarar que en los 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 que 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.

DISCUSION

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 nutrientes en el medio, la acción de la temperatura, el pH, etc. (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 las 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), 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 substratos 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 influenciada 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; Savage,

1949; Pittenger y McCoy, 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). Sermonti (1969) mencionó 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 (Flore y *et al.*, 1949; Smith y Berry, 1974; Johnston, 1975).

El efecto de las diferentes concentraciones de hidrogeniones puede ser interpretado 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. 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 pH alto, pero al parecer, el efecto más directo del pH externo está en la permeabilidad y otros fenómenos superficiales celulares.

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 pH óptimo 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 (Flore y *et al.*, 1949) 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) si el medio de cultivo es también bajo en su pH; los resultados de los patrones seguidos en la antibiosis por *Schizophyllum* (tablas 7 y 8 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 favorable 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 considerar para ellos un tipo de crecimiento exponencial (Righelato, 1975). Bu'Lock (1975) mencionó 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 pasan 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 nutrimentos del medio, el pH, etc., cuya importancia es fundamental en los procesos metabólicos (Mateles 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; Savage, 1949; Pittenger y McCoy, 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. De manera particular, en los hongos, la temperatura actúa en los mecanismos de la germinación, la producción 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 difiere 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 tienen fuertes cambios en relación al substrato que las células están manejando; así, por ejemplo, la pigmentación, el crecimiento, etc., se ven influidos por la naturaleza rica o pobre en material orgánico e inorgánico y, por lo tanto, hay también una mayor respuesta al medio.

El tipo de substratos 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 acción de cada uno de sus componentes, tanto orgánicos como inorgánicos.

El cambio en el pH con fosfato monopotásico 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: en el 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 el 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 5 y 6).

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 (que se encuentra en el rango de temperatura óptima para el crecimiento de *Schizophyllum*).

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 nutrimentos o la carencia de algunos que son esenciales porovocaría 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 posibles 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 Shikimato — 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 (resultados no presentados aquí). Por lo tanto es probable que haya otras vías metabólicas secundarias que estén manejando substratos continuamente, que provengan de esta vía aromática alterada. Pero no se puede desechar la idea de algún otro origen de (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 dé 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 7 y 8), 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 (Gottlieb y Shaw, 1967). 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 mejor difusión en el agar, cuando el pH es ácido.

Por lo tanto, las distintas cepas de *Schizophyllum commune* poseen cualidades fisiológicas diferentes para la producción de antibióticos, según sea 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.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Dr. Teófilo Herrera por su apoyo, entusias-

mo y consejos para el desarrollo del presente trabajo. También se agradece a la Dra. C. A. Raper, Dr. S. Calderón y Dr. Ch. Thomas, los materiales donados para este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Backus, M. P. y J. F. Stauffer, 1955. The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia* 47:429-463.
- 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. Arnold, Londres.
- Bradley, S. G. y L. A. Jones, 1960. Mechanisms of action of antibiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 89:122-133.
- Bull, A. T. y M. E. Bushell, 1976. Environmental of action of antibiotics. *Ann. N.Y. Acad. mentous Fungi*, vol. II, Biosynthesis and Metabolism, pp. 1-31. Editado por J. E. Smith y D. R. Berry. Arnold, Londres.
- 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. Arnold, Londres.
- Calam, C. T., 1973. Changes in the metabolism of mutants during strain improvement programmes. *Heredity* 31:132.
- Dubovoy, C., 1973. A class of genes controlling B-factor regulated development in *Schizophyllum commune*. Ph.D. Thesis. Harvard Univ., Cambridge.
- , 1976. A class of genes affecting B-factor regulated development in *Schizophyllum commune*. *Genetics* 82:423-428.
- Fincham, J. R. S. y P. R. Day, 1965. *Fungal Genetics*, 2ª Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Florey, H. W., E. Chain, N. G. Heatley, M. A. Jennings, A. G. Sanders, E. P. Abraham, y M. E. Florey. (Eds.), 1949. *Antibiotics*, vol. I y II, Oxford University Press, Londres.
- Gottlieb, D. y P. D. Shaw (Eds.), 1967. *Antibiotics*, vols. I y II, Springer-Verlag, Nueva York.
- Grove, D. C. y W. A. Randall, 1955. *Assay Methods of Antibiotics*. Medical Encyclopaedia, Nueva York.
- Herrera, T. y M. Ulloa, 1975. Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophillum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenos 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.
- 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. Arnold, Londres.
- 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. Vaněk, Z. Hostalek y J. Cudlín, Praga.
- 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. Academic Press, Londres.
- Mitsuhashi, S. (Eds.), 1975. *Drug Action and Drug Resistance in Bacteria*, vol. II: Aminoglycoside Antibiotics. University of Tokyo Press, Tokio.
- Olutiola, P. O., 1976. Some environmental and nutritional factors affecting growth and sporulation of *Aspergillus flavus*. *Trans. Br.Mycol. Soc.* 66:131-136.
- 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.
- Pittenger, R. C. y E. McCoy, 1953. Variants of *Streptomyces griseus* induced by ultraviolet radiations. *J. Bacteriol.* 65:56-64.
- 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. Plenum, Londres.
- Raper, K. B., 1946. The development of improved penicillin molds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 48:41-55.
- , 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. 122-139. Editado por J. E. Smith y D. R. Berry. Arnold, Londres.
- 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., 1969. *Genetics of Antibiotic-Producing Microorganisms*. Wiley-Interscience, Londres.
- Smith, J. E. y D. R. Berry, 1974. *An Introduction to Biochemistry of Fungal Development*. Academic Press, Londres.
- Turner, W. B., 1971. *Fungal Metabolites*. Academic Press, Londres.
- , 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. Arnold, Londres.
- Wilkins, W. H., 1954. Investigation into the production of acterostatic substances by fungi. Preliminary examination of the thirteenth 100 species, all basidiomycetes. *Brit. J. Exp. Path.* 35:28-31.