INFLUENCIA DE LA CAFEINA EN LA ANTIBIOSIS DE *Schizophyllum commune**

Por *Alfredo Muñoz***
y *Celia Dubovoy****

INFLUENCE OF THE CAFFEINE IN THE ANTIBIOTIC RESPONSES OF *Schizophyllum commune*

SUMMARY

At this work, it was observed an alteration of the antibiotic responses of *Schizophyllum commune* when caffeine was added to the culture media, because it is a toxigenic substance for several cell processes. It was found a decrease in the antibiotic capacity of homokaryotic wild type and mutant strains. The role of caffeine in inducing *ant* (antibiotic production) mutants is discussed.

RESUMEN

En este trabajo se observó que la antibiosis de *Schizophyllum commune* fue alterada por la acción de la cafeína en el medio de cultivo, ya que es una substancia tóxica para varios procesos celulares. Fue notorio el decremento en el patrón antibiótico de los homocariones silvestres y mutantes establecidos. Se discute el papel de la cafeína en la inducción de mutaciones *ant* (antibiosis).

INTRODUCCION

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 del ADN, durante la reparación por excisión

* Este trabajo forma parte de la tesis de Biólogo del primer autor.
** Departamento de Botánica, Instituto de Biología, U.N.A.M., México, D. F.
*** Fallecida en septiembre 18 de 1977.

y la recombinacional (postreplicación) (Doneson y Shankel, 1964; Kihlman, 1974), y su posible efecto antimutagénico (Barfnech y Shankel, 1975); también actúa en *Schizophyllum commune* en estos tipos de reparación obscura (Dubovoy y Muñoz, en preparación).

Otra acción de la cafeína es la que tiene en la elevación de los niveles del Adenosín 3'-5'-Monofosfato Cíclico (AMP cíclico), al inhibir a la fosfodiesterasa, que es la enzima degradadora (Robison *et al.*, 1971). También actúa en la inhibición de la síntesis de proteínas, como se ha demostrado en levaduras y en *Escherichia coli* (Putrament *et al.*, 1972).

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

En el presente estudio, se observó la presencia de la cafeína como un posible efecto sobre la expresión de la actividad antibiótica de 37 cepas de *Schizophyllum commune* Fr. (silvestres y mutantes); y por otro lado, se estudió el papel de la cafeína como mutágeno para una posible obtención de cepas productoras de antibióticos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas

De las 37 cepas de *S. commune* usadas en este trabajo, 22 de ellas pertenecen a las 23 que fueron utilizadas en un trabajo anterior (Muñoz y Dubovoy, 1979) y además 15 cepas con genes supresores originadas en el laboratorio, para un trabajo independiente sobre mutagénesis, cuyas características se presentan en la tabla 1.

Las cepas de los microorganismos de prueba para ver la acción antibiótica de *Schizopyllum,* son las mismas que se utilizaron anteriormente y fueron sembradas de la misma manera en agar nutritivo y en medio 5 para antibióticos (para *Bacillus subtilis*).

Medios de cultivo

Se emplearon medio completo (MC), medio mínimo (MM) y medio mínimo + requerimientos (MM + −); a un pH de 7.0, cuyas características están en Muñoz y Dubovoy (1979). Cuando fue necesario, se agregó la cafeína al medio mínimo antes de la esterilización, en una concentración de 1.0 y 0.5 mg/ml.

TABLA 1

Características de las cepas con genes supresores

Número de la cepa para este trabajo	Número original	Marcadores	Mutágenos Cafeína mg/ml	Ultravioleta erg/mm²
1a	8-11	*nic-4 sup-7*	0.5	3 000
2a	8-10	*nic-3 sup*	1.0	1 500
3a	8-10	*nic-3 sup-15*		2 500
4a	8-10	*nic-3 sup-12*		1 500
5a	8-11	*nic-4 sup*		1 500
6a	8-11	*nic-4 sup-3*		2 500
7a	8-11	*nic-4 sup-2*		2 000
8a	8-11	*nic-4 sup-4*		1 000
9a	8-11	*nic-4 sup-5*	0.5	1 000
10a	8-10	*nic-3 sup-14*		3 000
11a	8-11	*nic-4 sup-8*	0.5	1 500
12a	8-10	*nic-3 sup-13*		1 500
13a	8-11	*nic-4 sup*		3 500
14a	8-11	*nic-4 sup-6*	0.5	1 000
15a	8-10	*nic-3 sup-11*		1 500

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

8-10 $A_{\alpha_1} - \beta_1$ $B_{\alpha_7} - \beta_4$
8-11 $A_{\alpha_3} - \beta_5$ $B_{\alpha_3} - \beta_2$

Cuantificación de la antibiosis

Se usaron tres tipos de símbolos: + para una inhibición del crecimiento del organismo de prueba, que fuera clara, formando un halo alrededor de la cepa productora del antibiótico. El signo ±, en las ocasiones en que había una inhibición parcial, con la presencia de algunas colonias bacterianas resistentes en el campo del halo. El signo − , para la ausencia de inhibición del organismo de prueba.

RESULTADOS

Cafeína como suplemento en el medio de cultivo

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de la antibiosis de los 22 homocariones probados con cafeína en el medio, en donde se observa que no se

TABLA 2

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	*Bacillus subtilis* ATCC6633		*Salmonella paratyphi-A*		*Staphylococcus aureus* ATCC6538		*Shigella dysenteriae*		*Escherichia coli* poli-B		*Serratia lutea*		*Candida albicans*		*Pseudomonas* sp. (a)		*Staphylococcus aureus* ATCC13150		*Salmonella paratyph-B*		*Salmonella enteritidis*		*Shigella sonnei*		*Salmonella typhi* Ty2		*Escherichia coli* SF2124		*Escherichia coli* PMB9		*Escherichia coli* PML21	
	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o	•	o
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
o = 0.5 mg/ml cafeína

TABLA 3

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	*Bacillus subtilis* ATCC6633	*Salmonella paratyphi-A*	*Staphylococcus aureus* ATCC6538	*Shigella dysenteriae*	*Escherichia coli poli-B*	*Sarcina lutea*	*Candida albicans*	*Pseudomonas* sp. (a)	*Staphylococcus aureus* ATCC13150	*Salmonella paratyph-B*	*Salmonella enteritidis*	*Shigella sonnei*	*Salmonella typhi* Ty2	*Escherichia coli* SF2124	*Escherichia coli* PMB9	*Escherichia coli* PML21
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

presentan la mayor parte de los signos de antibiosis positiva obtenidos en el medio sin cafeína; la cepa 20 mantiene el mayor espectro de antibiosis (*Staphylococcus aureus, Sarcina lutea* y *Escherichia coli*), en ambas concentraciones de cafeína; la cepa 12 presenta antibiosis contra *Salmonella typhi* Ty2 en 1.0 y 0.5 mg/ml; y la cepa 23 presenta antibiosis en la baja concentración de cafeína contra *Candida albicans*, pero en medio sin cafeína no posee esta propiedad.

Cafeína y/o luz ultravioleta como mutágenos

Como anteriormente se mencionó, se ha comprobado el papel mutagénico de la cafeína por intervenir en la función de la reparación, o sea la reparación por excisión y recombinaciónal (postreplicación), del ADN, cuando se provocan lesiones con luz ultravioleta. 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 inclinan por la inhibición de la reparación, que ha sido ampliamente comprobada (Kihlman, 1974), 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 luz ultravioleta, las cuales están representadas en la tabla 1, 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 3, 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.

DISCUSION

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), por lo tanto las pruebas que se obtuvieron en las de medio mínimo + 1.0 y 5.0 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 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, ya que Putrament *et al.* (1972) la han registrado como inhibidora de síntesis de proteína en levadura y en *Escherichia 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 presen-

tarse 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), 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 sinergístico de la cafeína, con la mutagenicidad de la luz ultravioleta para obtener mutantes supresores y revertantes de ciertos loci, independientes 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 sinergismo 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 3), los tratamientos con diferentes combinaciones de luz ultravioleta y/o cafeína, fueron poco eficaces para obtener cepas *ant*. La luz ultravioleta que fue el único agente mutagénico (resultados no presentados aquí), y la actividad de la cafeína en el medio de cultivo, fueron poco eficaces.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer cumplidamente al Dr. Teófilo Herrera, por su gran ayuda y estímulo constantes durante la realización del presente estudio.

LITERATURA CITADA

Alikhanian, S. I., S. Z., Mindlin, S. U. Goldat y A. V. Vladimizov, 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.

Barfknecht, T. R. y D. M. Shankel, 1975 The effect of streptomycin resistance, caffeine and acriflavine on ultravioleta light-induced reversion to tryptophan independence in strains of *Escherichia coli* B/r. *Mut. Res. 30*:163-176.

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. y A. Muñoz, 1977. Anormalidades de los cuerpos fructíferos de *Schizophyllum commune* Fr. en medios con metilxantinas. *Bol. Soc. Mex. Micol. 11*:9-13.

Kihlman, B. A., 1974. Effects of caffeine on the gentic material. *Mut. Res. 26*:53-71.

Muñoz, A. y C. Dubovoy, 1979. Estudio fisiológico de la antibiosis de *Schizophyllum commune*. *Bol. Soc. Mex. Micol. 13*.

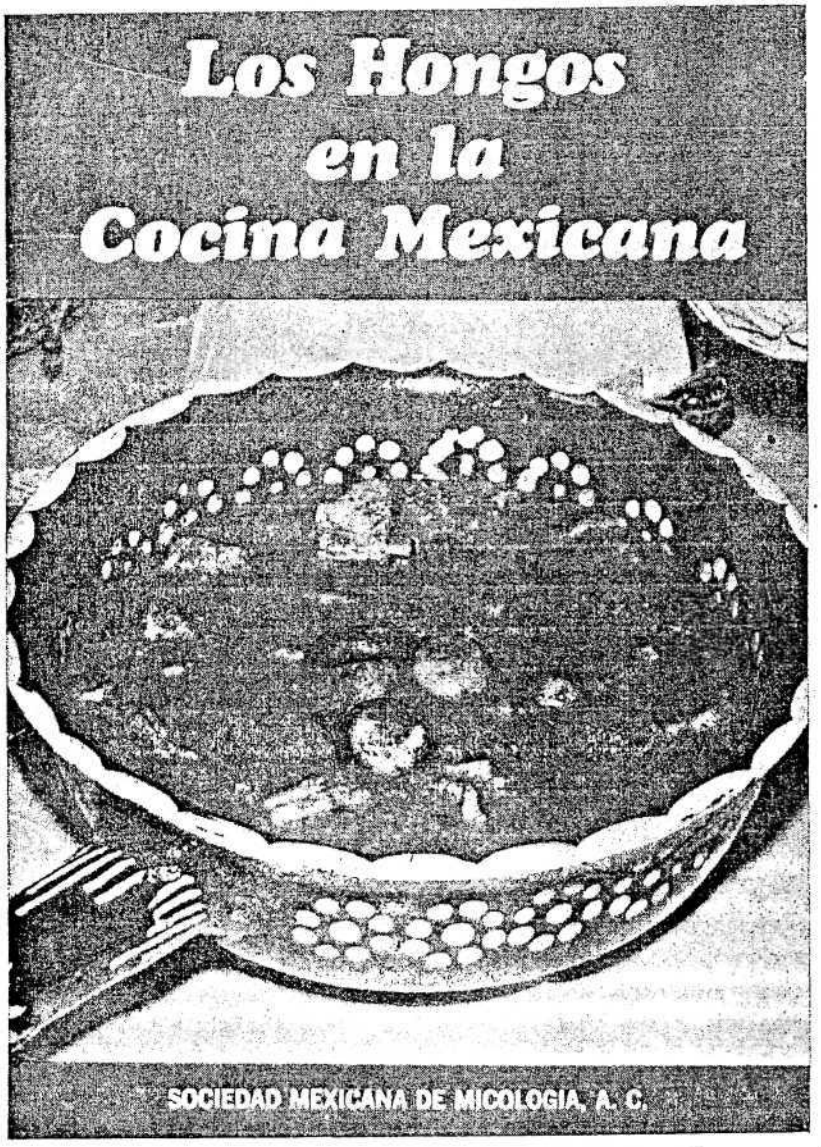
Putrament, A., H. Baranovska, T. Bilinski y W. Prazo, 1972. On the specificity of caffeine effects. Inhibition by caffeine of RNA and protein synthesis in yeast and *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet. 118*:373-379.

Robison, G. A., R. W. Butcher y E. W. Sutherland, 1971. *Cyclic AMP*. Academic Press, Nueva York.

Sermonti, G., 1969. *Genetics of Antibiotic-Producing Microorganisms*. Wiley-Interscience, Londres.

Smith, J. E. y D. R. Berry, 1974. *An Introduction Biochemistry of Fungal Development*. Academic Press, Londres.

Sundar-Raj, C. V. y S. Dhala, 1965. Effect of Naturally occurring xanthines on bacteria. I. Antimicrobial action and potentiating effect on antibiotic spectra. *Appl. Microbiol. 13*: 432-436.



LOS HONGOS EN LA COCINA MEXICANA. Libro de 62 páginas, con más de 70 recetas de hongos. Fue publicado por la Sociedad Mexicana de Micología en 1977 y todavía es posible obtenerlo al precio de $60.00.
Adquirible a través del Comité Editorial o de la Mesa Directiva.