

EFFECTO DE DIFERENTES FACTORES FISICOS Y NUTRICIONALES
SOBRE EL CRECIMIENTO DE DOS CEPAS DE *CONIDILOBOLUS CORONATUS*

por T. Mier, C. Toriello,
M. Casamitjana,
A.M. García-Maynez y
R. López-Martínez*

EFFECT OF SOME PHYSICAL AND NUTRITIONAL FACTORS ON TWO
STRAINS OF *CONIDILOBOLUS CORONATUS*

SUMMARY

Two strains of *Conidiobolus coronatus* (Cost.) Tyrrel & Mac Leod (= *Entomophthora coronata* (Cost.) Kevork.), one isolated from insects and another from a human case of rhinoentomophthoromycosis were studied, regarding the effect of physical and nutritional factors (temperature, pH, nitrogen and carbon sources and vitamins requirements) on their growth, to observe any differences or similarities between them. For both strains, the best temperature for growth was 21° C., and a pH range from 5.0 to 8.0. All nitrogen and carbon sources studied were assimilated, except nitrate and saccharose. Only one strain had vitamin requirements.

RESUMEN

Dos cepas de *Conidiobolus coronatus* (Cost.) Tyrrell & Mac Leod (= *Entomophthora coronata* (Cost.) Kevork.) una aislada de insectos y otra de un caso humano de rinoentomofotoromicosis, fueron estudiadas para observar los efectos de algunos factores físicos y nutricionales sobre su crecimiento (temperatura, pH, fuentes de carbono, nitrógeno y requerimientos vitamínicos), y así poder establecer algunas diferencias y similitudes entre estas dos cepas. Para ambas, la mejor temperatura de crecimiento fue de 21°C, a un pH de 5.0 a 8.0. Todas las fuentes de nitrógeno y carbono estudiadas fueron asimiladas excepto el nitrato y la sacarosa. Únicamente una tuvo requerimientos vitamínicos.

* Departamento de Ecología Humana, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México 20, D. F.

INTRODUCCION

Los hongos del orden Entomophthorales tienen gran importancia económica debido a su capacidad para parasitar insectos nocivos a la industria agropecuaria (Steinhaus, 1967; Gustafsson, 1965, 1966; Müller Kogler, 1967; MacLeod, 1963; Macleod & Müller-Kogler, 1970, 1973); por este motivo, se han venido realizando investigaciones sobre las condiciones fisiológicas para su aislamiento, cultivo y mantenimiento en el laboratorio (Gustafsson, 1965; Smith, 1953; King, 1976; Latgé & Soper, 1977), así como estudios sobre las posibilidades de usar a estos hongos como instrumento en el control biológico de plagas (Gustafsson, 1969; Guzmán & Alcocer-Gómez, 1972; MacLeod, 1963; Latgé *et al.*, 1978).

En México se han aislado *Entomophthora delphacis* y *E. major* (Latgé *et al.* 1980), y *Conidiobolus coronatus* (como *Entomophthora coronata*, por Guzmán y Alcocer-Gómez, 1972) de diversas especies de insectos de los géneros *Aenolamia* y *Prosapia* ("mosca pinta"), los cuales atacan a los pastizales de las regiones ganaderas, por lo cual estos hongos podrían ser un potencial biológico importante para el control de estas plagas. Sin embargo, *Conidiobolus coronatus*, es capaz de producir la rinoentomofotoromicosis, afección subcutánea crónica, poco frecuente, que afecta al hombre (Martinson & Clark, 1976; Bras *et al.*, 1965; Restrepo *et al.*, 1967; Clark, 1967; Kamalam & Thambiah, 1978), a los equinos (Emmons & Bridges, 1961; Johnston *et al.* 1967; Restrepo *et al.*, 1973) y a los simios (Roy & Cameron, 1972).

En el presente trabajo se estudian dos cepas de *Conidiobolus coronatus*, una aislada de la mosca pinta (HMP) y otra de un caso humano de rinoentomofotoromicosis (IP-951-72), para observar si existen diferencias o similitudes en cuanto a factores físicos y nutricionales sobre su crecimiento.

METODOLOGIA

Medios de cultivo. 1. Medio de Agar Papa Peptona (APP): Agar papa Difco adicionado de 10 g/litro de Bacto-Peptona. 2. Medio (DEL): Dextrosa 15 g, extracto de levadura (Difco) 10 g, agar 15 g, agua destilada 1000 ml. 3. Medio Mínimo de Davies (MM): K_2HPO_4 7 g, KH_2PO_4 3 g, $Na_3C_6H_5O_7$, $2H_2O$ 0.5 g, $MgSO_4$, $7H_2O$ 0.1 g, $(NH_4)_2lg$, H_2O 1000 ml. 4. Medio de Sabouraud para mantenimiento de cepas.

Hongo. *Conidiobolus coronatus*, dos cepas, una (HMP) aislada de la mosca pinta y proporcionada por el Depto. de Sanidad Vegetal de la SARH, y otra (IP-951-72) aislada de un caso de rinoentomofotoromicosis humana y proporcionada gentilmente por el Prof. F. Mariat, del Servicio de Micología del Instituto Pasteur, de París.

Inóculo. Con asa calibrada de 0.01 ml se tomaron las esporas obtenidas en cultivo de 5 días a 29° C en medio de Sabouraud y se colocaron en el centro de la caja de Petri o tubo de ensayo con los medios correspondientes a cada experimento. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

Factores físicos y nutricionales. Se inoculó el hongo en el centro de las cajas de Petri con Medio DEL, incubándose durante 15 días a 29° C. Para el experimento de temperaturas se ensayaron las siguientes: 21, 26, 29 y 37° C. Para el experimento de pH se sustituyó el agua del medio por regulador de fosfatos 0.066 M a pH de 5.0, 6.0, 6.5, 7.0 y 8.0. Para las fuentes de nitrógeno (0.1 %) se sustituyó el extracto

de levadura del medio DEL por glicina (Merck), asparagina (Merck), oxalato de amonio (Baker), extracto de levadura (Difco) y nitrato de sodio (Baker), así como controles sin fuente de nitrógeno. Para este experimento se utilizó regulador de fosfatos 0.066 M (KH_2PO_4 0.23%, Na_2PO_4 , $12\text{H}_2\text{O}$ 1.12%) en lugar de agua. Para las fuentes de carbono (0.8%) se substituyó la dextrosa del medio DEL por fructosa (N.B.C.) maltosa (Difco), galactosa (Pharmaceutical Chemical), sacarosa (Difco), glicerol (Merck) y dextrosa (Baker), así como un control sin fuente de carbono. Para valorar el crecimiento se midió el diámetro de la colonia cada 48 hrs. durante 15 días.

Requerimientos vitamínicos. Se investigaron las siguientes vitaminas: biotina, ácido pantoténico, inositol, tiamina, piridoxina, riboflavina, ácido p-aminobenzoico y ácido fólico, a una concentración final de 1×10^{-6} en el medio (MM), poniendo todas las vitaminas menos una en cada tubo; además de dos controles uno con y otro sin todas las vitaminas. Las esporas se lavaron 5 veces con solución salina estéril, se sembraron en los tubos y fueron incubadas durante 15 días a 29°C . La apreciación del crecimiento se hizo de la siguiente manera: Negativo (-), mínimo (+), moderado (++) , bueno (+++) y abundante (++++).

RESULTADOS

Temperatura y pH. Durante los 8 primeros días de incubación ambas cepas mostraron un desarrollo progresivo y sin diferencias importantes. A los 10 días, los hongos estudiados obtuvieron el mejor crecimiento a 21°C (Fig. 1). La velocidad de crecimiento para este y todos los demás experimentos fue mayor para la cepa HMP aislada del insecto, habiéndose desarrollado abundantemente en todas las temperaturas. Ambos hongos crecieron bien en un rango de pH de 5.0 a 8.0.

Fuentes de carbono. Todas las fuentes de carbono probadas fueron asimiladas, excepto la sacarosa donde se observó un discreto desarrollo. Sin embargo, el mejor crecimiento de ambas cepas fue con la dextrosa, fructosa y galactosa. Se observó un discreto crecimiento en la caja control lo que fue atribuido al carbono presente en el extracto de levadura utilizado como fuente de nitrógeno en este experimento y a las reservas del inóculo (Figs. 2 y 3).

Fuentes de nitrógeno. Las dos cepas estudiadas metabolizaron la glicina, asparagina y extracto de levadura. El ion amonio también fue asimilado en el medio con regulador de fosfatos (KH_2PO_4 0.23%; Na_2HPO_4 $12\text{H}_2\text{O}$ 1.12%). Por el contrario el nitrato no es metabolizado aun en presencia de regulador de fosfatos en el medio. La mejor fuente de nitrógeno encontrada fue el extracto de levadura para ambas cepas (Figs. 4 y 5).

Requerimientos vitamínicos. Usando un medio mínimo pobre, donde el crecimiento es poco abundante, hubo una diferencia marcada entre los dos hongos estudiados. La cepa aislada de un caso de rinoentomofotoromicosis humana no creció en el medio sin vitaminas, ni tampoco en los medios donde faltó ácido pantoténico, piridoxina y ácido p-aminobenzoico. Por el contrario la cepa HMP, aislada del insecto no tuvo requerimientos vitamínicos (Tabla 1).

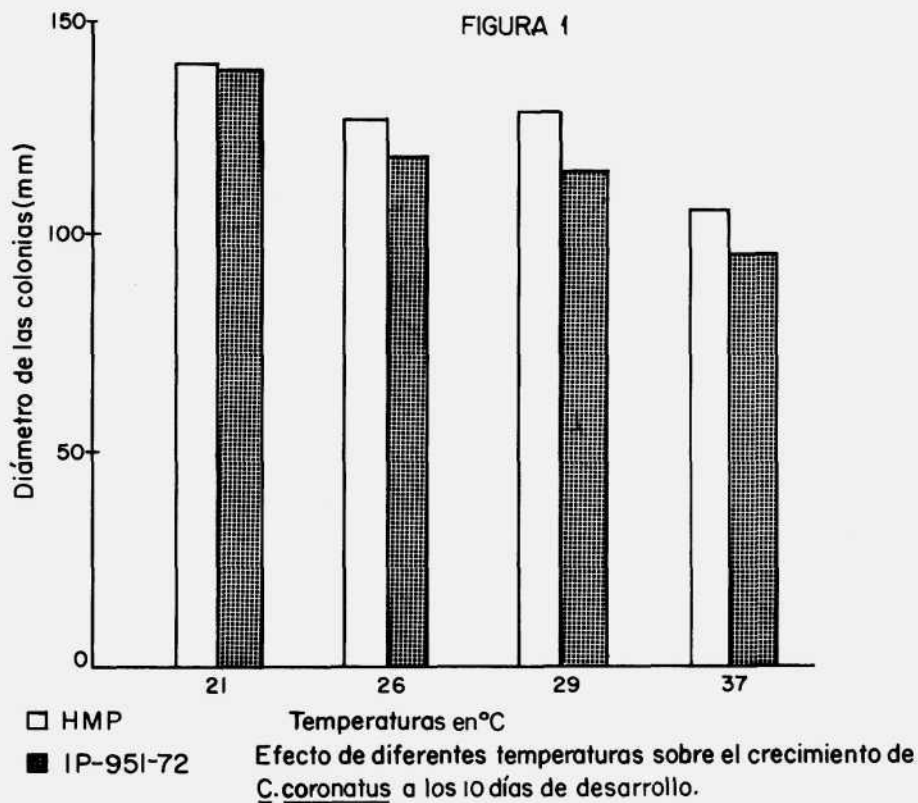


FIGURA 2
 CRECIMIENTO RADIAL DE CULTIVOS DE CONIDIOPOLUS CORONATUS HMP
 FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

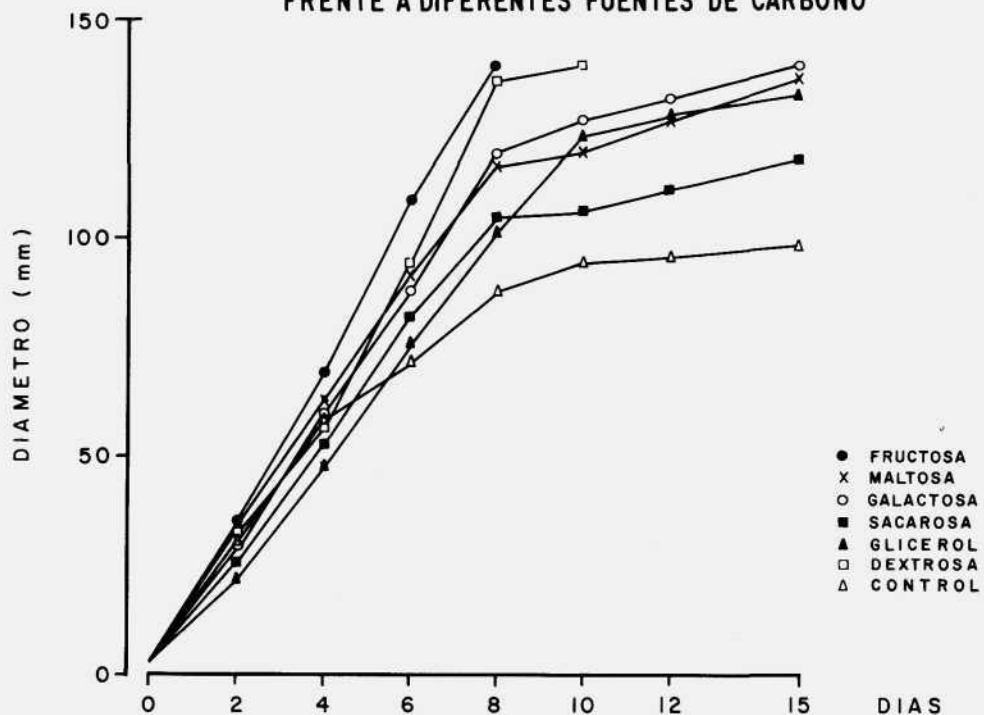


FIGURA 3
CRECIMIENTO RADIAL DE CULTIVOS DE CONIDIOPOLUS CORONATUS IP-951-72
FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

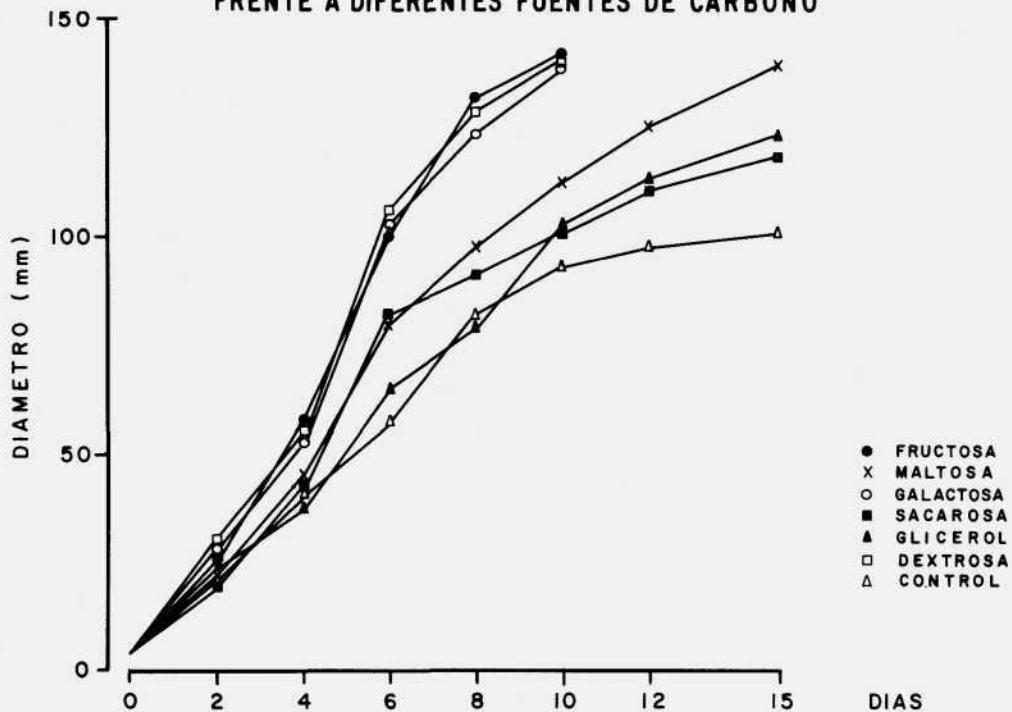


FIGURA 4

CRECIMIENTO RADIAL DE CULTIVOS DE CONIDIOPOLUS CORONATUS HMP
FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO

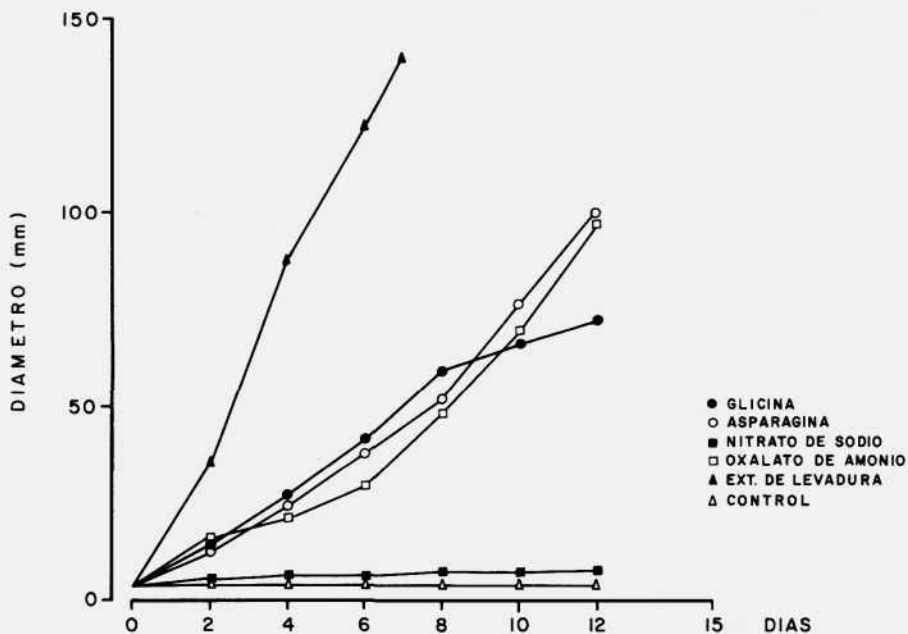


FIGURA 5

CRECIMIENTO RADIAL DE CULTIVOS DE CONIDIOPOLUS CORONATUS
IP-951-72 FRENTE A DIFERENTES FUENTES DE NITROGENO

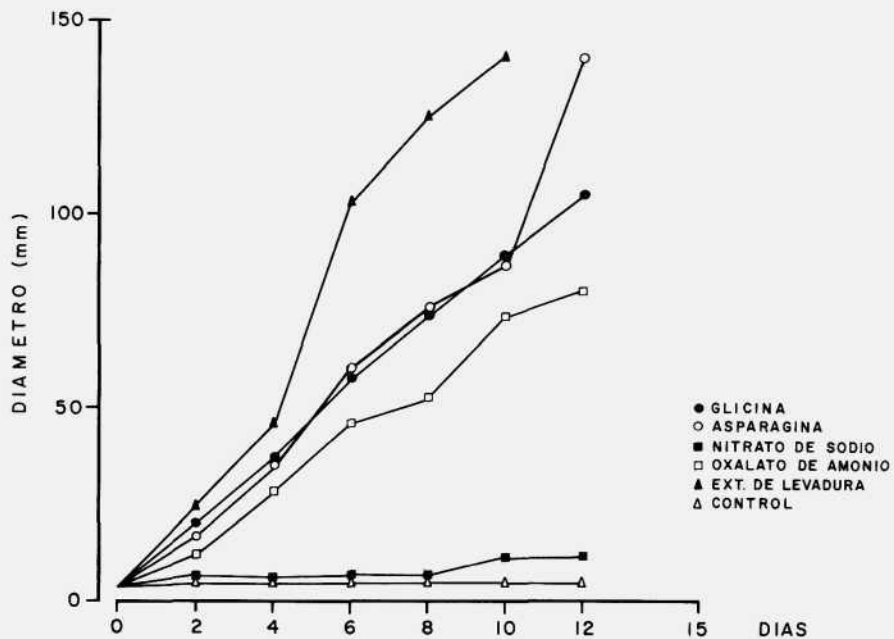


TABLA 1. Requerimientos vitamínicos para el crecimiento en *Conidiobolus coronatus*

| Sustancia faltante | <i>Conidiobolus coronatus</i> | |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------|
| | HMP | IP 951 72 |
| Biotina | + | - + |
| Ac. Pantoténico | ++ | - |
| Inositol | ++ | - + |
| Tiamina | ++ | - + |
| Piridoxina | ++ | - |
| Riboflavina | ++ | - + |
| Ac. Para-amino Benzoico | ++ | - |
| Ac. Fólico | + | - + |
| Control sin vitaminas | ++ | |
| Control con todas las vitaminas | ++ | ++ |

DISCUSION

Uno de los parámetros usados en la diferenciación de hongos patógenos y contaminantes, es que los primeros tienen una temperatura de desarrollo de hasta 37°C, mientras que los segundos tienen un precario desarrollo a esta misma temperatura; *Conidiobolus coronatus* ha sido considerado como patógeno primario, sin embargo, comparte muchas características de hongo contaminante ya que la inmensa mayoría de estas cepas no son capaces de producir infecciones humanas. Por otra parte, como se observó en este trabajo, ambas cepas tuvieron la temperatura óptima de desarrollo a los 21°C, habiendo crecido también a los 37°C.

Wolf (1951) demostró que *C. coronatus* no metaboliza la sacarosa y Latgé (1975) en un estudio sobre la nutrición carbonada de 6 especies de Entomophthorales mostró que solamente *Basidiobolus ranarum* era capaz de metabolizar la sacarosa. El discreto desarrollo obtenido en este trabajo en las cepas estudiadas, tanto con la sacarosa como en el control sin azúcar, es debido seguramente al carbono presente en el extracto de levadura, así como a la utilización de las reservas del inóculo.

El nitrato no fue asimilado pero si la sal de amonio, lo que está de acuerdo a trabajos presentados por otros autores sobre los Entomophthorales (Ege, 1965; Gustafsson 1966; Smith, 1953; Wolf, 1951). El gran número de especies estudiadas por estos autores muestran que la no metabolización de los nitratos es característica de este grupo de hongos. Hasta la fecha no se habían registrado requerimientos vitamínicos para los Entomophthorales (Ege, 1965; Gustafsson, 1966; Wolf, 1951), sin embargo, en este trabajo, la cepa IP-951-72 no creció en ausencia de ácido pantoténico, piridoxina y ácido para-aminobenzoico.

Debido al origen tan distinto de las cepas estudiadas (humana y de insectos) se esperaba encontrar más diferencias en los parámetros estudiados, no obstante la más significativa fue en relación a los requerimientos vitamínicos de la cepa humana, ya

que las diferencias en cuanto a temperatura, pH y fuentes nutricionales fueron tan poco notables que no se puede pensar en que las diferencias encontradas estén ligadas a patogenicidad, resistencia al medio ambiente, calidad del sustrato, etc.

Tal vez estudios complementarios como determinaciones enzimáticas, composición química de la pared y caracterización antigénica, entre otros, fueran capaces de establecer con mayor precisión las diferencias buscadas.

Hace algunos años se confiaba en que *C. coronatus* fuera un buen recurso como insecticida biológico (Guzmán y Alcocer-Gómez, 1972) y tratando de encontrar una cepa libre de acción patógena para los mamíferos, se hicieron estudios de patogenicidad en animales (López Martínez *et al.*, 1978, Fromentin, 1976) con hongos aislados de insectos; a pesar de no haberse demostrado la acción patógena, se consideró que no son aptos estos organismos para el control biológico, ya que el comportamiento fisiológico de cepas de humanos y de insectos es muy similar y por otra parte, este hongo, a diferencia de otros ficomicetos oportunistas, es considerado como patógeno primario, no obstante el número tan reducido de casos humanos conocidos.

LITERATURA CITADA

- Bras, G., C.C. Gordon, G.W. Emmons, K.M. Prendegast & M. Sugar, 1965. A case of phycomycosis observed in Jamaica. Infection with *Entomophthora coronata*. *J. Trop. Med. Hyg.* 14: 141-145.
- Clark, B.M., 1967. *The epidemiology of phycomycosis. Systemic mycosis*. A Ciba Foundation Symposium, Little Brown & Co., Boston.
- Ege, O., 1965. Ein Beitrag zur Biologie einiger aphidivorer Entomophthoraceen. *Arch. Microbiol.* 52: 20-48.
- Emmons, G.W. & C.M. Bridges, 1961. *Entomophthora coronata*, the etiologic agent of a phycomycosis of horses. *Mycologia* 53: 307-317.
- Fromentin, H., 1976. Infection expérimentale de la souris par des Entomophthorales. *Bull. Soc. Franc. Mycol. Med.* 5: 157-160.
- Gustafsson, M., 1965. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden I. Classification and Distribution. *Lantbr. Hogsh. Anner.* 31: 103-212.
- , 1966. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden II. Cultivation and physiology. *Ibid.* 31: 405-457.
- , 1969. On species of the genus *Entomophthora* Fres. in Sweden III. Possibility of usage in biological control. *Ibid.* 35: 235-274.
- Guzmán, G. & L. Alcocer-Gómez, 1972. Un hongo de importancia biológica en México, *Entomophthora coronata*. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 6: 5-8.
- Johnston, M.J., N. Soerensen, A.M. Saliba, de S.C. Lacaz, J.B. Neto & J.M. Cruz, 1967. Ficomicoso en muer. Isolamento de *Entomophthora coronata*. *Arq. Instituto Biológico. S. Paulo* 34: 51-58.
- Kamalam, A. & A.S. Thambiah, 1978. Lymph node invasion by *Conidiobolus coronatus* and its spore formation in vivo. *Sabouraudia* 16: 175-184.
- King, D.S., 1976. Systemics of *Conidiobolus* (Entomophthorales) using numerical taxonomy, I. Biology and cluster analysis. *Canad. J. Bot.* 54: 45-64.
- Latgé, J.P. 1975. Croissance et sporulation de 6 especes d'Entomophthorales I. Influence de la nutrition carboné. *Entomophaga* 20: 201-207.
- , R.S. Soper & C.D. Madore, 1977. Media Suitable for Industrial production of *Entomophthora virulenta* zygospores. *Biotech. Bioeng.* 19: 1269-1284.

- , G. Remaudiere & B. Papierok, 1978. Un exemple de recherche en lutte biologique: les champignons *Entomophthora* pathogenes de pucerons. *Bull. Soc. Pathol. Ex.* 71: 196-203.
- , C. Toriello, L. Sampedro, G. Ibarra, A. Contreras & G. Remandiera, 1980. Les champignons pathogenes de la mosca pinta au Mexique. II. Etude preliminaire de la germination et de la croissance en *Entomophthora delphacis* et *E. major*. *Memorias XV Congreso Nac. Entomología*, Abril 10-12, Tamps. Mex.
- López-Martínez, R., C. Toriello, T. Mier, C. Ximénez, A. García-Maynez, A. Martínez & J. Fernández-Diez, 1978. Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación. *Mycopathologia* 66: 59-65.
- MacLeod, D.F., 1963. Entomophthorales infections. In: *Insect pathology II*. Steinhaus, E. (ed.), Nueva York.
- & E. Müller-Kogler, 1970. Insect pathogens: species originally described from their resting spores mostly as *Tarichium* species (Entomophthorales: Entomophthoraceae). *Mycologia* 62: 33-66.
- & ——, 1973. Entomogenous fungi: *Entomophthora* species with pear-shaped to almost spherical conidia (Entomophthorales: Entomophthoraceae). *Mycologia* 65: 823-873.
- Martinson, F.D. & B.M. Clark, 1976. Rhinophycomycosis entomophthorae in Nigeria. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 40-47.
- Müller-Kogler, E., 1967. Nebenwirkungen insektenpathogener Pilze auf Mensch und Wirbeltiere: Aktuelle Fragen. *Entomophaga* 12: 429-441.
- Restrepo, A.M., D.L. Greer, M.V. Robledo, G. Díaz, R. López Martínez & C.R. Bravo, 1967. Subcutaneous phycomycosis: Report of the first case observed in Colombia, South America. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 34-48.
- , L.F. Morales, y M. Robledo, 1973. Rinoficomicosis por *Entomophthora coronata* en equinos. *Antioq. Med. Colombia* 23: 13-25.
- Roy, A.D. & M.E. Camerun, 1972. Rhinophycomycosis entomophthorale occurring in a chimpanzee in the wild in East Africa. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 21: 234-237.
- Smith, M.C.W., 1953. The nutrition and physiology of *Entomophthora coronata*. *Dissertation Abstr.* 13: 648-649.
- Steinhaus, E.A., 1967. Microbial diseases of insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 11: 165-182.
- Wolf, F.T., 1951. The cultivation of two species of *Entomophthora* on synthetic media. *Bull. Torrey Bot. Club* 78: 211-220.