

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCION DE DIVERSAS  
ENZIMAS EN DOS CEPAS DE *CONIDILOBOLUS CORONATUS*  
(Cost.) Tyrrel & MacLeod

Por T. Mier, C. Toriello,  
M. Casamitjana,  
A. M. García Máñez y  
R. López-Martínez\*

COMPARATIVE STUDY OF THE PRODUCTION OF DIVERSE  
ENZYMES FROM TWO STRAINS OF *CONIDILOBOLUS*  
*CORONATUS* (Cost.) Tyrrel & MacLeod

S U M M A R Y

A study was made to observe the production of different enzymes of two strains of *Conidiobolus coronatus*, one isolated from insects and another from a human case of rhinoentomophthoromycosis. Chitinase, protease, hemolysine, deoxyribonuclease and lipase were studied. The enzymes were present in both strains with the exception of chitinase as there was no chitinolytic activity present in these strains. The velocity of growth and diameter of the colony were always greater from the insect strain.

R E S U M E N

Se hizo un estudio para observar la producción de diferentes enzimas de dos cepas de *Conidiobolus coronatus*, una aislada de insectos y otra de un caso humano de rinoentomofotoromicosis. Las enzimas estudiadas fueron quitinasa, proteasa, hemolisina, desoxirribonucleasa y lipasa; en ambas cepas se demostró la presencia de todas las enzimas, con excepción de la quitinasa ya que no se observó ninguna actividad quitinolítica. La velocidad de crecimiento y el diámetro de la colonia fue siempre mayor en la cepa aislada de insectos en comparación con la cepa del caso humano.

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

## INTRODUCCION

Uno de los criterios de diferenciación entre los hongos contaminantes y hongos patógenos, se basa en que éstos últimos tienen enzimas capaces de agredir los tejidos del huésped, tal es el caso de *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* y los dermatofitos, hongos considerados como de alta patogenicidad para el hombre, según Rippon (1968), Rippon & Garber (1959), Renold *et al.* (1968) y Li & Fleming (1967).

Ciertos hongos producen ocasionalmente micosis humanas y sin embargo, son abundantes y ampliamente distribuidos en la naturaleza, tal es el caso de *Conidiobolus coronatus* (Cost.) Tyrrel & MacLeod, causante de la rinoentomofotoromicosis humana, de simios y equinos, según Bras *et al.* (1965), Clark (1976), Restrepo *et al.* (1967, 1973) y Roy & Cameroun (1972). Este hecho haría suponer que existen ciertas diferencias enzimáticas entre las pocas cepas patógenas productoras de las micosis y las que se encuentran en la naturaleza. Otro interés de estudio en *C. coronatus* es que por ser un hongo parásito de insectos, se pensó en la posibilidad de que fuera utilizado en el control biológico de plagas, con el consiguiente riesgo de producir infecciones en el hombre y otros mamíferos.

En un intento por caracterizar mejor a dos cepas de *C. coronatus*, una aislada de insectos: Guzmán & Alcocer-Gómez (1972) y otra de un caso humano de rinoentomofotoromicosis, hemos hecho previamente estudios de patogenicidad experimental en animales (López-Martínez *et al.*, 1978), así como análisis de algunos factores físicos y nutricionales para el desarrollo de estas dos cepas (Mier *et al.*, 1980), llegando a la conclusión de que esta especie definitivamente no podría ser utilizada en control biológico.

En el presente trabajo se aborda el estudio de las probables enzimas ligadas a patogenicidad que pudieran tener estas dos cepas de *C. coronatus*.

## METODOLOGIA

## I.—MEDIOS DE CULTIVO

1) Determinación de quitinasa: Medio sintético (MS); Citrato diamónico ( $C_6H_{14}N_2O_7$ ) 2.5 g, NaCl 1.0 g,  $KH_2PO_4$  1.5 g,  $Mg SO_4$  7 H<sub>2</sub>O 0.5 g,  $Na_2 CO_3$  1.5 g, glicerol 25.0 ml. Ajustar a pH 6.5, aforar a 1000 ml con agua destilada. Añadir al MS quitina coloidal al 1.5% y extracto de levadura al 0.05%.

2) Determinación de proteasa: Añadir al MS 1.5% de caseína. La caseína debe incorporarse al medio lentamente disolviéndola completamente en un mortero con el MS. Verificar el pH, el cual deberá quedar entre 6.5 y 7.0. Agregar 1.5% de agar, esterilizar a 15 lbs. de presión durante 25 minutos y verter en cajas de Petri.

3) Determinación de hemolisina: Agar sangre bacteriológico (AS) (Difco).

4) Determinación de lipasa: Medio de Agar-Tween (AT); peptona 10.0 g,  $CaCl_2$  0.1 g, NaCl 5.0 g. Tween-20 10.0 ml, agar 15.0 g, aforar a 1000 ml con agua destilada.

5) Determinación de nucleasa (MN): Disolver verde de metil al 0.5% en agua destilada, extraer seis a siete veces en un embudo de separación con volúmenes iguales de cloroformo hasta que salga incoloro, esterilizar por filtración la solución resultante y añadir 1.0 ml de la misma a 100 ml de medio de agar nutritivo (DIFCO) fundido y estéril conteniendo 0.03% de ácido desoxirribonucleico (ADN), altamente polimerizado y puro (SIGMA). Esterilizar a 15 lbs. de presión durante 15 minutos. Agitar suavemente para distribuir el ADN disuelto así como el colorante. Verter el medio en cajas de Petri. Estas quedarán de un color verde pálido.

## II.—HONGOS

*Conidiobolus coronatus*. Se usaron dos cepas, una proporcionada por el Depto. de Control Biológico de la Dirección de Sanidad Vegetal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D. F. y la cual fue la usada por Guzmán & Alcocer-Gómez (1972), que fue aislada de la mosca pinta (HMP) y otra donada por el Prof. F. Mariat, del Servicio de Micología del Instituto Pasteur de París, aislada de un caso de rinoentomofotoromicosis humana (IP-951-72). Estas cepas son las mismas que se citan en Mier *et al.* (1980).

## III.—INOCULO

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 las cajas de Petri.

## IV.—DETERMINACION DE QUITINASA

Se sembraron las cepas en el medio MP y se incubaron a 28°C para observar la aparición de halo de proteolisis. Cepa testigo: *Serratia marcescens*.

## V.—DETERMINACION DE HEMOLISINA

Se sembraron las cepas problemas en el medio de agar sangre bacteriológico y se incubaron a 37°C para observar la aparición de la zona de lisis alrededor de las colonias con actividad hemolítica. Cepa testigo: *Staphylococcus aureus*.

## VI.—DETERMINACION DE LIPASA

Se sembraron tanto las cepas del hongo como la cepa testigo en medios AT conteniendo como fuente de carbono Tween-20 y se incubaron a 28°C para observar la aparición de un halo alrededor de las colonias productoras de lipasa. La cepa testigo utilizada fue *Listeria monocytogenes*.

## VII.—DETERMINACION DE DESOXIRRIBONUCLEASA

Se sembraron dos cepas de *C. coronatus* conjuntamente con *Serratia marcescens* como cepa testigo en el medio de cultivo (NS). Se incubaron a 28°C para observar la aparición de un halo color de rosa alrededor de las cepas productoras de las nucleasas sobre el fondo verde del medio.

## RESULTADOS Y COMENTARIOS

En la Tabla 1 se puede observar que todas las enzimas estudiadas estuvieron presentes, con la excepción de la quitinasa.

**Quitinasa:** En ninguna de las dos cepas se demostró la presencia de quitinasa. En trabajos previos (Gabriel, 1968) se ha demostrado a través de la reacción del ácido peryódico de Schiff (P.A.S.) que este hongo no actúa sobre la quitina en el sitio de penetración; probablemente la invasión de *C. coronatus* a la cavidad del insecto, se haga por penetración del micelio a través de los intersticios o pliegues anatómicos del mismo.

**Proteasa:** Se observó un pequeño halo de proteolisis en ambas cepas. Algunos autores (Fromentin, 1976) señalan que el sistema de regulación de la producción de proteasas se presenta en cultivos jóvenes donde hay una mayor producción enzimática y cuando el cultivo alcanza su óptimo desarrollo, éstas se reducen considerablemente. Otros autores también señalan que diversos hongos entomoforales, particularmente *C. coronatus*, tienen una importante actividad proteolítica, tales como Jonsson (1968), Dien (1950) y Matsushima (1958), lo que está de acuerdo con los resultados del presente trabajo, ya que ambas cepas tuvieron una actividad proteolítica.

**Lipasa:** Tanto la cepa IP-951-72 como la HMP tuvieron una moderada actividad lipolítica. Aquí sí parece existir una acción digestiva de lípidos en el punto de penetración del hongo en los insectos, como lo demostró Gabriel (1968).

**Desoxirribonucleasa:** Ambas cepas produjeron una cantidad considerable de esta enzima, la que por su acción sobre ácidos nucleicos podría catalogarse como factor de virulencia de interés, presente en el hongo y que sería objeto de estudios posteriores.

**Hemolisina:** Fue el tipo de enzima que se demostró con mayor intensidad, lo cual es una evidencia del potencial de agresión de estos hongos hacia diversos sustratos.

Resumiendo, se puede observar que las únicas diferencias notables en el comportamiento de las dos cepas en el presente trabajo, fue en cuanto a la velocidad y grado de crecimiento; ya que la cepa de vida libre HMP, creció en el mismo tiempo de incubación y con todos los sustratos empleados, aproximadamente 5 veces más en su diámetro que la cepa patógena IP-951-72. En otro trabajo, Mier *et al.* (1980) se observó que esta misma cepa tuvo requerimientos vitamínicos, particularmente de la piridoxina, del ácido P-aminobenzoico y del ácido pantoténico; en cambio la cepa HMP, no tiene requerimientos vitamínicos para su crecimiento.

Por todo lo anterior se puede concluir que las dos cepas estudiadas no exhibieron diferencias notables en cuanto a su comportamiento fisiológico en el laboratorio, sin embargo, las cepas de *C. coronatus* de vida libre tienen una mayor adaptabilidad para desarrollarse en diversidad de sustratos lo que les permite su gran distribución geográfica en la naturaleza.

## AGRADECIMIENTOS

Se expresa un agradecimiento al Dr. Ramón Cruz Camarillo, Jefe de Laboratorio de Enzimas Microbianas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, por su colaboración en la realización de este trabajo.

## T A B L A I

PRODUCCION DE DIFERENTES ENZIMAS EN DOS CEPAS DE *CONIDIOPOLUS CORONATUS* (HMP Y IP-951-72)

PRESENTES	AUSENTES
PROTEASA	QUITINASA
HEMOLISINA	
LIPASA	
DESOXIRRIBONUCLEASA	

## LITERATURA CITADA

- Bras., G., C. C. Gordon, G. E., Emmons, K. M. Prendegast y 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. **Sistemic mycosis**. A Ciba Foundation Symposium. Little Brown and Co., Boston.
- Dien, W. N., 1950. The proteolytic enzymes of microorganisms. I. Survey of fungi and actinomycetes for protease production in submerged culture. **Can. J. Research.** 28: 577-585.
- Fromentin, H., 1976. Activity casinololytique D' *Entomophthora coronata* au cours de sa croissance en culture stable. **Mycopathologia.** 59: 43-45.
- Gabriel, P. B., 1968. Histochemical study of the insect cuticle infected by the fungus *Entomophthora coronata*. **J. Invert. Pathol.** 11: 82-89.
- Guzmán, G. y L. Alcocer-Gómez, 1972. Un hongo de importancia biológica en México, *Entomophthora coronata*. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 6: 5-8.
- Jonsson, A.G., 1968. Protease production by species of *Entomophthora*. **Appl. Microbiol.** 16: 450-457.
- Lí, M. F. y C. Fleming, 1967. A proteolytic pseudomonad from skin lesions of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). I. Characteristics of the pathogenic effects and the extracellular proteinase. **Can. J. Microbiol.** 13: 405-416.
- López-Martínez, R., C. Toriello, C. Ximénez, A. García-Máynez, A. Martínez y J. Fernández-Díez, 1978. Estudio de la patogenicidad de *Conidiobolus coronatus* en animales de experimentación. **Mycopathologia.** 66: 59-65.
- Martinson, F. D. y B. M. Clark, 1976. Rhinophycomycosis entomophthorae in Nigeria. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 16: 40-47.
- Matsushima, K., 1958. Studies on the proteolytic enzymes of molds. Part. XIV. Classification of fungal protease systems by means of pH-activity curves. **Agr. Chem. Soc. Japan.** J. 32: 215-218.
- Mier, T., C. Toriello, M. Casamitjana, A. M. García-Máynez y R. López Martínez, 1980. Efecto de diferentes factores físicos y nutricionales sobre el crecimiento de dos cepas de *Conidiobolus coronatus*. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 13: 69-79.
- Remold, H., H. Fasold y F. Staib, 1968. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochem. Biophys. Acta.** 167: 399-406.
- Restrepo, A. M., D. L. Greer, M. V. Robledo, G. Díaz, R. López Martínez y 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.
- Rippon, J. W., 1968. Collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. **J. Bacteriol.** 95: 43-46.
- Rippon, J. W. and D. Garber, 1969. Dermatophyte infection of mating type and associated enzymes. **J. Invest. Dermatol.** 53: 445-448.
- Roy, A. D. y M. E. Cameroun, 1972. Rhinophycomycosis entomophthorae occurring in a chimpanzee in the wild in East Africa. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 21: 234-237.