

EFECTO DE KETOCONAZOL, CLOTRIMAZOL, NISTATINA Y CICLOHEXIMIDA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Phaffia rhodozyma*.

Victor Cifuentes, Rubén León & Claudio Gómez
Laboratorio de Genética, Departamento de Ciencias
Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de
Chile. Las Palmeras 3425, Santiago, Chile.

Palabras clave: *Phaffia rhodozyma*, antifúngicos, nistatina, clotrimazol, cicloheximida, alcohol alílico.
Key Words: *Phaffia rhodozyma*, antifungal, nystatin, clotrimazole, cycloheximide, allyl alcohol.

RESUMEN

Debido a la importancia biotecnológica en la producción de pigmentos, se determinaron los niveles de sensibilidad a antifúngicos de 3 cepas de *Phaffia rhodozyma*, con la finalidad de obtener mutantes resistentes, característica usada como marcador en el análisis genético de diferentes microorganismos. El desarrollo de las tres cepas, fue inhibido por ketoconazol, clotrimazol, nistatina y cicloheximida respectivamente. La cepa UCD 67-210 resultó ser la más sensible al ketoconazol, siendo inhibida por concentraciones de 5 ug/ml de dicho compuesto. Para las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 se requieren concentraciones de 20 ug/ml. El clotrimazol, inhibió el crecimiento de las cepas UCD 67-210 y UCD 67-385, a una concentración de 10 ug/ml y a la cepa UCD 67-383 a 20 ug/ml. La nistatina inhibe el crecimiento de las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 a una concentración de 3 ug/ml. y a la cepa UCD 67-210 a 5 ug/ml. La cicloheximida impide el desarrollo de las cepas UCD 67-210 y UCD 67-385 a una concentración de 2 ug/ml. La cepa UCD 67-383 resultó ser la más resistente, requiriéndose concentraciones sobre 6 ug/ml para inhibir su crecimiento.

INTRODUCCION

Phaffia rhodozyma es una levadura clasificada en los *Deuteromycetes*, a pesar de tener todas las características de los *Basidiomycetes*. El criterio utilizado para dicha clasificación se ha basado principalmente en la estructura de su pared celular y el modo de formación de la yema, especialmente la forma multi-capas de la pared en la zona cercana al punto de formación de la yema; lo cual es una característica de los *Heterobasidiomycetes* (Miller y col. 1976). Además tiene la capacidad para utilizar urea, característica poco común en las levaduras

SUMMARY

[Effect of ketoconazole, clotrimazole, nystatin and cycloheximide on the growth of Phaffia rhodozyma]

Due to the importance of biotechnology in the production of pigments, the levels of sensitivity on antifungal drugs of 3 strains of *Phaffia rhodozyma* were determined, with the aim of obtaining resistant mutants, this characteristic is used as a marker in the genetic analysis of the different microorganisms. The growth of three strains was inhibited by ketoconazole, clotrimazole, nystatin and cycloheximide respectively. Strain UCD 67-210 was more sensitive to ketoconazole (it was inhibited by 5 ug/ml) than UCD 67-385 (20 ug/ml was necessary to inhibit entirely their growth). For clotrimazole the UCD 67-210 y UCD 67-385 strains were inhibited by 10 ug/ml and the strain UCD 67-383 was inhibited by 20 ug/ml. Nystatin inhibits the growth of the strains 67-383 and UCD 67-385 at a concentration of 3 ug/ml and the strain UCD 67-210 at 5 ug/ml. The strain UCD 67-383 was no more resistant to cycloheximide (6ug/ml) than UCD 67-210 and UCD 67-385 strains (2 ug/ml).

ascomicéticas, puede fermentar glucosa (Miller y col. 1976) y también sintetizar pigmentos carotenoides, siendo el principal la astaxantina (Andrewes y col. 1976). Sin embargo su ciclo sexual aún no ha sido aún determinado, con lo que su clasificación estaría referida a los hongos imperfectos.

Actualmente ha adquirido una gran importancia desde el punto de vista biotecnológico, especialmente orientado hacia la industria de la acuicultura, utilizándola como fuente de pigmentos en la coloración de la yema de huevos (Johnson y col. 1980) y en la de la carne de especies salmonídeas (Johnson y col. 1977).

* Trabajo financiado por el proyecto B-3051-9222 del Departamento Técnico de Investigación (DTI) de la Universidad de Chile.

Sin embargo, en la actualidad no se tiene conocimiento básico de la genética de esta levadura y los esfuerzos sólo han sido dirigidos a la obtención y caracterización de mutantes sobreproductores de astaxantina (An & col, 1989; Lewis & col, 1990)

En el presente trabajo se determinan, los niveles de sensibilidad de algunas cepas de *Phaffia rhodozyma*, a diferentes agentes antifúngicos. Esta situación ha sido una característica ampliamente utilizada como marcador en el análisis genético de diferentes organismos. De esta manera, dichos estudios permitirán obtener conocimientos para la obtención de mutantes resistentes a los mismos, los cuales pueden ser utilizados en el análisis de la organización genómica de *Phaffia rhodozyma*.

MATERIALES Y METODOS

En este estudio se utilizó las cepas UCD 67-210, UCD 67-383 y UCD 67-385 de *Phaffia rhodozyma*, cuyos números corresponden al American type culture collection (ATCC).

Las cepas de *Phaffia rhodozyma* fueron cultivadas en medio YM en agitación y a 22°C, según la técnica descrita por An & col, (1989). Cuando fue necesario, el medio de cultivo se solodificó agregándole agar al 2%.

Determinación de la sensibilidad frente a diversos antifúngicos.

Para determinar la sensibilidad a antifúngicos, las células fueron desarrolladas hasta obtener una densidad óptica a 550 nm = 0.8-0.9. Como inóculo fueron utilizados cultivos líquidos con una densidad óptica inicial de 0.05. A éstos, se agregó los agentes antifúngicos tal como se indica a continuación: ketoconazol a concentraciones finales que oscilaron entre 0 y 50 ug/ml, clotrimazol a concentraciones finales entre 0 y 10 ug/ml, nistatina a concentraciones finales que oscilaron entre 0 y 5 ug/ml. Los cultivos fueron incubados a 22°C en agitación constante a 130 rpm. El crecimiento fue medido determinando el aumento de la densidad óptica a 550 nm durante un período de tiempo de 0 a 96 horas.

Para determinar los niveles de sensibilidad a la cicloheximida, se realizaron cultivos con una D.O. inicial 550 nm, de 0.05, a los cuales se agregó cicloheximida a concentraciones que variaron entre 0 y 4 ug/ml. Los cultivos líquidos fueron incubados a 22°C en agitación a 130 rpm durante 140 horas. El crecimiento fue determinado como cambio en la densidad óptica a través del tiempo. Para los experimentos realizados con el medio YM sólido, cultivos frescos (a D.O. 550 nm = 0.1) de las cepas de *Phaffia rhodozyma* fueron diluidos en

medio YM líquido. Luego alícuotas de 100 ul fueron sembradas en medio YM sólido suplementado con diferentes concentraciones (entre 0 y 2 ug/ml) de cicloheximida. Las placas fueron incubadas a la misma temperatura y por el mismo lapso de tiempo que los cultivos líquidos, luego las colonias fueron contadas y se determinó su sobrevida.

RESULTADOS

Se caracterizaron tres cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma* en relación a los niveles de sensibilidad al ketoconazol, nistatina, clotrimazol y cicloheximida y se determinó el efecto del alcohol alílico.

La tabla 1. muestra los resultados de la inhibición del crecimiento de las cepas UCD 67-210, UCD 67-383 y UCD 67-385. La cepa UCD 67-210, resultó ser la más sensible al ketoconazol, 1 ug/ml., causa inhibición del 80% del crecimiento y 5 ug/ml impiden totalmente su crecimiento. Las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385 mostraron tener niveles de sensibilidad similares, siendo necesario 20 ug/ml de ketoconazol para inhibir completamente el crecimiento de éstas.

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos frente al clotrimazol. Las cepas UCD 67-210 y UCD 67-385 muestran niveles de sensibilidad similares, ambas son inhibidas entre 90 a 95% cuando se incuban en medio YM en presencia de 5 ug/ml y su desarrollo es completamente inhibido a concentraciones de 10 ug/ml.

Sin embargo, la cepa UCD 67-383 resultó ser la más resistente al clotrimazol, de hecho son requeridas concentraciones de 20 ug/ml para inhibir completamente su crecimiento.

La tabla 3 muestra el efecto de la nistatina en las tres cepas de *Phaffia rhodozyma*. Se puede apreciar que cuando se incuban células de las cepas UCD 67-383 y UCD 67-385, durante 96 horas en presencia de nistatina, a una concentración de 3 ug/ml, se inhibe completamente su crecimiento. Sin embargo para obtener el mismo efecto en la cepa UCD 67-210 se requieren 5 ug/ml en medio líquido. Estos resultados son similares cuando las células se desarrollan en el medio YM sólido.

La tabla 4 muestra la inhibición del crecimiento de las levaduras frente a la cicloheximida en el medio YM sólido. Se puede observar que el desarrollo de las cepas UCD 67-210 y UCD 67-385 es inhibido a una concentración de 0.5 ug/ml, sin embargo, la cepa UCD 67-383, resultó ser resistente a concentraciones de 5 ug/ml. En forma adicional se determinaron los niveles de sensibilidad a la B-ionona y al alcohol alílico (Tabla 5). Para el primer caso, se observó que la B-ionona inhibe el crecimiento de las 3 cepas en un 65% y genera colonias

pálidas, cuando se utiliza a una concentración 10 mM. Concentraciones mayores detienen completamente su desarrollo. Para el alcohol alílico, se ha determinado que su presencia en el medio de cultivo a una concentración de 10 uM, inhibe totalmente el crecimiento de las cepas de *Phaffia rhodozyma*.

La tabla 5, resume las concentraciones inhibitorias de todos los compuestos empleados frente a las 3 cepas de levaduras.

DISCUSION

Los resultados que se muestran en el presente estudio, permitieron determinar la concentración de agentes antifúngicos, bajo los cuales se inhibe el crecimiento de las tres cepas silvestres de *Phaffia rhodozyma*.

La información obtenida puede ser utilizada para la obtención de mutantes resistentes a dichos agentes, los cuales permitirán disponer de marcadores genéticos útiles para el conocimiento de la organización genómica de *Phaffia rhodozyma*.

Los antifúngicos polienicos como la nistatina, inhiben el crecimiento de los hongos, alterando la permeabilidad de las membranas tanto naturales como artificiales (Cirillo y col. 1964). Dichos antifúngicos interactúan con los esteroides específicos de las membranas inhibiendo la síntesis de lípidos. Por estas razones, los polienos han sido muy útiles en la selección de mutantes de la síntesis de esteroides en levaduras (Bard, 1972). Los mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, resistentes a la nistatina, pueden estar afectados en $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ isomerasa o ser deficientes en la 5-deshidrogenasa o la 22-deshidrogenasa o bien en la enzima 24-metiltransferasa, acumulando en todos estos casos, una mezcla de intermediarios de la vía del esteroide, sin producir ergosterol (Henry, 1982).

Por otra parte, se sabe que los antimicóticos imidazólicos, inhiben el desarrollo de los hongos, a través de una alteración de la membrana (Lazo 1986). El ketoconazol, actúa bloqueando la desmetilación C-14 del lanosterol, interfiriendo en la síntesis de ergosterol y puede además alterar la permeabilidad de la membrana e inhibir el transporte de purinas (Lazo 1986). De esta manera, la obtención de mutantes resistentes al ketoconazol, puede significar que se seleccionen cepas afectadas en alguno de tales procesos, lo que constituiría un buen sistema para obtener otros marcadores genéticos en *Phaffia rhodozyma*.

En nuestro análisis, se observa que la cepa UCD 67-210 es mucho más sensible al ketoconazol que las

cepas UCD 67-383 y 67-385, de esta manera, para inhibir el crecimiento de estas últimas, se requieren concentraciones de 20 ug/ml, a diferencia de la primera, la cual es inhibida a 5 ug/ml.

Nuestros resultados indican que las cepas UCD 67-210 y UCD 67-385 son muy sensibles a la cicloheximida, éstos son similares a los descritos anteriormente para la cepa UCD 67-210. Sin embargo, hemos encontrado que la cepa UCD 67-383, es altamente resistente a la cicloheximida, observándose que concentraciones entre 5 y 6 ug/ml, no inhiben su crecimiento. La cicloheximida actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en organismos eucariontes y en algunos casos, actúa a nivel de ribosomas. De esta manera este antimicótico puede ser utilizado para la obtención de mutantes de *Phaffia rhodozyma*, que permitirán disponer de un marcador genético directo y fácil de analizar, contribuyendo al desarrollo de la genética de dicha levadura. Paralelamente nuestros estudios permitieron determinar los niveles de sensibilidad al alcohol alílico de *Phaffia rhodozyma*. Este compuesto es el sustrato de la enzima alcohol deshidrogenasa, que lo transforma en acroleína, siendo esta última, tóxica para las células (Fraenkel, 1982). De esta manera, permitirá disponer de un método de selección de mutantes deficientes en alcohol deshidrogenasa, tal como ha sido logrado en *Saccharomyces cerevisiae* (Lutstorff y col. 1968; Ciriacy, 1979).

Tabla 1
Inhibición del crecimiento de *Phaffia rhodozyma* por ketoconazol

Cepas	Concentración (ug/ml)	Inhibición (%)
UCD 67-210	0	0
	1.0	80
	1.5	88
	5.0	100
UCD 67-383	0	0
	5	85
	10	90
	20	100
UCD 67-385	0	0
	5	85
	10	90
	20	100

Tabla 2. Inhibición del crecimiento de *P. rhodozyma* frente a clotrimazol

Cepas	Concentración [ug/ml]	Inhibición [%]
UCD 67-210	0	0
	1	85
	5	95
	10	100
UCD 67-383	0	0
	1	0
	5	90
	10	95
UCD 67-385	0	0
	1	80
	5	90
	10	100

Continuación ...Tabla 3

B: Medio sólido

Cepas	Concentración [ug/ml]	Inhibición [%]
UCD 67-210	0	0
	1.0	77
	2.0	86
	3.0	nd
	5.0	100
UCD 67-383	0	0
	1.0	30
	2.0	85
	3.0	nd
	5.0	100
UCD 67-385	0	0
	1.0	80
	2.0	90
	3.0	97
	5.0	100

nd = no determinado

Tabla 3. Inhibición del crecimiento de *P. rhodozyma* frente a nistatina

A: Medio líquido

Cepas	Concentración [ug/ml]	Inhibición [%]
UCD 67-210	0	0
	0.5	nd
	1.0	70
	2.0	86
	5.0	100
UCD 67-383	0	0
	0.5	0
	1.0	90
	2.0	95
UCD 67-385	0	0
	0.5	10
	1.0	87
	2.0	94
	3.0	100

Tabla 4. Inhibición del crecimiento de *P. rhodozyma* frente a cicloheximida.

Cepas	Concentración [ug/ml]	Colonias/placa	Inhibición [%]
UCD 67-210	0	2.0×10^5	0
	0.25	3.8×10^4	81
	0.5	1.5×10^4	92
	1.0	0	100
UCD 67-383	0.0	1.0×10^6	0
	0.2	1.0×10^6	0
	0.5	1.0×10^6	0
	1.0	1.0×10^6	0
	6.0	1.0×10^6	0
UCD 67-385	0	1.0×10^6	0
	0.25	5.0×10^4	95
	0.5	0	100

Tabla 5. Resumen comparativo de las concentraciones inhibitorias del crecimiento de las 3 cepas de *P. rhodozyma*, a todos los compuestos empleados

Agente	Cepas		
	UCD 67-210	UCD 67-383	UCD 67-385
Ketoconazol	5 ug/ml	20 ug/ml	20 ug/ml
Clotrimazol	10 ug/ml	20 ug/ml	10 ug/ml
Nistatina	5 g/ml	5 g/ml	5 ug/ml
Cicloheximida	1 ug/ml	>6 ug/ml	0.5 ug/ml
β -ionona	10 mM	10 mM	10 mM
Alcohol alílico	10 uM	10 uM	10 uM

REFERENCIAS

- An, G. H.; Schuman, D. B. & Johnson, E. A.** (1989). Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 116-124.
- Andrewes, A. G.; Phaff, H.J. & Starr, M. P.** (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red-pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15 : 1003-1007.
- Bard, M.** (1972). Biochemical and genetic aspects of nystatin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 115 : 543-549.
- Cirlacy, M.** (1979). Isolation and characterization of further cis- and trans-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Gen. Genet.* 176 : 427-431.
- Cirillo, V.M., Harsch, M. & Lampen, J.** (1964). Action of the polyene antibiotics filipin, nystatin and N-acetylcandidin on the yeast cell membrane. *J. Gen. Microbiol.* 35 : 249-254.
- Fraenkel, D. G.** (1982). Carbohydrate metabolism. In the molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*. (Eds.) J. N. Strathern, E. W. Jones & J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. pp 1-37.
- Henry, S. A.** (1982). Membrane lipids of yeast: Biochemical and Genetic studies. In The molecular biology of the yeast *Saccharomyces* (Eds.) J. N. Strathern, E. W. Jones & J. R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. pp 101-158.
- Johnson, E. A., Conklyn, D. E. & Lewis, M. J.** (1977). The yeast *Phaffia rhodozyma* as a dietary pigment source for salmonids and crustaceans. *J. Fish. Res. Board Can.* 34 : 2417-2421.
- Johnson, E. A., Lewis, M.J. & Grau, C. R.** (1980). Pigmentation of egg yolks with astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Poultry Science* 59 : 1777-1782.
- Lazo, W.** (1986). Fármacos, antisépticos y preservativos antimicóticos. *Bol. Micol.* 2 : 183-204.
- Lewis, M. J., Ragot, M. N., Berlant, M. C. & Miranda, M.** (1990). Selection of astaxanthin-overproducing mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2944-2945.
- Lutstorf, U. & Megnet, R.** (1968). Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-1. *Arch. Biochem. Biophys.* 126 : 933-944.
- Miller, M. W., Yoneyama, M. & Soneda, M.** *Phaffia*, (1976) A new yeast genus in the *Deuteromycotina* (Blastomycetes). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26 : 286-291.