

QUERATINOLISIS POR MICROSPORUM FULVUM. URIBURU.(*)

Delia P. Alvarez, Alicia G. Luque,
Patricia Marini
y María E. Gamberale**

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas.
Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531
Rosario (2000) Santa Fe. República Argentina.

Palabras clave: *Microsporium fulvum*, queratinolisis, herbicidas

Key Words: *Microsporium fulvum*, keratinolysis herbicides

RESUMEN.

Se determina la actividad queratinolítica de cepas de *Microsporium fulvum*, aisladas de suelos de praderas, cuando se desarrollan sobre un sustrato queratinoso, con y sin aplicación de los herbicidas preemergentes: Atrazina, Metribuzín y Alachlor. De acuerdo a la valoración de los productos de reducción por sulfitólisis durante el proceso queratinolítico, éste se estimula al actuar Atrazina, sobre el sustrato de prueba, y está disminuido en el caso de Metribuzín y Alachlor.

INTRODUCCION

En la biodegradación del material queratinoso integrado a los suelos, participan una variedad de microorganismos, entre los cuales están las especies fúngicas conocidas como queratinolíticas, las que, a través de ese proceso degradativo permiten el reciclado de fuentes nitrogenadas y carbonadas, primordiales reservas energéticas para el mantenimiento de tan complejo habitat.

(*) Trabajo subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

(**) Departamento de Matemáticas y Estadísticas de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

SUMMARY

[*Keratinolysis by Microsporium fulvum (Uriburu 1909)*]

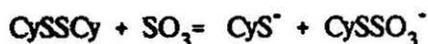
Keratinolytic activity of Microsporium fulvum strains isolated from meadows soils is determined when it develops on a keratinolytic substrate, with and without application of the following preemerging herbicides: Atrazina, Metribuzin, and Alachlor. According to the evaluation of the reduction products through sulphitolysis during the keratinolytic process, it is incremented when Atrazina acts on the tested substrate and it is decreases with Metribuzin and Alachlor.

La desnaturalización del material queratinoso es influenciada por numerosas variables, propias de la dinámica de un ecosistema, más las provocadas por el hombre, y entre ellas cabe destacar la aplicación de numerosos y potenciados biocidas vegetales o herbicidas a los suelos de labranza.

En un plan de actividades relacionadas con el empleo de tales compuestos, comprobamos de qué manera tres herbicidas preemergentes: Metribuzín, Atrazina y Alachlor, en la concentración de 2.5 p.p.m. actúan a nivel de la viabilidad, crecimiento y capacidad nutricional de poblaciones queratinolíticas de suelos de pradera (Alvarez, 1986). Continuando con las metas programadas en el plan citado, realizamos el estudio de la influencia que los agroquímicos referidos, tienen sobre determinado sustrato queratinoso, tratado con los mismos, en relación a la actividad quera-

tinolítica desarrollada en ese sustrato por cepas de *Microsporium fulvum*, dermatofito geofílico más frecuentemente aislado de las parcelas experimentales.

De acuerdo con los trabajos de Kunert, J. (1972-1976), el proceso queratinolítico en las queratinas componentes de la piel y faneras, ricas en restos de cistina, con puentes disulfuro transversales. Además tiene lugar una acción enzimática (Takiuchi y col. 1982) de naturaleza química, reductora de esos enlaces, por sulfitos liberados por el hongo al medio, de acuerdo a la siguiente reacción:



Se puede así determinar en el medio de desarrollo, la presencia de sulfitos, cisteína, S-sulfocisteína y sulfatos como producto de oxidación de esos compuestos.

En esta experiencia son dadas a conocer las valoraciones realizadas sobre esa reacción de sulfitolisis y su influencia en el comportamiento de la micota queratinolítica geofílica bajo la acción de herbicidas.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con cepas de *Microsporium fulvum*, aisladas de suelos de pradera sin tratamiento con biocidas y de diez días de desarrollo en Agar Sabouraud Glucosa. A partir de tales cultivos, fue preparada una suspensión de aproximadamente 10^6 conidios por ml., empleando agua destilada estéril para cubrir la superficie libre del desarrollo y con agitación en el Vortex; el conteo de los elementos se hizo en cámara de Neubauer.

El medio básico para el estudio de la queratinolisis contiene K_2HPO_4 400 mg, MgCl_2 30 mg, Penicilina 20 mg, Estreptomocina base 20 mg, en un litro de agua destilada estéril, a pH - 7.5 y esterilizado por filtración. Se preparó el sustrato queratinoso con cortes de pelos de crines de caballo, previamente lavados con agua destilada y luego esterilizados con óxido de etileno durante dos horas.

Este material fue luego mantenido durante 48 horas, en una suspensión acuosa preparada con 2.5 p.p.m. de los herbicidas preemergentes: Metribuzin (4 amino-6-(1,1 dimethyl ethyl) 3-(methylthio)-1,2,4 triazina-5 (411) one; Atrazina (2 cloro-4 (ethyl-amino) 6 (isopropylamino) 5 triazina y Alachlor 2 cloro-n (2-6 diethylphenyl)-N-methoxymethyl-acetamida), pasado ese tiempo se

removió todo el excedente de los mismos por sucesivos lavados en agua destilada estéril; 500 mg de este sustrato con y sin tratamiento herbicida se suspendieron en 200 ml del medio básico más 2,0 ml de la suspensión de conidios, ya indicada.

En tales condiciones, se prepararon cuatro series de ensayos, con cuatro cultivos cada una, por duplicado, correspondientes al testigo: *M. fulvum* en queratinas sin tratamiento y los restantes en queratinas con: Alachlor, Atrazina y Metribuzin, incubándose a 28° C. A los 10, 20, 30 y 40 días de siembra, se hicieron los filtrados del desarrollo correspondiente a cada ensayo. En una parte de la muestra fue determinada la concentración de sulfitos por el método de West y Gaeche (Scaringelhi y col. 1967), de sulfatos de acuerdo a la técnica de Chopra (1964), y el total de cisteína más cistina y S-sulfocisteína, con el método de Cavallini y col. (1966). Para tener el dato de la concentración de S-sulfocisteína, la otra parte del filtrado se pasó por columna con Sephadex G10, en la elución conteniendo S-sulfocisteína libre y combinada a polipéptidos, separándose los sulfitos y sulfatos por precipitación a pH-4, con acetato de bario (Kunert 1976). La solución obtenida del filtrado se pasó a través de una columna con Dowex W50 x 8, en forma catiónica, adsorbiéndose todos los aminoácidos, menos S-sulfocisteína. El eluato resultante fue oxidado con peróxido de hidrógeno al 10%, eliminado el exceso por ebullición se hizo el dosaje del contenido de S-sulfocisteína como sulfato por la técnica turbidimétrica de Chopra. Paralelamente a las determinaciones de los productos de la queratinolisis, fue observada la micro-morfología del desarrollo de *M. fulvum* sobre las queratinas con y sin tratamiento herbicida, como también se practicaron repiques en medio de Agar Sabouraud Glucosa.

Aplicando el método de comparación de Tukey, se determinó la máxima diferencia no significativa, en valor absoluto (D) entre los promedios correspondientes a las concentraciones de sulfitos, sulfatos, cisteína y S-sulfocisteína valoradas en el medio de desarrollo de *M. fulvum*, considerado como testigo, es decir con queratinas no tratadas y en el correspondiente a las queratinas con cada uno de los tratamientos herbicidas. Se establecieron además las diferencias (d) observadas entre las medias aritméticas de esos promedios, a un nivel de significación del 5%; a los 10, 20, 30 y 40 días de realizadas las siembras.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figuras 1 y 2, están determinados los valores promedio de sulfitos y sulfatos, liberados

al medio de cultivo a los 10, 20, 30 y 40 días de iniciado el estudio de la queratinolisis como catabolitos del desarrollo o como productos finales en la oxidación de cisteína y S-sulfocisteína, resultantes de la reacción de sulfitólisis.

A los 10 días del desarrollo de *M. fulvum* sobre las queratinas tratadas con cada uno de los herbicidas, la concentración de sulfitos es significativamente menor respecto al testigo, esa diferencia es más marcada para Alachlor (d: 7.35; D: 0,88), en segundo término para Metribuzín (d: 5.20) y para Atrazina es superior a la de los otros dos biocidas y ligeramente inferior a la del testigo (d: 1.40).

En la valoración de los sulfatos, a ese tiempo, se tiene una concentración promedio significativamente inferior a la obtenida con el medio de queratinas no tratadas, tanto para Alachlor (d: 9.40; D: 1,38) como para Metribuzín (d: 7.30); pero para Atrazina, es significativamente superior (d: 6.20).

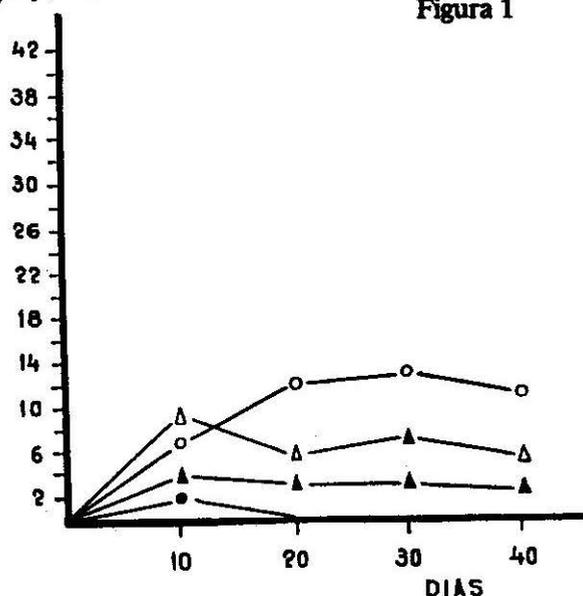
A partir de los 20 días no se dosaron sulfitos en el medio de queratinas tratadas con Alachlor, siendo el resultado obtenido para Metribuzín, significativamente inferior al del cultivo testigo (d: 3.05; D: 1,24), mientras que con Atrazina hay una diferencia significativamente superior (d: 6.85).

Las concentraciones promedio de los sulfatos a los 20 días, son significativamente muy inferiores al testigo para Alachlor (d: 16.5; D: 1,2) y Metribuzín (d: 4.5), mientras que con Atrazina, se alcanza un valor significativamente superior (d: 5.8). Estas diferencias se observan a los 30 y 40 días de iniciada la experiencia, tanto en la valoración de los sulfitos como en la de los sulfatos.

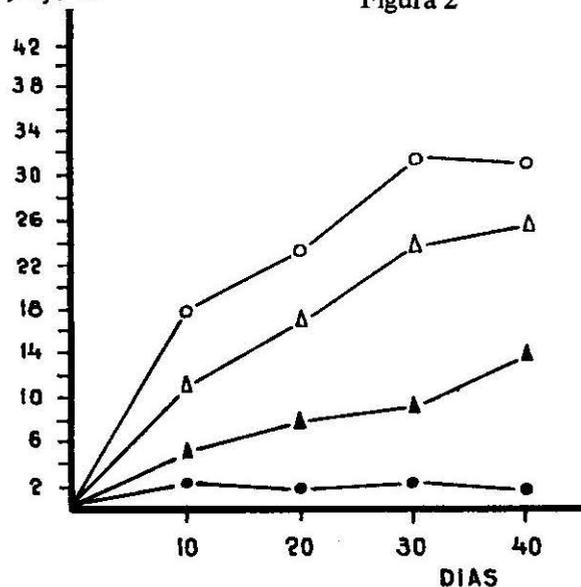
Si bien los valores de concentración de sulfitos son menores que los obtenidos para los sulfatos, sobre todo a partir de los 20 días de incubación, puede considerarse esa disminución como aparente, pues si se suma la concentración molar de los sulfitos libres y con los combinados, se tiene una mayor cantidad de sulfitos que sulfatos, liberados durante la primera fase de oxidación de la cisteína. Por otra parte, la producción de sulfatos se muestra incrementada hasta los 40 días del desarrollo, como índice de que aún en ese tiempo, no se ha iniciado la fase autocatalítica.

En las figuras 3 y 4, están determinadas las concentraciones medias correspondientes a todos los compuestos orgánicos con grupos sulfhidrilos y disulfuros valorados como cisteína total y S-sulfocisteína solamente como sulfato. De acuerdo con esos datos, a los 10 días del desarrollo de *M. fulvum* sobre queratinas tratadas, se tiene en el filtrado de los cultivos una disminución significativa de la S-sulfocisteína con respecto a los cultivos testigos; sobre todo para Alachlor (d: 6.20; D: 1,33) y Metribuzín (d: 5.0) siendo no tan marcada para Atrazina (d: 2.25).

$\mu\text{g/ml}$

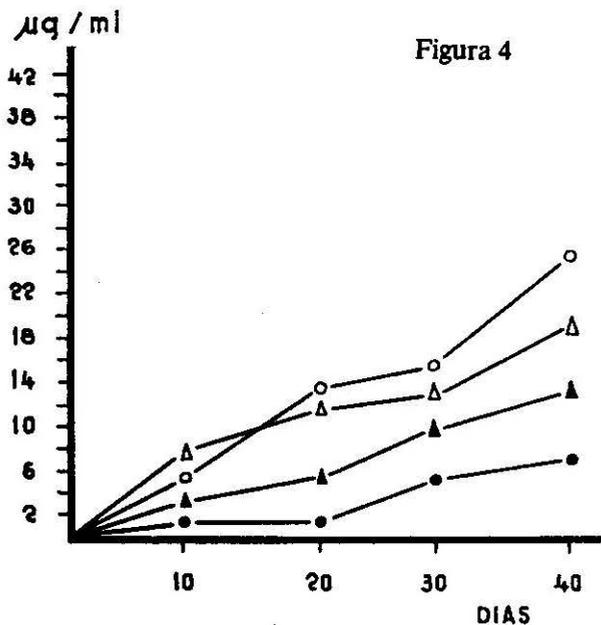
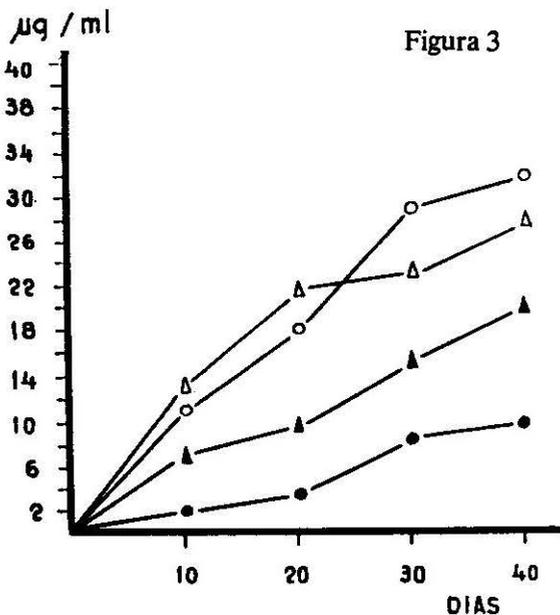


$\mu\text{g/ml}$



Contenido de Sulfito Figuras 1 y 2, en el filtrado del desarrollo de *Microsporium fulvum*, sobre queratinas con y sin aplicación de herbicidas.

Sin aplicación Δ-Δ
 Con aplicación de Alachlor ●-●
 Atrazina ○-○ Metribuzin ▲-▲



Contenido de cisteína total Figura 3 y S-sulfocisteína Figura 4, en el filtrado del desarrollo de *Microsporium fulvum*, sobre queratinas con y sin aplicación de herbicidas.

Sin aplicación: △-△
 Con aplicación de: Alachlor ●-●
 Atrazina ○-○, Metribuzin ▲-▲

A igual tiempo los datos obtenidos en las valoraciones de la cisteína total, también son significativamente inferiores al testigo, para Alachlor (d: 10.25; D: 0,98) y Metribuzín (d: 5.40) no así para Atrazina (d: 0.55).

A partir de los 20 días las concentraciones de S-sulfocisteína son estadísticamente inferiores al testigo, para el tratamiento con Alachlor (d: 7.4; D: 0,86) y Metribuzín (d: 2.0). Esta significación de las diferencias, se manifiesta a los 30 y 40 días de realizados los cultivos.

Con los dosajes de cisteína, se alcanza a los 20 días promedios significativamente inferiores al del sustrato no tratado con Alachlor (d: 17.80; D: 1,22), Metribuzín (d: 11.5) y Atrazina (d: 8.70). Tales dosajes se hacen significativamente superiores a los 30 días con Atrazina (d: 9.1; D: 1,16), y a los 40 días (d: 5.36; D: 1.54). Con los otros herbicidas -Alachlor y Metribuzín- les corresponden promedios muy inferiores al de las queratinas no tratadas, en todos los tiempos de incubación.

Por repique del desarrollo sobre el sustrato queratinoso con y sin aplicación de los herbicidas de prueba, en el medio de Agar Sabouraud Glucosa, se tienen desarrollos que varían en su aspecto macromorfológico y la producción de pigmentos.

Micromorfológicamente, en los repiques del desarrollo en queratinas tratadas con Alachlor se observa ausencia o escasa formación de macroconidios y en el crecimiento sobre ese sustrato no se forman órganos perforadores como en los testigos. Se ha demostrado que derivados de la homocisteína, reprimen la esporulación y pigmentación en los dermatofitos, (Weary y col).

Pugh y Agrawal (1983) demuestran en desarrollos de *Keratinomyces ajelloi* sobre fibras de lana puestas en contacto con los herbicidas: 2,4,5-Trichlorophenoxy acético y Paraquat, un bipyridilo, la menor degradación de esas queratinas, tal como lo observámos en *M. fulvum* con Metribuzín y Alachlor.

CONCLUSIONES

De acuerdo con Ruffin (1976) y Weary (1965), la sola observación del crecimiento de cepas de dermatofitos sobre queratinas, no es suficiente para atribuir una actividad queratinolítica, sino que es necesario demostrar la presencia de los compuestos resultantes de tal actividad, por vía del análisis químico o enzimático, (Grappel 1972 Takiuchi 1982).

En nuestro caso la valoración de los compuestos azufrados, como productos de una sulfitolisis o reducción de los puentes disulfuros

con alto porcentaje en las queratinas, nos lleva a determinar, que conforme al desarrollo experimental, las cepas de *M. fulvum* tienen actividad queratinolítica sobre el sustrato empleado.

Cuando el sustrato empleado, sobre el que se ha demostrado actividad queratinolítica de las cepas de *M. fulvum*, se pone en contacto con biocidas vegetales que responden a la estructura de las triazinas como Atrazina, Metribuzín, y de una amida clorada como Alachlor, esa actividad queratinolítica varía con respecto al testigo. Las concentraciones promedio de los compuestos azufrados que se valoraron fueron siempre significativamente superiores a las obtenidas en queratinas tratadas con Alachlor y Metribuzín y, en general, menores que las obtenidas con Atrazina. Estas últimas sin embargo, fueron siempre superiores a las valoradas para los otros dos herbicidas.

El conocimiento de las reacciones que pueden darse entre esos biocidas y las proteínas fibrosas

utilizadas como sustrato para el desarrollo de *M. fulvum*, nos lleva a interpretar su mayor capacidad queratinolítica cuando sobre tal material actúa la Atrazina y su disminución al aplicarse Metribuzín y sobre todo Alachlor. También nos permite fundamentar las causales de variaciones macro y micromorfológicas que se traducen en un comportamiento bioquímico y fisiológico cambiante, en las cepas estudiadas.

Las variaciones observadas de la actividad queratinolítica frente a estos herbicidas, remarca una vez más las implicancias que el uso intensivo de los biocidas vegetales tiene sobre el equilibrio de la micota geofílica queratinolítica, al producir alteraciones en la disponibilidad de los nutrientes naturales que son de su competencia (las queratinas), y por lo tanto importantes cambios en la interrelación con el resto de las poblaciones de los suelos.

REFERENCIAS

1. Alvarez, D.P.; Luque, A.G. y Marini, P. (1986). Influencia de herbicidas sobre la micota queratinolítica de los suelos. *Boletín Micológico*. 1: 81-85.
2. Cavallini, D.; Graziani, M.T.; Dupré, S. (1966). Determination of disulfide groups in proteins. *Nature*. 212: 294.
3. Chopra, S.L. (1964). A turbidimetric method for micro-determination of sulphur in proteins. *Inc. J. Chem.*, 21: 218.
4. Grappel, S.F.; Blank, I. (1972). Role of keratinase in dermatophytes. *Dermatologia* 145: 245-255.
5. Kunert, J. (1972). Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes in vitro. *Sabouraudia* 10: 6-13.
6. Kunert, J. (1976). Keratin decomposition by dermatophytes. *Zeitschrift für Allg. Mikrobiologie*, 16: 2, 97-105.
7. Pugh, G.G.F.; Agrawal, S. (1983). Sensitivity of *Trichophyton ajelloi* to some common agrochemicals. *Mycopathologia* 81: 117-121.
8. Ruffin, P.; Andrieu, S.; Biserte, G.; Biguet, J. (1976). Sulphitolysis in keratinolysis. *Biochemical proof*. *Sabouraudia* 14: 181.
9. Scaringelli, F.P.; Saltzmann, B.E.; Frey, S.A. (1967). Spectrophotometric determination of atmospheric sulfur dioxide. *Anal. Chem.* 39: 1709.
10. Takiuchi, I.; Donsei, H.; Joshiihiro, S.; Miho, K. (1983). Isolation of extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis*. *Sabouraudia* 20: 281-288.
11. Weary, P.E.; Canley, C.M. and Cawley, E.P. (1965). Keratinolytic activity of *Microsporum canis* and *M. gypseum*. *J. Invest. Dermatol.* 44: 300-310.