

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



C B S

Comparación de la producción de lacasa, N-acetil-hidróxitriptofano y esporas en cepas de *Aspergillus niger* y una cepa de *A. nidulans*.

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología**

PRESENTA

Biol. José Félix Pedro Paisano Morales

Julio/2002

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-O/Maestría en Biotecnología**.”

**El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó
La comunicación de resultados que presentó:**

José Félix Pedro Paisano Morales

El día 12 de julio de 2002

Comité Tutorial

Tutor: Dr. Gustavo Viniegra González



Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres



Asesor: Dr. Octavio Loera Corral



Sinodal: Dra. Beatriz Xoconostle Cázares

Sinodal: Dr. Roberto Ruiz Medrano.

Agradecimientos.

Este trabajo tendría que dedicarlo a distintas personas y es posible que deje de mencionar a alguna, pero eso es solo por mi mala memoria, por lo que desde este momento pido disculpas a quienes no mencione.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Gustavo Viniegra González quien, a pesar de mis deficiencias académicas e intelectuales, aceptó ser mi tutor para el desarrollo de ésta tesis, siendo además un amigo que me apoyó y motivó para la conclusión de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela Torres por la cuidadosa revisión que hizo de este trabajo y sus valiosos comentarios, que he apreciado mucho, sin los cuales estoy seguro, no habría concluido este trabajo.

Al Dr. Octavio Loera Corral por los ánimos que me infundió desde que formó parte del comité tutorial.

También quiero agradecer a la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares y al Dr. Roberto Ruiz Medrano por aceptar revizar este trabajo y por los comentarios y correcciones que han enriquecido el resultado final.

Así mismo, quiero agradecer a los compañeros del laboratorio toda suerte de discusiones y comentarios, especialmente a César Gonzalez y Sergio Romero, mis amigos y críticos más duros. A Julieta Mendoza, por ser tan optimista con respecto a mi capacidad intelectual. A Virginia Barragán por ser mi amiga y escuchar pacientemente mis divagaciones sobre mi tesis y otros temas.

También quiero agradecer a la Sra. Eva Azcona quien con gran paciencia permitió que trabajara en su casa, al Arq. Manuel Olguín y al Profesor Hugo Olguín por permitirme usar su equipo de cómputo y su conexión a Internet a sabiendas de mi poca habilidad en informática. Al Arq. Gustavo Paisano por confiar en que usaría correctamente su equipo de cómputo y su conexión a Internet, no obstante haber yo destruido sus juguetes cuando fuimos niños.

Finalmente, quiero hacer patente que cualquier error o falta en este trabajo, solo pueden ser responsabilidad mia y pido una disculpa por ello.

Dedico este trabajo a Eva y a Susana:

A Eva porque a pesar de mi incapacidad confió en mí, me animó y una que otra vez me riñó para terminar;

A Susana porque la quiero y nada más.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **1**

INTRODUCCIÓN **3**

a) Generalidades de los hongos	3
b) Posición taxonómica de <i>Aspergillus niger</i> y <i>A. nidulans</i>	3
c) Esporulación de <i>A. nidulans</i>	4
Capacitación de la esporulación	5
Fases del desarrollo conidial	5
d) Cepas capaces de producir proteínas heterólogas en un medio líquido y sólido	9
e) Pigmentos de las esporas	10
f) Lacasa	13
g) Modelos de crecimiento en superficies	16

OBJETIVOS **20**

HIPÓTESIS **21**

MATERIALES Y MÉTODOS **22**

a) Cepas utilizadas	22
b) Conservación de las cepas	22
c) Reactivación de las cepas	22
d) Condiciones y medio de cultivo para cinéticas	23
e) Cinéticas de crecimiento	23
f) Ajuste de curvas de crecimiento y de los parámetros cinéticos	23
g) Obtención de extractos para la determinación enzimática	23
h) Obtención de extractos para la evaluación del N-acetil-6-hidroxitriptofano (NAHT)	24
i) Actividad de lacasa	24
j) Evaluación del NAHT	24
k) Esporulación de las cepas de estudio	24

RESULTADOS **25**

Cinéticas de crecimiento	25
Actividad de lacasa medida con ácido gálico	27
a) Actividad total de lacasa	27
b) Actividad específica de Lacasa	29
Actividad Enzimática ligada al Crecimiento	29
Producción de N-acetil-6-hidróxitriptofano	30
Producción de esporas	33
Secuencia de eventos en las cinéticas de estudio	34

DISCUSIÓN **36**

Inóculo y tipo de inoculación	36
Germinación de esporas	36
Producción de biomasa	37
Diferenciación de hifas	38
Aspectos morfológicos del crecimiento en placa	41
Actividad enzimática	42
Producción de esporas	43
Secuencia de eventos	45

CONCLUSIONES **48**

ANEXO 1 DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LACASA **49**

ANEXO 2 FACTORES QUE INDUCEN LA FORMACIÓN DE ESPORAS **54**

ANEXO 3 MODELO LOGÍSTICO **55**

GLOSARIO DE TÉRMINOS USADOS EN EL PRESENTE TRABAJO **58**

BIBLIOGRAFÍA **61**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que favorecen la esporulación	5
Figura 2. Desarrollo de conidióforos de <i>Aspergillus nidulans</i>	6
Figura 3. Precursores de melaninas fúngicas	11
Figura 4. Oxidación de hidroquinona mediada por lacasa	13
Figura 5. Mecanismos propuestos para la formación de mucolactona durante la oxidación de lignina por lacasa de <i>Coriolus versicolor</i>	14
Figura 6. Oxidación de ácido siríngico por lacasa de <i>Trametes versicolor</i>	14
Figura 7. Cinéticas de crecimiento a) <i>Aspergillus nidulans bca</i> b) <i>Aspergillus niger fawn</i> c) <i>A niger C28B25</i> d) <i>A niger fluffy</i>	25
Figura 8. Actividad total de lacasa a) <i>A nidulans bca</i> b) <i>A niger fawn</i>	28
Figura 9. Actividad total de lacasa de <i>Aspergillus niger C28B25</i>	28
Figura 10. Actividad específica de las cepas esporógenas	29
Figura 11. Ajuste de la curva de producción de enzima de <i>Aspergillus nidulans bca</i> y <i>Aspergillus niger fawn</i>	30
Figura 12. Ajuste de la curva de producción de enzima de <i>Aspergillus niger C28B25</i>	30
Figura 13. Producción de N-acetil-6-hidroxitriptofano a diferentes tiempos, medido a 530 nm	31
Figura 14. Cromatograma en papel	32
Figura 15. Producción de esporas en las cepas de estudio	33
Figura 16. Valores normalizados de producción de biomasa, enzima, pigmentos y esporas de <i>Aspergillus nidulans bca</i>	34
Figura 17. Valores normalizados de producción de biomasa, enzima, NAHT y esporas de <i>Aspergillus niger fawn</i>	35
Figura 18. Valores normalizados de producción de biomasa, enzima, NAHT y esporas de <i>Aspergillus niger C28B25</i>	35
Figura 19. Crecimiento y aparición de estructuras reproductivas	41
Figura 20. Secuencia de evento observados durante el presente trabajo en las cepas de <i>Aspergillus niger</i>	45
Figura 21. Detreminación experimental del tiempo de competencia	46
Figura 22. Oxidación de ácido gálico en diferentes reguladores	49
Figura 23. Absorbancia de ácido gálico a diferentes concentraciones, medida a 235 nm	50
Figura 24. Absorción de extracto enzimático de <i>Aspergillus niger</i> , ácido gálico y ácido gálico oxidado	51
Figura 25. Oxidación de ácido gálico en presencia de diferentes extractos	51
Figura 26. a) Espectro del ácido gálico 5 mM y extracto de <i>Aspergillus niger C28B25</i> , cada 5 min b) Disminución de ácido gálico en el tiempo a 235 nm	53
Figura 27. Disminución de la absorbancia de ácido gálico 5 mM a diferentes concentraciones de extracto de <i>Aspergillus niger C28B25</i> a 235 nm	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutantes de desarrollo conidial de <i>Aspergillus nidulans</i> (Griffin, 1994)	7
Tabla 2. Ejemplos de expresión de genes heterólogos en <i>Aspergillus</i>	10
Tabla 3. Diferentes tipos de lacasas y substratos	15
Tabla 4. Modelos propuestos para estudiar el crecimiento en superficies	18
Tabla 5. Características de las cepas de estudio	22
Tabla 6. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas de estudio	26
Tabla 7. Picos de actividad total y tiempo de aparición	28
Tabla 8. Valores de α y β encontrados por el ajuste de la ecuación de Leudeking y Piret	29
Tabla 9. Rf's obtenidos por cromatografía en papel	32

Resumen.

La caracterización cuantitativa del proceso de crecimiento de los *Aspergillus* es de gran interés experimental y básico para poder entenderlo, modificarlo y controlarlo.

Es importante el desarrollo de técnicas cuantitativas sobre sustratos sólidos (placas de agar), porque la mayoría de los estudios publicados se han realizado en sustratos líquidos (matraces agitadas), aunque en condiciones naturales este tipo de microorganismos crece en sustrato sólido y es posible que la fisiología de esporulación sea distinta entre medio líquido y sólido.

En esta tesis se desarrolló una metodología cuantitativa y reproducible para medir simultáneamente las cinéticas de formación de biomasa (mg/cm^2), la producción de enzima lacasa (UI/cm^2), de esporas (N/cm^2) y de pigmentos (UA/cm^2). Con estos datos se pudieron identificar los parámetros cinéticos de crecimiento correspondientes, basados en un modelo logístico. Se desarrolló un método para evaluar cuantitativamente la actividad de lacasa con ácido gálico como sustrato

Se usaron tres cepas de *Aspergillus niger* (C28B25, *fawn* y *fluffy*) y una de *A. nidulans* (*blanca*); las cepas esporógenas de *A. niger* (C28B25 y *fawn*) tuvieron una μ (0.14 h^{-1}) y un crecimiento máximo similar (2.99 y $2.45 \text{ mg}/\text{cm}^2$ respectivamente), en tanto que, la cepa de *A. nidulans* creció a una mayor velocidad ($\mu = 0.31 \text{ h}^{-1}$) y se obtuvo un nivel máximo de biomasa de $1.94 \text{ mg}/\text{cm}^2$.

Cuando se analizó la producción de lacasa, se encontró que para las cepas esporógenas, tanto de *A. niger* como la de *A. nidulans*, ésta se encuentra ligada al crecimiento micelial. Por otro lado, la cepa anesporógena *A. niger fluffy* no produjo lacasa ni pigmentos.

Se encontró que al final del cultivo el número de esporas de las cepas que producen pigmentos permanece estable, en comparación a la cepa blanca de *A. nidulans* en donde se ve una disminución al final de la cinética.

Se concluye que la metodología usada en el presente trabajo permite evaluar la secuencia de eventos ligados a la esporulación y comparar fenotipos distintos, que permitirán hacer un análisis fisiológico de dicha secuencia.

a) Generalidades de hongos

La palabra hongo viene del verbo latino *fungus*, florecer. Con excepción de las levaduras los hongos verdaderos crecen como una masa de filamentos denominada micelio. Cada filamento individual del micelio constituye una hifa. Los hongos inferiores poseen hifas no septadas, en tanto que en los hongos superiores (Ascomycotina, Basidiomycotina y Deuteromycotina) las hifas presentan septos, pero éstos están perforados. A través de los poros de los septos existe un flujo continuo de citoplasma y migraciones nucleares. De este modo, el micelio y la hifa funcionan esencialmente como un cenocito (Ulloa y Hanlin, 1978).

Los hongos se encuentran agrupados dentro del reino *Fungi*. Se caracterizan por tener una estructura celular eucariótica (Bailey *et al*, 1997). Son heterótrofos, contienen quitina en su pared celular y acumulan glucosa en forma de glucógeno (Ulloa y Hanlin, 1978).

b) Posición taxonómica de *Aspergillus niger* y *A. nidulans*.

Cuando se conoce únicamente la espora del estado asexual de un hongo, el hongo se clasifica dentro de los *Deuteromycotina* u hongos imperfectos (Bennett, 1991). Tanto *A. niger* como *A. nidulans* pertenecen a la división-forma *Fungi imperfecti* o Deuteromycota. Esta categoría es artificial ya que los miembros de este grupo se clasificaron de esta manera porque aparentemente no presentaban un estado sexual. Sin embargo, en esta categoría se clasificaron tanto Ascomycetes como Basidiomycetes (Moore-Landecker, 1996). Los *Fungi imperfecti* están divididos en clases-forma basados en sus similitudes morfológicas. Los criterios que se usan normalmente son el color, la forma, la talla y el tipo de conidios. Esto ocasiona que hongos no relacionados se encuentren juntos ya que comparten a simple vista, la misma forma de las esporas (Alexopoulos y Mims, 1979).

Un grupo importante de hongos es la forma-clase Hyphomycetes, que son hongos imperfectos que forman un micelio pero carecen de esporocarpo. Los conidios o esporas asexuales nacen en conidióforos. Los Hyphomycetes pueden ser reconocidos en un cultivo por la apariencia pulverulenta y

algodonosa de la colonia. Ejemplos de los Hyphomycetes incluyen *Penicillium*, *Epicoccum* y *Aspergillus*.

En el momento de la reproducción, algunas partes específicas del micelio se diferencian y forman esporas sexuales o asexuales, generalmente asociadas con otras estructuras complejas. Estas estructuras, junto con el tipo de spora, forman el criterio principal para la clasificación de los distintos tipos de hongos (Alexopoulos y Mims, 1979).

Las esporas de algunas especies de *Aspergillus* son hialinas (sin color), en tanto que algunas otras, como las de *Aspergillus niger* son de color café oscuro. El género *Aspergillus* es de los más ampliamente distribuidos, se encuentran en diferentes ambientes y despliegan una gran versatilidad fisiológica (Ulloa y Hanlin, 1978; Bennett, 1991). Estos microorganismos pueden ser aislados fácilmente del aire, materiales en descomposición, del suelo, alimentos almacenados y otras fuentes. Varias especies tienen características metabólicas que las hacen atractivas para su utilización comercial.

c) Esporulación de *A. nidulans*.

En 1899, a partir de sus propias investigaciones, Kleb propuso una serie de condiciones relacionadas con la esporulación (Ver anexo 2) que se resumen en la figura 1. De ellos, se desprende que para iniciar la esporulación, el hongo debe tener un aporte bajo de nitrógeno. Cultivos que son crecidos en un medio líquido con una baja tensión de oxígeno deben ser cambiados a un medio muy oxidante (Cui *et al*, 1997). Solo en estas condiciones se inicia la formación de la célula pie. Un aporte constante de glucosa favorece la elongación del conidióforo, no obstante este evento es detenido si aumenta el amonio (NH_4^+) intracelular, aunque el efecto del amonio es detenido si se suplementa el cultivo con ácidos grasos.

La formación de méticas, vesículas que genera fiálides o células conidiógenas, es inhibida también por un aumento del amonio intracelular. Para completar la formación de conidios se requiere un aporte de nitratos, aunque el amonio puede inhibir este desarrollo.

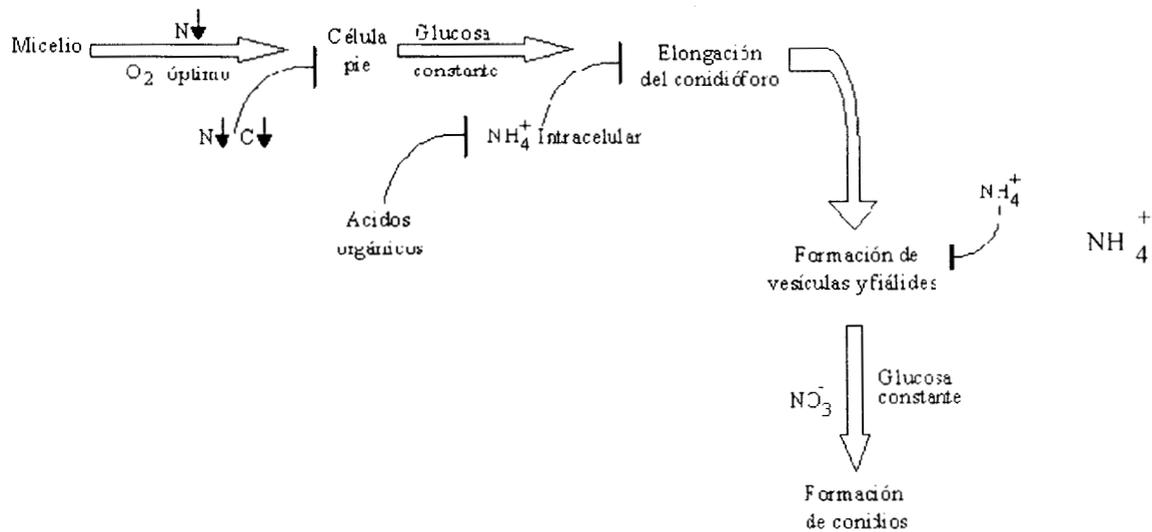


Figura 1. Factores que favorecen la esporulación Kleb (1899)

- Capacitación de la esporulación.

El concepto de capacitación de la esporulación ha sido aplicado a la esporulación en *Aspergillus nidulans*. La capacitación es la habilidad para responder a estímulos y se ha visto en *A. nidulans* como el tiempo mínimo que puede pasar después de la siembra de las esporas del hongo para responder a las condiciones que inducen el desarrollo conidial.

- Fases del desarrollo conidial.

A. nidulans presenta fases de esporulación tanto sexual como asexual (Fig. 2). Las ascosporas se forman en cleistotecios esféricos. Las conidiosporas se producen en un esporóforo que consiste en una célula que forma un pie y que soporta el crecimiento de un tallo hifal que termina en las métulas, cada una con dos o tres fiálides que a la vez producen conidias (Fig. 2). Los conidios se producen en cadenas por sucesión biseptal al inicio de la punta de la fiálide.

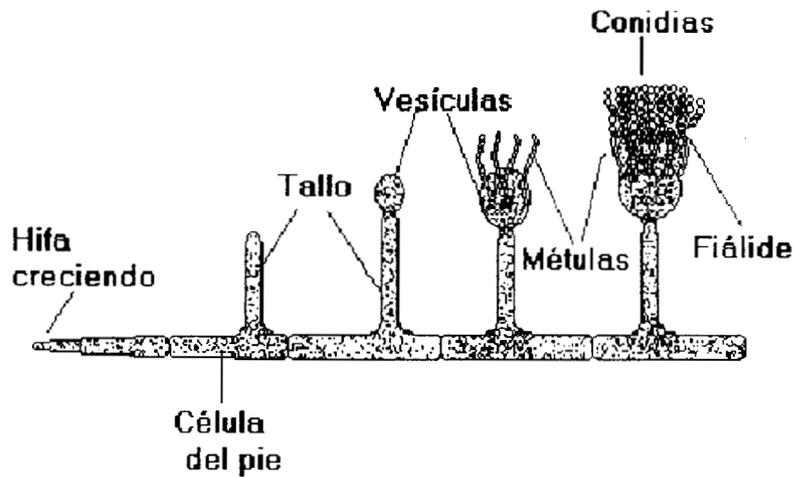


Figura 2. Desarrollo de los conidióforos de *Aspergillus nidulans* (Tomado de Griffin, 1994)

El desarrollo (Fig. 2) se inicia con la formación de la célula podal y el crecimiento de una hifa aérea de pared delgada que constituye el tallo del conidióforo. El tallo crece a una altura aproximada de 100 μm . La elongación cesa y las vesículas citoplásmicas se dispersan a la periferia del citoplasma formando una vesícula apical. El núcleo se divide repetidamente en el tallo elongado y los núcleos migran a la punta, donde se han visto divisiones adicionales. Se genera la vesícula y en ésta se producen yemas sincrónicamente en la superficie de la vesícula en formación. Una división sincrónica final del núcleo ocurre con la migración final de un núcleo hijo a cada mètula. De cada mètula se genera una a varias fiálides uninucleadas que se desarrollan como ramas en la punta y los lados de la mètula. Las fiálides producen las esporas con divisiones mitóticas continuas de un único núcleo. La formación de las esporas y la maduración de la punta de las fiálides sigue una secuencia ordenada. La formación de las paredes externas del conidio es una extensión de la pared interna de la fiálide. Al tiempo de la delimitación del conidio en la punta de la fiálide, dos capas de la pared celular se pueden apreciar, la C1 (externa) y la C2 (interna) (Griffin, 1994). Subsecuentemente, se forma la C3, entre la C1 y la C2. Finalmente, se forma la capa más interna, la C4 que torna a la espора impermeable (Timberlake, 1990).

Las cepas mutantes afectadas en la conidiogénesis incluyen a aquellas que previenen la competencia y aquellas que afectan directamente el desarrollo del conidióforo. (Tabla 1).

Tabla 1. Mutantes de desarrollo conidial de *Aspergillus nidulans* (Griffin, 1994)

Mutante clase:	Fenotipos:	Designación:
I	Aconidial, conidióforos ausentes. retraso de la capacitación 2-3.5 h después que la silvestre; o adquisición de la capacitación alterada por luz roja o roja lejano, aterciopeladas	<i>acoA (fluG), acoB, acoC</i>
Ila	Estructura conidial y pigmentación blanca o conidios negros encerrados por una pared común externa. Pigmentación amarilla, blanca, carnaza	<i>wetA drkA</i> <i>yelA, whiA, fwnA</i>
Iib	Pigmentación y estructura del conidióforo atrofiados, pared delgada, generación de una serie adicional de métulas, conidióforos café claro.	<i>StuA</i> <i>MedA</i> <i>IvoA, ivoB</i>
Iic	Aconidiales con conidióforos presentes. Conidióforos indeterminados sin hinchamiento terminal (bristle), fiálides ramificadas sin formación de conidios (ábaco)	<i>brlA</i> <i>abaA</i>

Las cepas mutantes aconidiales clase I (por ejemplo las *acoA*) esporulan normalmente a 42° C cuando el organismo se crece en condiciones no inductivas a temperaturas entre 10 y 30° C antes de la capacitación, pero no conidial cuando el periodo de crecimiento preinductivo es a 42° C.

Esto podría dar luz sobre el tipo de señales ambientales durante el periodo del cambio de un crecimiento vegetativo al del desarrollo reproductivo.

El análisis de las cepas mutantes de clase II ha demostrado la existencia de una cascada de regulación interactiva, definida por el *brlA*, *abaA*, y *wetA*. Estos genes regulan la construcción del conidióforo y esporas, siendo *brlA* un gen clave en la formación del conidióforo (Wieser y Adams, 1995; Marhoul y Adams, 1996; Ye *et al*, 1999).

Los genes de esta ruta han sido clonados y se ha estudiado en detalle su función. Poniendo a *brlA* bajo el control del promotor de la alcohol deshidrogenasa (*alcA*), inducible por treonina. Una cepa con esta construcción se transfirió a un medio de treonina bajo condiciones no inductivas. La cepa mostró una diferenciación de las puntas de la hifa en unas estructuras parecidas a las fiálides productoras de las esporas: éstas incluyeron la inducción de *abaA* y *wetA*.

Mediante construcciones recombinantes similares a las de *abaA* se demostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en las hifas como en la inducción. Los genes *brlA* y *abaA* normalmente se expresan en las fiálides, en tanto que *wetA* se expresa en los conidios. La expresión forzada de *wetA* en las hifas inhibe el crecimiento, pero no induce la expresión de *brlA* y de *abaA*. La expresión de *wetA* es suficiente solo para la activación de la transcripción de los genes específicos de los conidios, posiblemente los responsables del ensamble de la segunda de pared celular en la espora. Estos tres genes regularían varios genes estructurales de la conidiogénesis (Timberlake, 1990; Griffin, 1994).

d) Cepas capaces de producir proteínas heterólogas en medio líquido y sólido.

Algunas proteínas heterólogas de hongos y de bacterias son producidas en grandes cantidades (cientos de mg L⁻¹ a g L⁻¹) en algunos hongos, lo que hace a estos organismos interesantes en términos económicos (Davies, 1991).

Se puede decir que existen dos razones principales para expresar una proteína heteróloga en un hospedero: la primera es para estudiar su estructura y función; la segunda es comercial (Kinghorn y Unkles, 1993).

Aspergillus nidulans y *A. niger* se han empleado para la producción industrial de varias proteínas heterólogas por las siguientes razones: su enorme capacidad intrínseca de secreción de la proteína hacia el medio extracelular como parte de su modo de vida saprobio, su utilización en las industrias de fermentación, su sistema genético, el conocimiento de la biología molecular de estas especies y su estatus de cepas GRAS (generalmente aceptadas como seguras para la salud). En cambio algunas proteínas presentan dificultades para ser expresadas en hospederos tales como *E. coli* o *Sacharomyces cerevisiae* (Davies, 1991, Kinghorn y Unkles, 1993; Archer y Peberdy, 1997).

El proceso de transformación en *Aspergillus* no es particularmente complicado y se usa corrientemente. Se usa generalmente una construcción con un promotor fuerte, constitutivo o regulable, un péptido señal que codifique para las señales de secreción, sitios para la clonación del gen heterólogo y secuencias para la terminación de la transcripción y poliadenilación (Davies, 1991; Archer y Peberdy, 1997). Las proteínas heterólogas pueden provenir de otras especies de hongos o de organismos que no están en absoluto relacionados con *Aspergillus* (tabla 2).

No obstante las ventajas que representa la transformación de *A. niger*, es importante conocer las características de la cepa candidata a ser transformada, este es el caso de la cepa de *A. niger* C28B25.

e) Pigmentos de las esporas

Las esporas de diferentes hongos presentan pigmentos. Tal es el caso de *Agaricus bisporus*, *Ustilago maydis*, *Aspergillus niger* y *A. nidulans* (Rast *et al*, 1981). Los pigmentos que se forman por la polimerización de compuestos fenólicos (Fig. 3) se les denominan melaninas. (Piattelli *et al*, 1963; Fogarty y Tobin 1996). *In vivo*, los pigmentos se encuentran confinados a las paredes celulares en forma de gránulos de 0.1 a 1 μm de diámetro. En las preparaciones crudas de melanina, ésta es completamente insoluble en agua y en la mayor parte de los solventes orgánicos comunes, solo es soluble en soluciones de hidróxido de sodio caliente.

No obstante, cuando la melanina se encuentra asociada a proteínas o carbohidratos se solubiliza en agua (Piattelli *et al*, 1963, Fogarty y Tobin 1996).

Tabla 2. Ejemplos de expresión de genes heterólogos en *Aspergillus*

Especies	Gen expresado	Promotor usado
<i>A. nidulans</i> ⁵	Proquimosina bovina	<i>A. niger glaA</i>
<i>A. nidulans</i> ⁵	Interferón humano $\alpha 2$	<i>AlcA</i> , <i>A. niger glaA</i>
<i>A. nidulans</i> ⁵	Endoglucanasa de <i>Cellulomonas fimi</i>	<i>AlcA</i> , <i>A. niger glaA</i>
<i>A. nidulans</i> ⁵	Plasminógeno activador (tejido humano)	<i>alcI</i> , <i>tpiA</i> , <i>A. niger adhA</i>
<i>A. oryzae</i> ⁵	Proquimosina bovina	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>
<i>A. oryzae</i> ⁵	Aspartil proteinasa de <i>Mucor miehi</i>	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>
<i>A. oryzae</i> ¹⁰	Lacasa extracelular de <i>Myceliophthora thermophila</i>	α -amilasa de <i>A. oryzae</i>
<i>A. oryzae</i> ⁶⁶	Lacasa de <i>Rhizoctonia solani</i>	TAKA-amilasa de <i>A. oryzae</i>
<i>A. oryzae</i> ⁷⁰	Lacasa de <i>Trametes villosa</i>	<i>A. nidulans amdS</i>

5: Archer y Peberdy (1997); 10: Berka *et al*, (1997); 66: Wahleithner *et al*, (1996); 70: Yaver *et al*, (1996).

Aunque la melanina no es esencial para el crecimiento del hongo, se ha observado que la presencia de este pigmento le podría conferir ciertas ventajas en algunos ambientes. Por ejemplo, se ha demostrado que la melanina protege a las esporas contra la actividad proteolítica de las bacterias. Además, se ha probado que las hifas y las esporas de *A. nidulans* tienen resistencia a la acción de la $\beta(1-3)$ glucanasa-quitinasa. En cambio, una cepa de *A. nidulans* deficiente en melanina, es susceptible a la acción de esta enzima (Kuo y Alexander, 1967). Un hecho interesante es que, al eliminar las espículas en que se acumula la melanina, las esporas de *A. phoenicis* y de *Sclerotium rolfii* fueron fácilmente digeridas por un extracto de *Streptomyces* (Bloomfield y Alexander, 1967). De este modo, la melanina podría estar presente en el organismo para hacerlo resistente a la degradación microbiana (Kuo y Alexander, 1967; Rast *et al*, 1981).

Se sabe, además, que los gránulos de melanina funcionan como un intercambiador de cationes y éstos, absorben electrones; dándole protección a las esporas contra la radiación ionizante o la luz ultravioleta, que evitaría daños en el DNA y tienen, además, la habilidad de absorber grandes cantidades de agua (White, 1958).

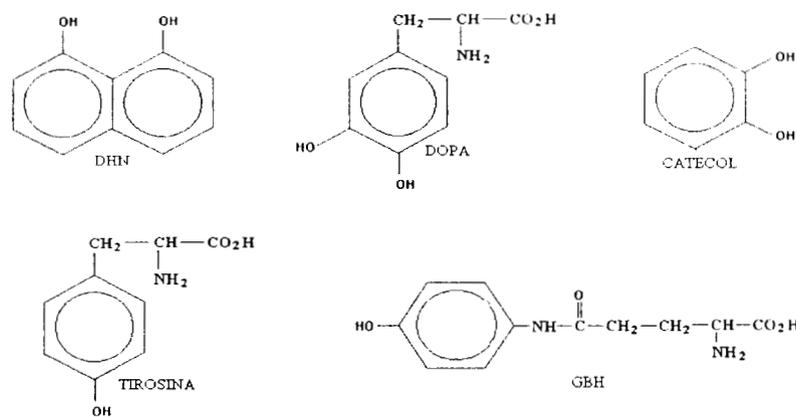


Figura 3. Precursores de las melaninas fúngicas.

Un hecho interesante, es que la virulencia de los hongos patógenos está relacionada con la melanina. Ciertas cepas mutantes de *Verticillium dahliae*, *Cochliobolus miyabaeus* y *Magnaporthe grisea*, que han perdido la capacidad para sintetizar la melanina, son incapaces de penetrar en las hojas de sus respectivos hospederos y en consecuencia pierden su patogenicidad.

Pues al degradar la pared celular del hospedero, se producen cuerpos fenólicos provenientes de la lignina, que resultan tóxicos para el hongo y que son atrapados por la melanina (Fogarty y Tobin 1996).

Williamson (1994) ha observado que *Cryptococcus neoformans* B-3502, un hongo que causa infecciones en el sistema nervioso central del humano, presenta capacidad infectiva directamente relacionada con las propiedades antioxidantes de la melanina. Jacobson y Tinnel (1993) realizaron experimentos usando permanganato de potasio (KMnO_4) a diferentes concentraciones para mostrar que las cepas productoras de melanina eran resistentes a 0.2 mM de KMnO_4 en comparación a las cepas no productoras de melanina, que solo resistían una concentración de 0.063 mM.

Los mecanismos de síntesis de la melanina son uno de los blancos de los agentes antifúngicos. Por ejemplo, el uso del triziclazol 42 μM , disminuye la patogenicidad de *Cladosporium carrioni*, *Exophiala jeanselmei* y *Phialophora richardsiae* (Fogarty y Tobin 1996).

Las melaninas tienen grupos carboxilo, fenólicos, hidroxilo y amino, lo que les da un gran potencial en la unión o bioadsorción de iones metálicos. La capacidad de unión de las melaninas por los metales divalentes sigue la secuencia: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Así, estos pigmentos tendrían un papel importante en reducir los niveles de iones metálicos cercanos a la hifa y podría proteger al organismo de los microorganismos antagonistas. Por otro lado, las concentraciones altas de metales pesados en la superficie de la hifa pueden ser muy tóxicas para un antagonista, o pueden interferir con la actividad extracelular de las enzimas hidrolíticas. El acomplejamiento de los metales con la melanina puede reducir la disponibilidad de un microelemento esencial para los microorganismos antagonistas. Esto, ha hecho que se ponga atención al uso de la melanina para la remoción de metales tóxicos en aguas contaminadas y para la recuperación de metales preciosos en solución (Fogarty y Tobin 1996).

f) Lacasa

La lacasa es una polifenoloxidasas (EC 1.10.3.2) que cataliza la oxidación de una amplia variedad de compuestos fenólicos con la concomitante reducción del oxígeno molecular a agua (fig 4) (Thurston, 1994). Este hecho puede ser aprovechado para el desarrollo de biosensores que detecten la presencia de fenoles y polifenoles, aminas aromáticas y quinonas (Sorochinskii y Kurganov, 1998). En la Figura 4 se muestra la estequiometría de la oxidación de una p-Hidroquinona.



Figura 4. Oxidación de la hidroquinona mediada por la lacasa (Sorochinskii y Kurganov, 1998)

La lacasa pertenece a una familia de oxidasas que contienen cobre. Algunas de estas oxidasas son la ascorbato oxidasa y la ceruloplasmina, una proteína del plasma de los mamíferos (Ratcliffe, 1994). La lacasa de los hongos puede participar, directa o indirectamente, en la degradación de la lignina. Se ha sugerido que para ciertos hongos, esta enzima juega un papel en la patogenicidad, en el desarrollo de los cuerpos fructíferos y en la formación de los pigmentos estructurales (Kuo y Alexander, 1967; Rast *et al.*, 1981; Jacobson y Tinnel, 1993). La participación de una variedad de procesos ha llevado recientemente a plantear algunos estudios sobre la deslignificación (Nerud *et al.*, 1992), la destoxificación (Davis y Burns, 1990; Brenna y Bianchi, 1994; Font *et al.*, 1997; Rüttimann, 1996) y en el blanqueo de las aguas residuales en las industrias textiles y de colorantes (Reddy, 1995; Trombly, 1995). La lacasa contiene cuatro átomos de cobre y su relativa simplicidad la convierte en un buen modelo para estudiar la relación de su estructura con su función. La determinación de la estructura podría contribuir a la elucidación del mecanismo catalítico que consiste en la transferencia de electrones (Thurston, 1994).

Las lacasas pueden oxidar directamente sustratos fenólicos y unidades fenólicas de la lignina (usando oxígeno molecular como aceptor de electrones) pero, en presencia de "mediadores" adecuados, también pueden oxidar la lignina de tipo no-fenólico, como el ácido homoverátrico. (Leontievsky, *et al.*, 1997). Dicha característica, descrita para varias parejas lacasa-mediador, hace que esta enzima sea

especialmente atractiva para la eliminación biotecnológica de productos derivados de la lignina durante la fabricación de la celulosa y el papel. La especificidad por el sustrato varía dependiendo de la fuente de la enzima (Tabla 3). En ciertos casos su actividad se superpone a la de otras enzimas (que también contienen átomos de cobre), como la tirosinasa (Rajarathnam *et al.*, 1998).

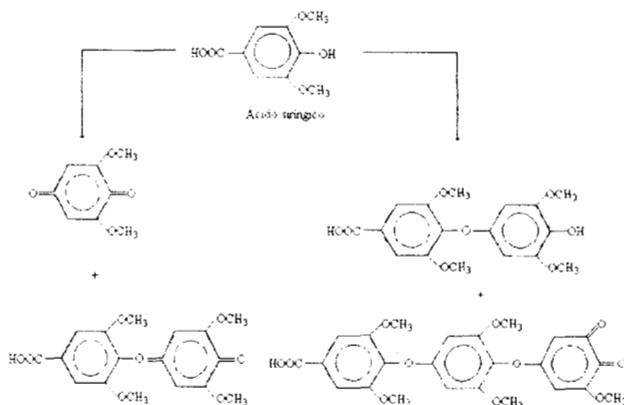


Figura 5. Mecanismo propuesto para la formación de la mucolactona durante la oxidación de la lignina por la lacasa de *Coriolus versicolor* (Sariaslani, 1989).

Por otro lado, la acción de la lacasa puede ser tanto de polimerización de los sustratos como de ruptura de los anillos fenólicos, dependiendo del sustrato y de la fuente de la enzima (Fig. 5 y 6).

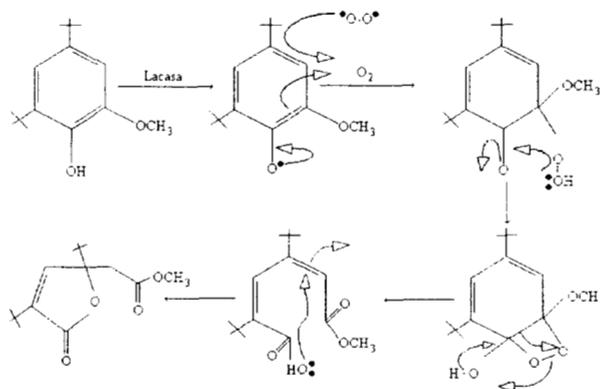


Figura 6. Oxidación del ácido siríngeo por la lacasa de *Trametes versicolor* (Sariaslani, 1989).

La lacasa de *Agaricus* y *Pleurotus* cumple una función detoxificante, estos hongos son degradadores de la madera y ésta contiene una alta concentración de lignina. La hidrólisis de lignina produce grupos fenólicos que resultan tóxicos para el organismo, estos grupos fenólicos son también sustratos de la enzima (Rajarithnam *et al*, 1998).

Tabla 3. Diferentes tipos de lacasas y de sustratos

Organismo	Sustrato utilizado	Referencia
<i>Agaricus bisporus</i>	p-cresol, diaminobenzidina, <i>p</i> -fenilenodiamina, siringaldizina, toluquinol, N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina.	Ratcliffe <i>et al</i> , 1994. Wood, 1980.
<i>Aspergillus nidulans</i>	N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina, <i>p</i> -fenilenodiamina, pirogalol, ácido gálico, 2,6-dimetoxifenol, N,N-dimetil- <i>p</i> -fenilenodiamina.	Clutterbuck, 1972.
<i>Ganoderma lucidum</i>	2,2'-azinobi-3-etilbenztiazilino-6-sulfonato (ABTS).	D'Souza, 1996.
<i>Polyporaceae</i> I-62	ABTS	Mansur <i>et al</i> , 1997.
<i>Phanerochaete flavido alba</i>	ABTS	Pérez <i>et al</i> , 1996.
<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>p</i> -aminofenol, <i>p</i> -anisidina, <i>p</i> -metoxifenol, guayacol, Catecol, <i>p</i> -hidroquinona, metilhidroquinona, 2,6-dimetoxifenol.	Pérez <i>et al</i> , 1996.
<i>Phlebia brevispora</i>	ABTS	D'Souza, 1996.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Siringaldizina	Wahleithner <i>et al</i> , 1996.
<i>Trametes versicolor</i>	Catecol, ABTS.	D'Souza, 1996.

g) Modelos de crecimiento en superficies

La mayor parte de modelos de crecimiento de microorganismos crecidos en un medio sólido con nutrientes describen las cinéticas de crecimiento en caja Petri, considerando que el crecimiento está directamente asociado con la velocidad específica de crecimiento (Larralde-Corona, 1997).

Pirt (1967) realizó experimentos en caja Petri con dos tipos de medio. Los organismos usados fueron *E. coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Streptococcus faecalis*. El modelo considera una velocidad constante del incremento del radio de la colonia que es característica del crecimiento en hongos en superficie. Se observó que la velocidad específica de crecimiento era similar a la obtenida en matraces agitados. Por otro lado, se determinó que en estas condiciones la concentración de glucosa fue un factor limitante del crecimiento.

Trinci (1969) realizó experimentos con cajas inoculadas en el centro con esporas de *Aspergillus nidulans*. El crecimiento siguió un comportamiento exponencial, y las hifas se distribuían de manera radial. Se observó que los hongos en estas condiciones presentaban las cuatro fases de crecimiento (lag, exponencial, desaceleración y velocidad constante de crecimiento) y que el organismo tenía una velocidad específica de crecimiento (μ) 2.3 veces mayor que en los cultivos líquidos agitados, aunque no se explicó la razón de este fenómeno. Esto ha sido explicado por diferencias en el modelo matemático para calcular μ (Viniestra-González *et al.*, 1993)

Koch (1975) supuso que el crecimiento de los hongos filamentosos era logístico (ver anexo III), tomando en cuenta las observaciones de Deppe (1973, citada por Koch) para cultivos en superficie. En este modelo se considera que el decremento en la velocidad específica de crecimiento se asocia con un incremento de la densidad hifal.

Prosser y Trinci (1979) desarrollan un modelo para explicar el crecimiento de las hifas y el modo en que éstas se ramifican. Para entender como crece una colonia era preciso conocer como crece una hifa, tomando en consideración el movimiento de vesículas hacia la punta de la hifa, en la que se encontrarían los precursores y las enzimas formadores de la pared.

El modelo logístico propuesto por Okamoto *et al* (1980), considera la velocidad del consumo del oxígeno como una manera de medir el crecimiento de *A. oryzae* var. *viride* en granos de arroz y en salvado de trigo humedecidos. El consumo resultó directamente proporcional al peso del micelio y a la actividad enzimática.

Otro modelo de crecimiento en superficie, propuesto por Georgiou y Shuler (1986), considera el crecimiento en caja Petri y la formación de gradientes por el consumo de glucosa. El modelo considera dos tipos de inoculación, una por piquete y otra en césped, en la primera se observan cuatro zonas bien diferenciadas, que corresponden a la zona de extensión, la zona productiva, la zona de estructuras de reproducción y la zona de esporulación. Cuando se habla de cultivos en césped, la mezcla de las zonas es más marcada que en las colonias aisladas. En este trabajo se observa que la aparición de estructuras reproductivas está directamente relacionada con una baja en la concentración de glucosa.

Larralde-Corona *et al.* (1998), utilizando un equipo de procesamiento de imágenes para estudiar el crecimiento de *A. niger* 10, usaron dos tipos de cultivo: uno esparcido y el otro en césped; en cajas de agar con un medio mineral. De los resultados obtenidos se concluyó que no existía una gran diferencia a concentraciones de glucosa de 10 a 300 g/L, con respecto al diámetro de las hifas en los dos tipos de cultivo. Así mismo, se observó que, al graficar S_0 (concentración de substrato inicial) contra crecimiento máximo (X en mg de peso seco cm^{-2}), el comportamiento seguía una función parabólica. En este estudio se usó un modelo logístico de crecimiento. En la tabla 4 se da un resumen de los modelos propuestos.

Tabla 4. Modelos propuestos para estudiar el crecimiento en superficies.

Variable Modelada	Modelo	Variables	Referencia
Crecimiento radial de la colonia	$\ln r = \mu t/2 + \ln r_0$	r = radio de la colonia t = tiempo μ = velocidad específica de crecimiento r_0 = radio de la colonia cuando $t=0$	Pirt, 1967; Trinci, 1969
Crecimiento radial de la colonia	$W^{1/3} = W_0^{1/3} + (4\pi\rho/3)^{1/3} \Delta l t$	W =Peso de protoplasma $\pi=3.1416$ ρ =densidad micelial Δ =zona en donde se da el crecimiento l =constante de crecimiento lineal t =tiempo	Koch, 1975
Crecimiento hifal y ramificación de las hifas	$R_l = 4\pi r_v^2 / 2\pi r_h$	R_l =Incremento radial $\pi=3.1416$ r_v =radio de la vesícula r_h =radio de la hifa	Prosser y Trinci, 1979.
Producción de CO ₂ y producción de Biomasa	$dA/dt = K_1\mu m + K_2m$	A =mg de CO ₂ producto de la respiración por gramo de peso seco T =tiempo K_1 =mg de CO ₂ producto del crecimiento micelial μ =velocidad específica de crecimiento K_2 =CO ₂ producto de la respiración endógena m =peso seco del micelio	Okasaki <i>et al.</i> , 1980

Tabla 4. Modelos propuestos para estudiar el crecimiento en superficies (continuación).

Variable Modelada	Modelo	Variables	Referencia
Peso seco del microorganismo y consumo de sustrato	$R_{A2} = \mu X_0 / Y_G (e^{\mu t})$	R_{A2} =velocidad de consumo en glucosa μ =velocidad específica de crecimiento X_0 =Inóculo inicial Y_G =rendimiento biomasa sustrato t =tiempo	Georgius y Shuler, 1986
Producción de biomasa	$dX/dt = \mu_{obs} X (1 - (X/X_{max}))$	μ_{obs} =velocidad específica de crecimiento X =biomasa X_{max} =Biomasa máxima t =tiempo	Larralde-Corona <i>et al</i> , 1997

Objetivos

a) Objetivo general

Establecer las condiciones para estudiar cinéticas de crecimiento de cultivos en césped de *Aspergillus niger* en placas de agar.

b) Objetivos particulares.

- Determinar los parámetros cinéticos μ , X_{\max} producción de enzimas, de esporas y pigmentos en 3 cepas de *A. niger* y una de *A. nidullans*.
- Establecer si existen diferencias en la secuencia de eventos de producción de esporas entre medio líquido y sólido.

Hipótesis.

Las hipótesis para el desarrollo de este trabajo fueron las siguientes:

- a) Es posible estudiar cuantitativamente el ciclo de vida de *Aspergillus* usando cultivos en césped en placas de agar.**
- b) La secuencia y duración de este ciclo de vida será distinta de la observada por otros autores que usaron el método de cambio de medios, es decir, de líquido a aéreo o de líquido a superficial.**
- c) La actividad de lacasa será diferente entre las cepas de estudio, ya que ésta actividad estará relacionada con su capacidad esporulante.**
- d) Las cepas mutantes de *Aspergillus* afectadas en su ciclo de vida, presentarán cambios en la secuencia de eventos tales como formación de pigmentos y esporulación.**

Materiales y métodos.

a) Cepas utilizadas: *A. niger* C28B25 (Aquihuatl. 1992), *A. niger fawn* (Romero, 1997), *A. niger fluffy* (obtenida por Casas, comunicación personal), *A. nidulans bca* (donada por el Dr. Jesús Aguirre. Instituto de Fisiología-UNAM), algunas de sus características se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Características de las cepas de estudio.

Cepa	Características
<i>Aspergillus niger C28B25</i>	Fenotipo silvestre: Esporas verde oscuro.
<i>Aspergillus niger fawn</i>	Esporas color carnaza, tipo de crecimiento típico de la especie.
<i>Aspergillus niger fluffy</i>	No produce esporas, de crecimiento algodonoso.
<i>Aspergillus nidulans blanca</i>	Produce esporas de color blanco, de crecimiento típico para la especie.
<i>Aspergillus nidulans am</i>	Produce esporas de color amarillo, de crecimiento típico para la especie.

b) Conservación de las cepas. Se conservó a las cepas en viales inclinados con medio PDA a 4 °C y se sembraron mensualmente.

c) Reactivación de las cepas. A partir de un tubo de conservación, se inoculó una caja con medio PDA por estría cruzada. Se tomó una colonia aislada y se sembró en 25 mL de medio Czapeck en un matraz de 250 mL. A partir de este inóculo, se sembraron matraces de 250 mL con medio YGA para la obtención de las esporas para la determinación de las cinéticas de crecimiento, de producción de esporas, de actividad enzimática y de producción de pigmentos. Dado que la cepa de *A. niger fluffy* produce un número de esporas reducido, la cepa se propagó en caja Petri mediante la siembra de un cuadro de micelio de aproximadamente 1 cm² en medio YGA.

d) Condiciones y medio de cultivo para cinéticas. Para todas las cepas se utilizó el medio de cultivo (YGA) reportado por Kurtz y Champe (1981), que contiene 0.5% de extracto de levadura (Difco), 2% de glucosa (Baker) y 1% de agar (Bioxon). Los microorganismos fueron cultivados en caja Petri a 30° C. Se usaron dos tipos de inóculo, en el caso de las cepas esporógenas la siembra fue hecha con un inóculo en césped de 5×10^7 esporas por caja. En el caso de la cepa *A. niger fluffy* se dispersó un cuadro de micelio de 1 cm² por la superficie de agar.

e) Cinéticas de crecimiento. Se evaluó el crecimiento de las cepas en caja Petri por peso seco del micelio. Se siguió el siguiente método: se tomó todo el contenido de una caja Petri, se colocó dentro de un vaso de precipitado y se fundió el agar en agua caliente ácida (agua + ácido acético) a pH 2. A continuación se puso en un horno de microondas por 2 min. Se filtró el agar fundido y el micelio a través de papel Wathman No 1 previamente llevado a peso constante. El filtrado se puso en una estufa a 65 °C y se llevó a peso constante. Se pesó el micelio con el filtro de papel. Para determinar la biomasa, se restó el peso del papel y se dividió el peso obtenido del micelio (mg) entre el área de la caja Petri (62.21 cm²). Las muestras se tomaron cada 8 horas.

f) Ajuste de las curvas de crecimiento y de los parámetros cinéticos. La estimación de los parámetros cinéticos de todas las cepas se ajustó con una rutina de solver de Microsoft Excel[®], en la que se buscó minimizar las diferencias generadas al comparar los datos experimentales y los datos calculados a partir de la función logística $X_{(t)} = X_m / (1 + ce^{-\mu t})$, siendo $c = (X_m - X_0) / X_0$; $X_{(0)}$, la biomasa inicial; X_m , la biomasa máxima; μ velocidad específica máxima de crecimiento. Se ajustó el modelo de Leudeking-Piret ($P_t = \alpha (X_t - X_0) + \beta (X_m / \mu) [1 - X_0 / X_m (1 - e^{-\mu t})]$) para determinar los factores α y β (Bailey y Ollis, 1986), siendo α la constante de formación de enzima asociada al crecimiento y β la constante de formación de enzima no asociada al crecimiento.

g) Obtención de los extractos para la determinación enzimática. Para la obtención de los extractos, se siguió la siguiente metodología: a partir de una caja Petri se recolectó todo el micelio ayudándose de una espátula, el micelio se colocó en un homogenizador de vidrio esmerilado al que se agregó 10 mL de un regulador de fosfatos 0.1 M, pH 7. Se homogeneizó por 10 minutos. Tanto el homogenizador, como el buffer se enfriaron previamente en hielo. El homogenizado se centrifugó a 15 000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se trabajó únicamente con el sobrenadante obtenido.

h) Obtención de extractos para la evaluación del N-acetil-6-hidroxitriptofano (NAHT). Para determinar la presencia del precursor de la melanina conidial se siguió la misma metodología que para obtener extractos enzimáticos, sólo que se agregó metanol concentrado previamente enfriado en lugar del buffer. Se midió la presencia del NAHT en el sobrenadante leyendo en un espectrofotómetro Beckman DU series 600 a 530 nm.

i) Actividad de lacasa. La actividad de la lacasa se midió utilizando ácido gálico como sustrato. En un tubo de ensayo se agregaron 200 μ l de ácido gálico 5 mM (regulador TRIS -maléico, 0.1 M, pH 7), más 50 μ l de extracto crudo, la mezcla se llevó a un volumen de 2 ml con regulador de fosfatos 0.1 M, pH 7 y se dejó reaccionar por 25 min a 25 °C. Para determinar la actividad se tomaron 20 μ l de la mezcla de reacción y se llevó a un volumen final de 2 ml con regulador de fosfatos directamente en la cubeta y se leyó absorbancia a 235 nm inmediatamente. Se leyó contra una mezcla de reacción que no contenía extracto crudo al inicio del experimento. Una unidad de actividad se define como los micromoles de ácido gálico (coeficiente de extinción de 0.064) consumidos por minuto, observándose como un descenso en la absorbancia a 235 nm.

j) Evaluación del NAHT. Se midió el precursor directo de las melaninas, N-acetil-6-hidroxitriptofano, de *Aspergillus nidulans*, siguiendo la metodología de McCorkindale (1983), leyendo absorbancia a 530 nm, contra un blanco de metanol puro, en un espectro Beckman DU Series 600, haciendo diluciones cuando era necesario. Dado que no se contaba con un estándar del NAHT la evaluación de éste producto se hizo en función de las unidades de absorbancia medidas directamente del espectrofotómetro.

k) Esporulación de las cepas de estudio. Para evaluar la producción de esporas en las cepas de estudio se inocularon matraces de 250 mL, con 25 mL de medio YGA, con 5×10^7 esporas. El área ocupada por los 25 mL de medio es de 50 cm² (Denis, 1996). Para recuperar las esporas se agregaron 50 mL de Tween 80 0.1% y se lavó por 5 min usando un agitador magnético. Se tomaron muestras cada 8 horas. Las esporas se contaron en una cámara de Neubauer. Se hicieron diluciones cuando fue necesario.

Resultados

Cinéticas de crecimiento

En la figura 7 se muestran los resultados de las cinéticas de crecimiento de las cepas de *A. niger* y *A. nidulans* y en la tabla 6 se indican los parámetros ajustados de las cepas correspondientes.

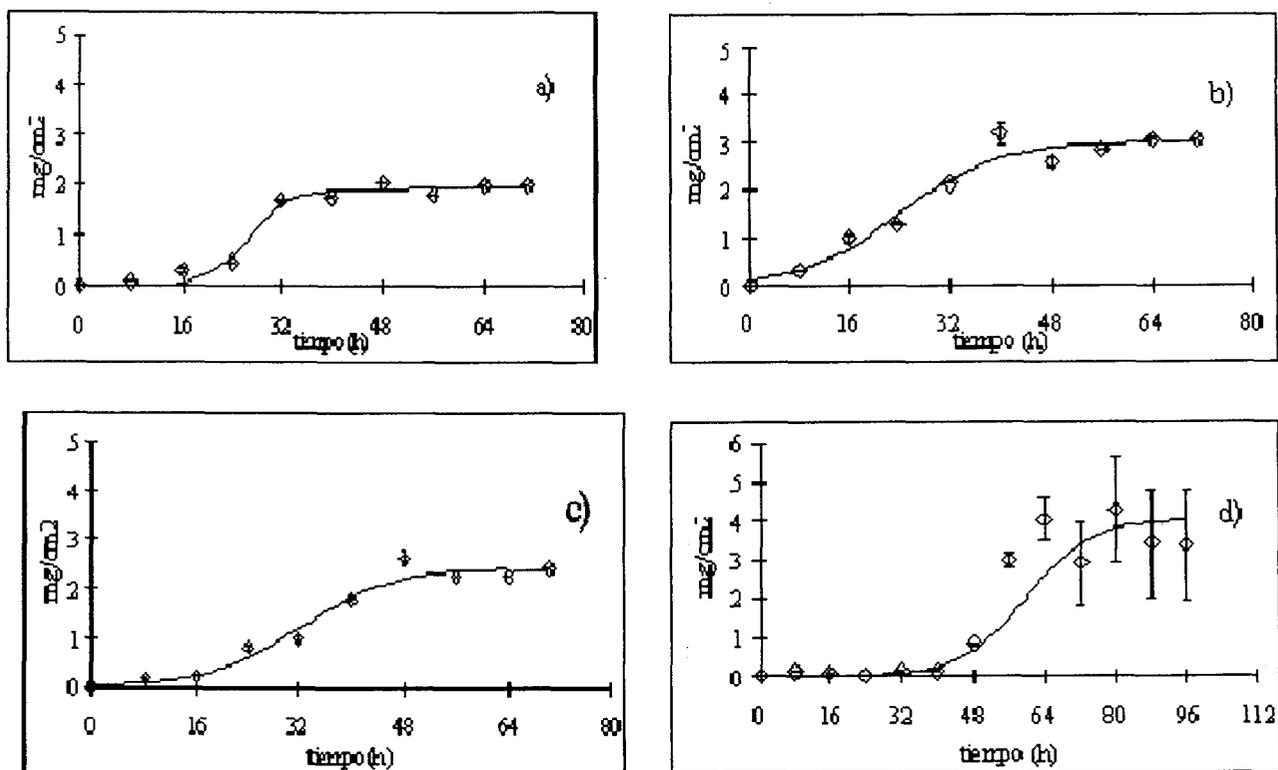


Figura 7. Cinéticas de crecimiento a) *Aspergillus nidulans bca*, b) *A. niger fawn*, c) *A. niger C28B25*, d) *A. niger fluffy*, (los puntos son el promedio de duplicados) \diamond Observado. --Ajustado

Los datos ajustados con la ecuación logística muestran diferencias con respecto al inóculo inicial de 0.001 mg/cm², para las cepas esporógenas y de 0.003 mg/cm² para la cepa *A. niger fluffy*, es probable que estas diferencias sean debidas al error en la pesada de las muestras ya que después de las 8 hs de iniciada la cinética las diferencias entre los datos observados y esperados disminuyeron.

La cepa *A. nidulans bca* presentó una mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu=0.31 \text{ h}^{-1}$), de más del doble con relación a las cepas de *A. niger* que presentaron la misma velocidad de crecimiento ($\mu=0.14 \text{ h}^{-1}$) entre sí.

Tabla 6. Parámetros ajustados de las cinéticas de crecimiento en las cepas de estudio.

Cepa	X_0 (mg/cm ²)	X_m (mg/cm ²)	μ (h ⁻¹)	r^2 ajustado
<i>A. nidulans bca</i>	0.001	1.94(D*)	0.31(A)	0.86
<i>A. niger fawn</i>	0.110	2.99(B)	0.14(B)	0.89
<i>A. niger C28B25</i>	0.030	2.45(C)	0.14(B)	0.90
<i>A. niger fluffy</i>	0.001	4.00(A)	0.14(B)	0.77

μ : velocidad específica de crecimiento; mg: miligramos de peso seco; X_0 : biomasa inicial; X_m : Crecimiento máximo; r^2 Coeficiente de regresión. *=Coeficiente de Tukey

A. nidulans bca presentó el menor crecimiento máximo ($X_m=1.94$ mg/cm²) con respecto a las cepas *A. niger* que tuvieron una X_m similar mientras que la cepa *A. niger fluffy* tuvo la mayor X_m (4 mg/cm²). Es posible que la diferencia encontrada en el crecimiento máximo para esta cepa, sea característica de la especie.

A. nidulans bca (figura 7a) inició su crecimiento a las 16 h y dejó de crecer alrededor de las 36 h, manteniéndose así hasta el fin de la cinética. Las cepas esporógenas de *A. niger* iniciaron su crecimiento alrededor de las 8 h y dejaron de crecer a las 44 h aproximadamente (fig. 7b y 7c respectivamente).

En contraste, la cepa *A. niger fluffy* (fig. 7d) presentó una fase de retardo en el crecimiento de alrededor de 36 h, debido posiblemente a que las cajas fueron sembradas con micelio y no con esporas como en el resto de las cepas, además, el periodo de crecimiento se da entre las 32 y las 80 h, dejando de crecer a partir de este momento.

Debido a la amplitud de los errores de medición de X en *A. niger fluffy* al final de la cinética de crecimiento (reflejado como una $r^2=0.77$), se realizó una comparación (t de Student asumiendo varianzas iguales; $\alpha=0.05$) entre los datos observados y ajustados en la cepa *fluffy* para la producción de biomasa, el resultado del análisis mostró que no puede ser rechazada la hipótesis nula ($media_{obs}=media_{ajus}$) ya que la F del análisis fue menor a la F de tablas ($0.052 < 4.26$).

La cepa *A. niger fluffy* tiene la misma velocidad de crecimiento que las cepas esporógenas. No obstante, el crecimiento máximo fue diferente con respecto a las cepas esporógenas.

Como la composición del medio fue la misma para todos los experimentos y las velocidades de crecimiento (μ) fueron muy similares entre las cepas de *A. niger*, se hizo un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas del crecimiento máximo observado de las cepas de estudio. El resultado del análisis demostró que hay diferencias significativas con respecto al crecimiento máximo ($F_{\text{calc}}=9.382$, $F_{\text{crit}}=3.24$, $\alpha=0.05$).

Un análisis de Tukey mostró que hay diferencias significativas entre el X_m (los 5 últimos valores observados de la cinética de crecimiento) de las cepas de estudio. Del resultado del análisis se observó que *A. niger fluffy* fue la cepa con la mayor producción de biomasa y *A. nidullans bca* la cepa con menor producción, en las condiciones y medios empleados.

Se puede concluir que las diferencias en X_m fueron debidas a distintas eficiencias $Y_{x/s}$ (g_x/g_s) probablemente asociadas a distintas proporciones de la energía de mantenimiento.

La cepa *A. nidullans bca* presentó una mayor velocidad específica de crecimiento, pero el periodo en que creció es menor, lo que se tradujo en una menor biomasa al final de la cinética. Por otro lado, en las cepas esporógenas de *A. niger* se observaron velocidades de crecimiento y biomazas máximas parecidas. De igual modo presentaron periodos de crecimiento similares, mostrando diferencias en otros aspectos, como se verá más adelante.

Actividad de lacasa medida con ácido gálico

a) Actividad total de lacasa.

Se midió la actividad de la lacasa en cada una de las cepas de estudio. La cepa *A. niger fluffy* no mostró actividad detectable con ácido gálico como sustrato.

Tabla 7. UI/cm^2_{max} de actividad total y tiempo de aparición. ND: no determinado.

Cepa	Pico (UI/cm^2)	Tiempo (h)
<i>A. nidulans bca</i>	0.29	24
<i>A. niger fawn</i>	0.32	32
<i>A. niger C28B25</i>	0.21	40
<i>A. niger fluffy</i>	ND	ND

La cepa que presentó una mayor actividad fue la cepa *A. niger fawn* (fig. 8b), con $0.32 UI/cm^2$, en tanto que la cepa que presentó una menor actividad fue la cepa *A. niger C28B25* (fig. 9), con $0.21 UI/cm^2$. Por otro lado, la cepa *A. nidulans bca* (fig. 8a) mostró una actividad de $0.29 UI/cm^2$.

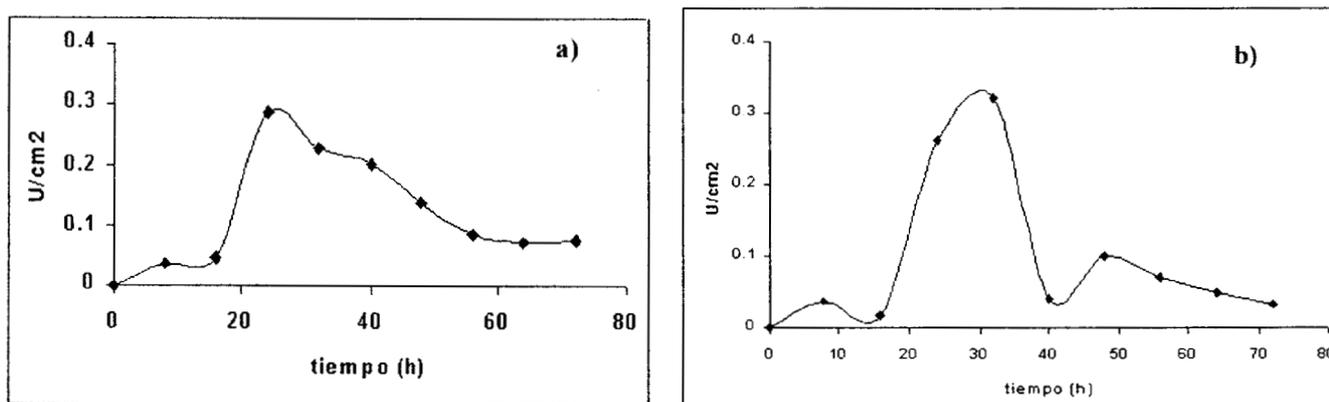


Figura 8. Actividad de lacasa (UI/cm^2). a) *A. nidulans bca*. b) *A. niger fawn*.

En la cepa *A. niger fluffy*, no se detectó la actividad de la lacasa con el método utilizado.

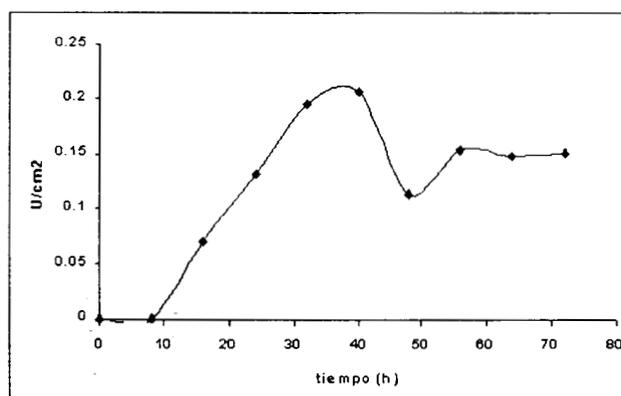


Figura 9. Actividad de lacasa de *Aspergillus niger C28B25*

b) Actividad específica de Lacasa

Se midió la actividad específica (UI/mg X) de las cepas esporógenas, excepto en la cepa anesporógena *A. niger fluffy*. Tanto la cepa *A. nidulans bca* como en la cepa *A. niger fawn* (figura 10) tuvieron un pico de actividad específica a las 24 h, que correspondió al tiempo medio del crecimiento exponencial ($X/X_m=1/2$). En cambio la cepa *A. niger C28B25* tuvo un pico de actividad a las 16 h, que correspondió al primer tercio del crecimiento exponencial ($X/X_m=1/3$). Esto puede estar relacionado con la producción de HATasa, lacasa secretable cuyo substrato es N-acetil-6-hidroxitriptofano (AHT), ya que se sabe que *A. nidulans* produce al menos dos tipos de la lacasa. La AHTasa se produce preferentemente en el periodo de formación de las métulas, que es entre las 10 y 20 h para las cepas de *A. nidulans* con un fenotipo de esporas amarillas (Clutterbuck, 1990).

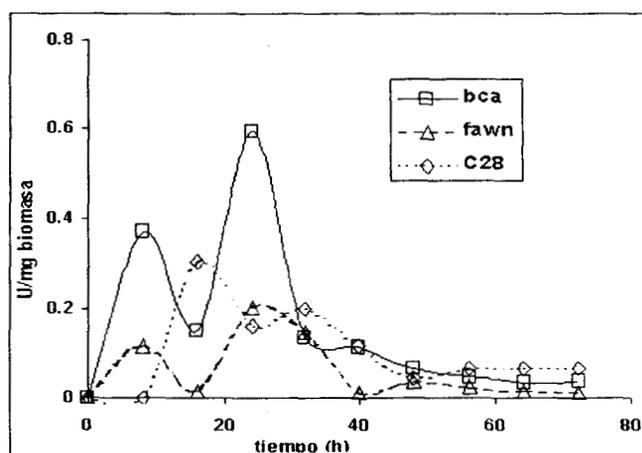


Figura 10. Actividad específica de las cepas esporógenas

Actividad enzimática ligada al crecimiento.

Para determinar si la actividad enzimática de la enzima estaba ligada al crecimiento, en las cepas esporógenas, se graficó actividad enzimática contra crecimiento y se ajustó la curva por el método de Leudeking y Piret, las gráficas resultantes se muestran en las figuras 11 y 12.

Tabla 8. Valores de α y β encontrados por el ajuste de la ecuación de Leudeking-Piret.

Cepa	α (UI/mg X)	β (UI/mg X)h ⁻¹	E ₀ (UI/cm ²)
<i>Aspergillus nidulans bca</i>	0.123	-0.003	0.06
<i>Aspergillus niger fawn</i>	0.105	-0.002	0.03
<i>Aspergillus niger C28B25</i>	0.100	-0.002	0.04

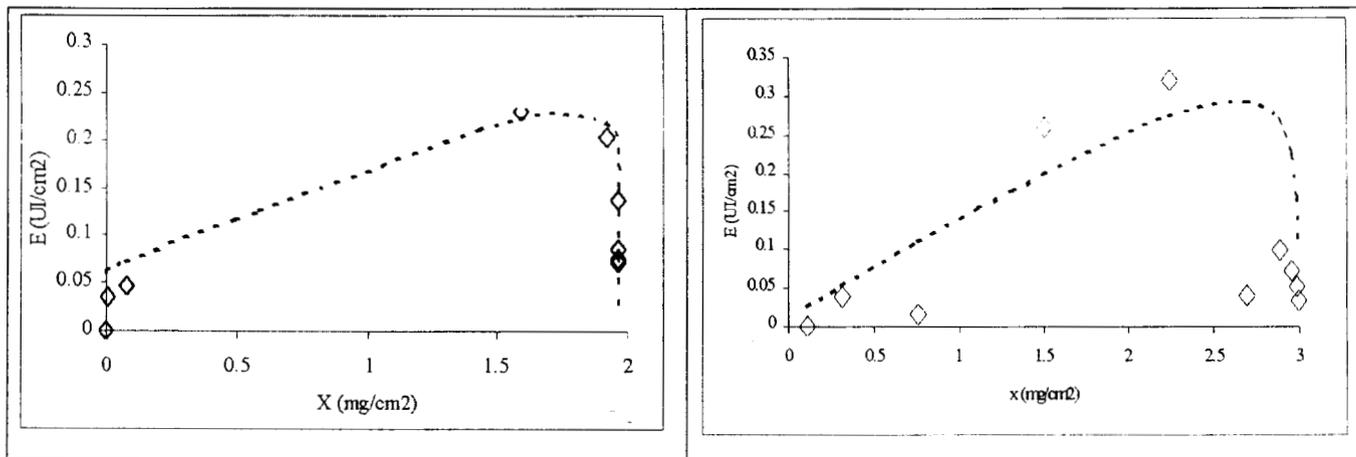


Figura 11. Ajuste de la curva de producción de enzima de *Aspergillus nidulans bca* y *Aspergillus niger fawn*, respectivamente, por el modelo de Leudeking-Piret, el valor de α y β se da en la tabla 8.

Se observó que el crecimiento de las cepas de estudio se ajustó a una curva logística (fig. 7), de este modo, se decidió la utilización del modelo de Leudeking-Piret para determinar si la producción de enzima estaba ligada al crecimiento. El ajuste demostró que la formación de enzima esta ligada al crecimiento. En la tabla 8 se muestra el resumen de los valores encontrados por el ajuste del modelo.

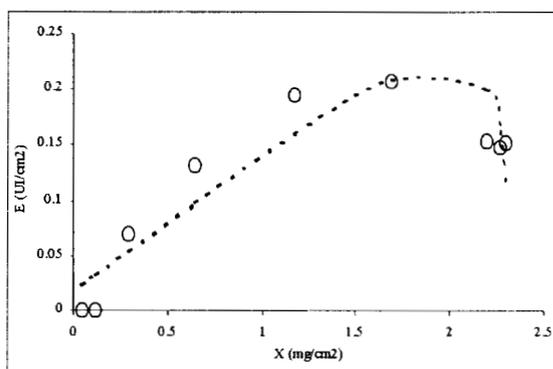


Figura 12. Ajuste de la curva de producción de enzima en *Aspergillus niger C28B25* por el modelo de Leudeking-Piret, el valor de α y β se da en la tabla 8.

Producción de N-acetil-6-hidroxitriptofano

Para medir la concentración de los NAHT de las cepas de estudio se siguió la metodología desarrollada por McCorkindale y colaboradores (1983) para medir el N-acetil-6-hidroxitriptofano (NAHT), que es el precursor directo de la melanina. Se obtuvieron extractos de cada una de las cepas y se midió su absorbancia a 360 nm cada 8 h. Adicionalmente se realizó un cromatograma en papel, el cual se observó por un EAGLE EYE, bajo luz ultravioleta.

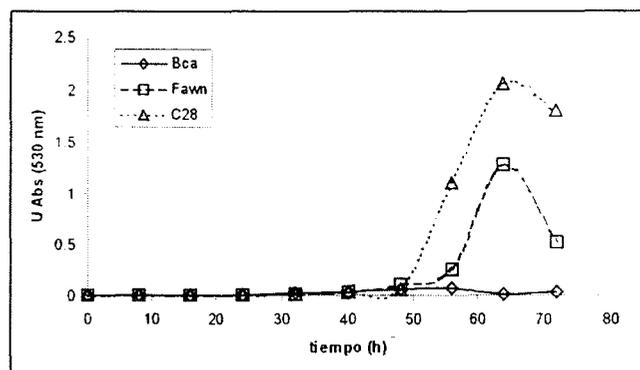


Figura 13. Producción de N-acetil-6-hidroxitriptofano a diferentes tiempos, medido a 530 nm. \diamond *Aspergillus nidulans* blanca. \triangle *Aspergillus niger* C28B25. \square *Aspergillus niger* fawn.

En la figura 13, se observa el NAHT producido por las cepas esporógenas de estudio. La cepa de *Aspergillus nidulans* blanca tuvo la menor concentración del pigmento, en tanto que las cepas de *Aspergillus niger* presentaron el máximo valor.

Para comprobar la presencia de NAHT, se corrió un cromatograma en papel, en las mismas condiciones que McCorkindale y colaboradores (1983).

En la figura 14 se aprecia el cromatograma resultante. El Rf del NAHT es 0.78 (McCorkindale *et al*, 1983).

Se consideró un error del 3% con respecto al valor esperado, por lo que el intervalo en el que se podría encontrar el NAHT de las cepas problema se encontraría entre 0.80 y 0.76.

En la tabla 9 se encuentran los resultados obtenidos para cada una de las cepas con respecto a la producción de NAHT.

Tabla 9. Rf's obtenidos por cromatografía en papel

Muestra	Distancia promedio (cm)	Rf. (promedio)	Intervalo de confianza (95%)
Solvente	7.71		
<i>Bca</i>	5.98	0.76	0.761-0.759
<i>Am</i>	5.98	0.76	0.774-0.764
<i>C28B25</i>	6.00	0.78	0.781-0.779
<i>Fw</i>	5.79	0.75	0.752-0.751
<i>Flu</i>	5.93	0.77	0.773-0.772

Bca: *Aspergillus nidulans* blanca; *Am*: *Aspergillus nidulans* amarilla; *C28B25*: *Aspergillus niger* C28B25; *fw*: *Aspergillus niger* fawn; *Flu*: *Aspergillus niger* fluffy. Los valores promedio corresponden a tres mediciones.

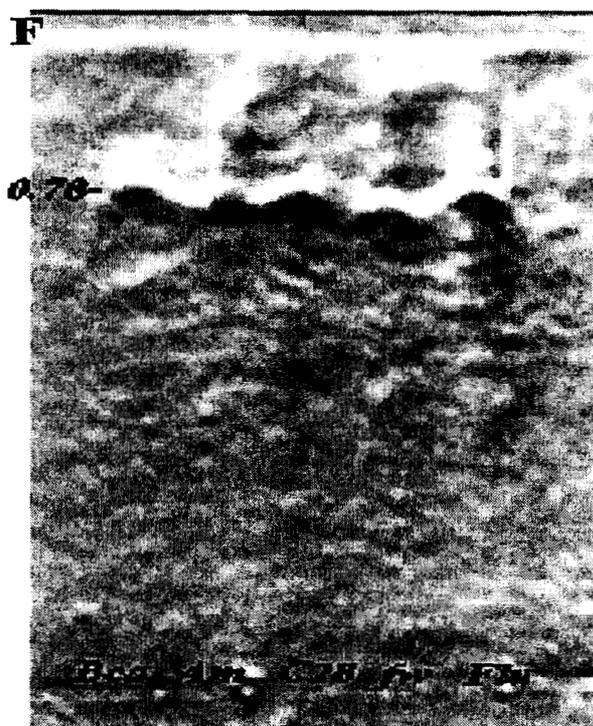


Figura 14. Cromatograma en papel que muestra la separación de un extracto de diferentes cepas. **Bca**: *Aspergillus nidulans* blanca; **Am**: *Aspergillus nidulans* amarilla; **C28B25**: *Aspergillus niger* C28B25; **fw**: *Aspergillus niger* fawn; **Flu**: *Aspergillus niger* fluffy. Fase móvil: Butanol-Ácido acético-Agua (63:10:27).

De acuerdo a los datos presentados es posible que solo tres cepas produzcan un compuesto con el Rf del NAHT, la *Aspergillus nidulans am*, *Aspergillus niger C28B25* y *A. niger fluffy*. Es posible que la cepa de *Aspergillus niger fawn* produzca un compuesto con un Rf ligeramente menor. Quizás la diferencia de color de la cepa *fawn* se deba a la presencia de este compuesto similar al NAHT que al ser oxidado por la lacasa polimerice de manera diferente.

Producción de esporas

Se realizó una cinética de producción de esporas (fig. 15a) en todas las cepas de estudio. La cepa *A. niger fluffy* no produjo esporas durante el tiempo de estudio, aunque se puede observar después de 9 a 15 días la aparición de esporas. En este estudio no se midió ni el número ni la viabilidad de éstas.

El inicio de la esporulación se da alrededor de las 24 h, para las cepas esporógenas, presentando un máximo de esporulación a las 64 h.

La cepa *A. nidulans bca* tiene el mayor índice de esporulación (fig. 15b). Con respecto a las cepas de *A. niger*, la cepa *C28B25* presenta el número intermedio en la producción de esporas por cm^2 con respecto al resto de las cepas de estudio.

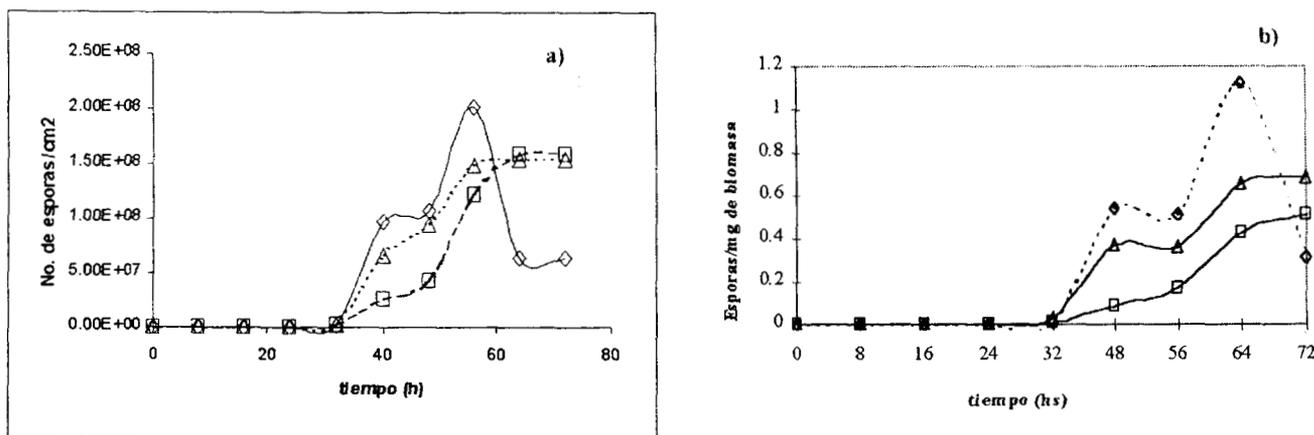


Figura 15. Producción de esporas en las cepas de estudio, a) esporas totales(esporas/cm²) b) Índice de esporulación (esporas/mg de biomasa) \diamond *Aspergillus nidulans blanca*; \triangle *Aspergillus niger C28B25*; \square *Aspergillus niger fawn*

Secuencia de eventos en las cinéticas de estudio.

En las figuras 16 a 18 se analizan comparativamente las variables normalizadas de todas las cepas. En la cepa *A. nidulans bca*, la producción de la lacasa se da en el primer tercio de la cinética de crecimiento. El pico de producción de esporas y de un producto que tiene la misma absorbancia que el NAHT se dan al final de la fase de crecimiento en tiempos muy cercanos. La presencia de NAHT no representa que la cepa sea capaz de sintetizarlo (dado que su valor, no normalizado es de 0.07 UA). Este pico puede deberse a la lisis de esporas, ya que disminuyen en número (fig. 14).

En las cepas de *A. niger fawn* y *C28B25*, se ve que el pico de producción de enzima es alrededor del primer tercio de la fase de crecimiento. A continuación se da el pico de la producción de esporas que, en ambos casos, es al final de la fase de crecimiento. Por último, el pico de formación de NAHT se da al final de la cinética.

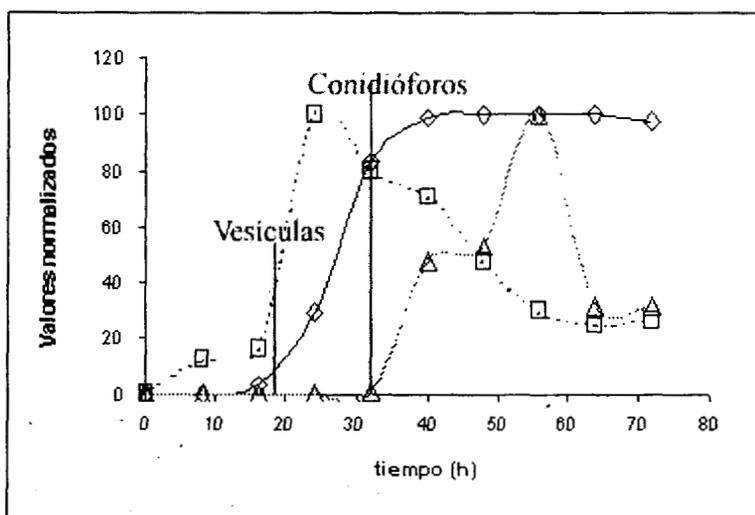


Figura 16. Valores normalizados de producción de biomasa, enzima, NAHT y esporas de *Aspergillus nidulans bca*. ◇ Biomasa; △ esporas; □ enzima

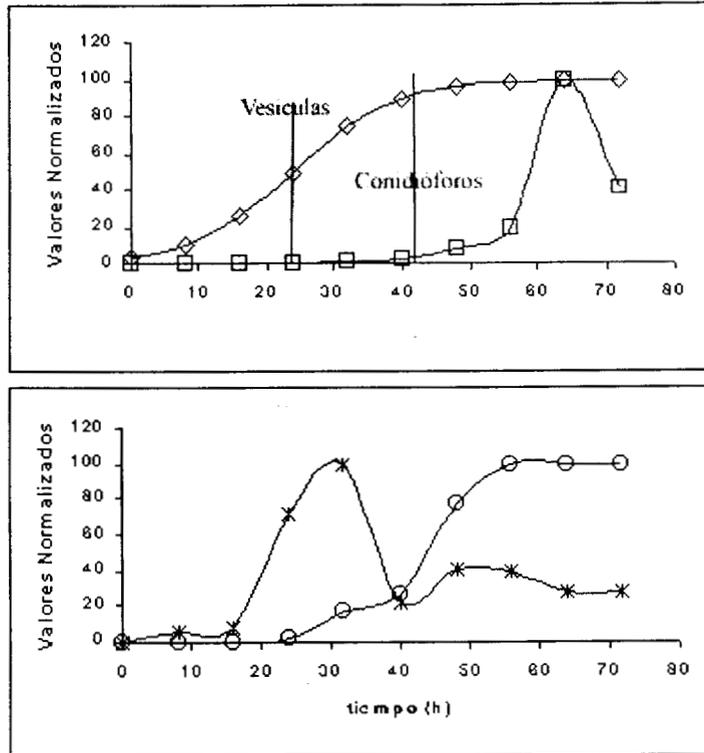


Figura 17. Valores normalizados de producción de biomasa, enzima, NAHT y esporas de *Aspergillus niger fawn*. \diamond Biomasa; \triangle Esporas; \square NAHT * Enzima

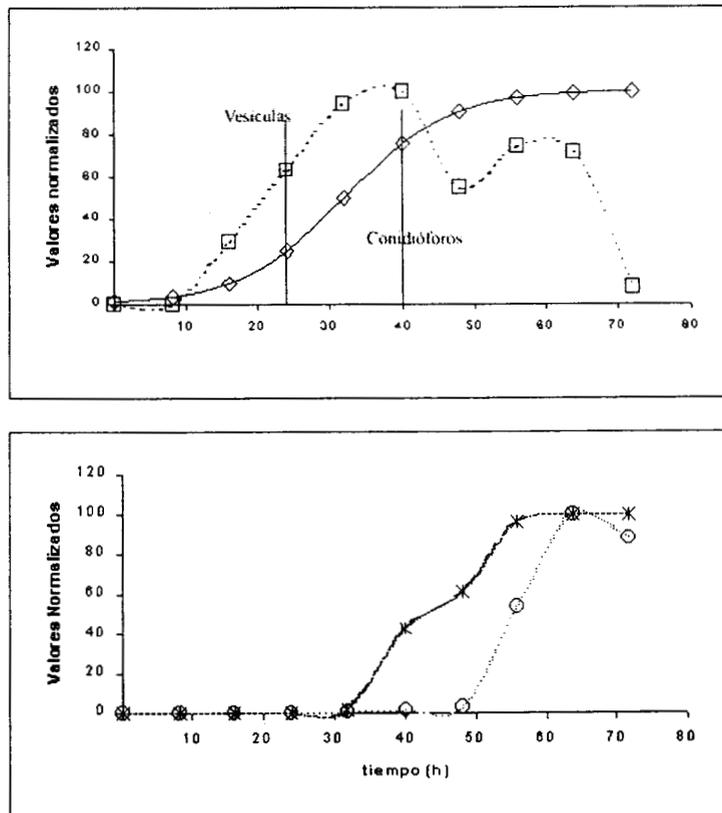


Figura 18. Valores normalizados de producción de biomasa, enzima, NAHT y esporas de *Aspergillus niger C28B25*. \diamond Biomasa; \triangle Esporas; \square NAHT * Enzima

Inóculo y tipo de inoculación.

El número de esporas inoculado por caja (5×10^7) empleado en este trabajo es mayor al usado por diferentes autores (Clutterbuck, 1972 y 1990; Law y Timberlake 1980) En cultivos de *A. nidulans* en 20-50 mL de medio líquido se usaron 5×10^4 esporas. Esto es importante ya que se ha observado un efecto de inhibición creciente de la germinación, de hasta un 80 %, para inóculos mayores de 10^6 esporas/mL en *Aspergillus niger* 31, lo cual es provocado, aparentemente, por productos auto inhibitorios, presentes en la superficie de la spora y solubles en el agua. La inhibición puede variar dependiendo del medio de cultivo y de la fuente de carbono o de si se lavan previamente las esporas (Barrios *et al*, 1989)

Por otro lado, el inóculo también es alto con respecto al usado en otros estudios en caja Petri (1×10^5 esporas usado por Larralde-Corona *et al*, 1997) La razón para usar un inóculo mayor al reportado por otros autores es que se la cinética y todos los eventos relacionados con la esporulación se retardan en el tiempo y pueden seguirse con mayor facilidad que con inóculos menores.

A. niger fluffy produce conidias después de 9-15 días y su número es muy pequeño, ya que produce alrededor de 4-9 conidias por caja; esto hace poco práctico su uso. Por esta razón se usaron dos tipos de inoculación, uno para las cepas esporógenas, en el que se pudo contar con un número de esporas constante y que pueden dispersarse homogéneamente por la superficie de la caja, y el de la cepa *A. niger fluffy* que fue inoculada por la dispersión de un cuadro de micelio de 1 cm^2 en la caja. Este hecho resultó ser importante con respecto a, la producción de biomasa en este organismo ya que se observó que existía una mayor variación de los duplicados con respecto a las cajas inoculadas de manera homogénea con esporas.

Germinación de esporas.

En el presente trabajo no se cuantificó el tiempo de germinación de las cepas esporógenas, esto debe ser importante y podría arrojar luz sobre el tiempo de retraso que presentan las diferentes cepas al

inicio de la fase de crecimiento. Las esporas de la cepa *A. nidulans bca* no tienen NAHT y esta característica podría retrasar la germinación ya que este compuesto es el precursor directo de la melanina que a su vez protege a la espora de radiación y ambientes oxidantes (Thurston 1994)

Las cepas de *A. niger*, cuyas esporas contienen el pigmento, tienen un menor tiempo de retraso del crecimiento y no puede afirmarse que se presente el efecto de inhibición de la germinación reportado por Barrios *et al* (1989), por lo que sería importante cuantificar la germinación de las esporas con inóculos menores para determinar si la falta de pigmentos retrasa el crecimiento con inóculos menores a 5×10^7 esporas. Sería también importante evaluar si el Tween 80 disminuye la inhibición de la germinación ya que en este trabajo, se observó que al recuperar las esporas con este detergente se libera NAHT.

Producción de biomasa.

La evolución de la densidad superficial de la biomasa ($\text{mg de biomasa/cm}^2$) mostró una cinética que pudo ser ajustada adecuadamente ($r^2 \geq 0.9$ para *A. niger C28B25*) por una curva logística convencional ($X_{(t)} = X_m / (1 + Ce^{-\mu t})$) Esto concuerda con datos publicados por Larralde-Corona *et al* (1997) para *A. niger* 10, y confirma que el método de siembra en césped en una superficie de agar produce datos cinéticos reproducibles. La cepa *A. niger fluffy*, tuvo un menor grado de ajuste al modelo de todas las cepas estudiadas, aunque presenta la misma μ (0.14 h^{-1}) de las cepas esporógenas de la especie, la X_m (4 mg/cm^2) es mayor con respecto a estas por la producción de micelio aéreo, que no pudo diferenciarse para formar estructuras más complejas.

Las diferencias con respecto al ajuste del modelo pueden ser explicadas en términos de la manera de inoculación de las cajas, ya que la siembra de *A. niger fluffy* fue hecha por dispersión del micelio, y esta no puede ser homogénea y quedan agregados en distintas partes de la superficie de agar, lo cual no forma un crecimiento uniforme como el observado en los cultivos en césped que son inoculados con esporas; esto provoca una variación muy grande al final del crecimiento y hace que la cinética tenga un menor ajuste al modelo propuesto.

La curva de crecimiento de *A. nidulans bca* tuvo un ajuste menor al modelo, con respecto al observado para las cepas de *A. niger* esporógenas (ver tabla 6). Esto quizás se debió a que al final de la cinética de crecimiento había una disminución en el número de esporas, lo que haría que el crecimiento esperado sea mayor que el observado. Por otro lado, este microorganismo no había sido crecido en placa en cultivos densos hasta el presente trabajo.

Se observó que es característico de la cinética de crecimiento en placa mostrar una μ menor que en otros tipos de cultivos, por ejemplo, Law y Timberlake (1980) reportaron, para cultivo en medio líquido agitado, una $\mu = 0.46 \text{ h}^{-1}$. También se observó que el microorganismo en placa de agar deja de crecer una vez que se han formado completamente los conidióforos y no por carencia de fuente de carbono o nitrógeno (Adams *et al*, 1999) ya que de ser cierto esto, la cepa de *A. niger fluffy* debería de dejar de crecer en un tiempo similar al de las cepas esporógenas. Es posible que *A. niger fluffy* continúe creciendo hasta agotar la fuente de carbono o nitrógeno al no poder continuar con la diferenciación del micelio aéreo en conidióforos.

- **Diferenciación de hifas.**

La mayor parte de estudios sobre diferenciación de estructuras en hongos filamentosos se han hecho en microorganismos a los cuales se mantiene en cultivos sumergidos o se cultivan en dos tipos de medios, sucesivamente. Primero, en un medio líquido hasta alcanzar un crecimiento determinado, seguido, de un cambio a un medio oxidante con limitación de fuente de carbono y/o nitrógeno.

Cuando se crece *Aspergillus* en medio líquido se pueden reconocer dos morfologías, hifas separadas y pelotitas (“pellets”). La forma de incorporar al oxígeno, ya sea puro o mezclado (aire) favorece un tipo de morfología determinada. Las hifas aumentan la viscosidad del medio, lo cual reduce la transferencia de masa gas-líquido. En tanto, las pelotitas tienen problemas de limitación de transferencia de masa (Cui *et al*, 1998). Como resultado de la baja solubilidad y de la limitada transferencia de masa en un biorreactor, el oxígeno es uno de los componentes limitantes para la fermentación, pues a 25° C. La concentración de oxígeno en agua a una atmósfera de presión es de 8.4 mg/L (Bailey and Ollis, 1986; Blanch and Clark, 1996). Diferentes reportes mencionan la importancia de la tensión de oxígeno en la productividad, la autólisis celular y la rigidez de la pared celular.

En cultivos líquidos de *A. niger* se ha observado que la viscosidad de los medios oxigenados es la mitad de medios aireados (Zetelaki, citado por Cui, 1998). Así mismo se ha observado que los pellets de *A. awuamori* formados en cultivos oxigenados son más compactos y la proporción de hifas libres llega casi a cero cuando la concentración de oxígeno es cercana a la concentración de saturación con oxígeno puro (Cui *et al.*, 1998). Este fenómeno es debido a la hidrofobicidad de la pared celular incrementada por la tensión de oxígeno, lo que aumenta la agregación (Vecht-Lifshitz citado por Cui, 1998). Por otra parte, ha sido demostrado que en medios líquidos bajo condiciones normales *A. nidulans* puede ser mantenido indefinidamente en el estado vegetativo de su ciclo de vida (Adams *et al.*, 1998). Ahora bien, la conidiación, estudiada principalmente en *A. nidulans*, no ocurre hasta que las hifas vegetativas son expuestas al aire. Por ejemplo: Clutterbuck (1972), observó que después de 16-17 h de cultivo (en un medio líquido con extracto de levadura 0.5 % y glucosa 2 %), y al transferirse micelio a un medio aireado, las hifas inician la formación de estructuras reproductivas. En estas condiciones se observó un pico de producción de lacasa que coincide con el máximo de conidiación.

Este mismo tipo de observaciones fueron hechas por diferentes investigadores (Law y Timberlake, 1980; Kurtz y Champe, 1982; Adams, 1998) lo que llevó a formular la hipótesis del tiempo de competencia. Esto se hizo variando los tiempos de cultivo de micelio sumergido antes de la transferencia a un medio sólido, lo que demostraba que era necesario un periodo de crecimiento mínimo antes de que las células respondieran a la inducción de señales para la producción de estructuras reproductivas.

Se ha observado que el tiempo mínimo de crecimiento en un medio líquido, antes de transferir a un medio aireado, es de 18 h (Adams, 1998). Pero aun queda por responder, ¿cuál es la señal que inicia estos cambios? La observación del fenómeno ha señalado el hecho de que la esporulación ocurre en condiciones de aerobiosis, lo que sugiere un papel importante del oxígeno (Ruiz-Herrera, 1997). Por otro lado, se ha mencionado que la señal que desencadena la esporulación no está asociada con los cambios en el nivel de O₂ o CO₂, sino a los cambios inducidos en la superficie celular por la abrupta formación de una interfase aire/agua en la superficie hifal (Timberlake, 1990; Morton, citado por Adams, 1998). También se ha sugerido que el estímulo que dispara la transición dimórfica en *Neurospora crassa* y *Mucor rouxii* es el cambio en potencial redox (Hansberg y Aguirre, 1990; Ruiz-

Herrera, 1997), cuyo sensor, al menos para *M. rouxii*, está asociado a los miembros de la cadena respiratoria, aunque es distinto de ellos (Ruiz-Herrera, 1993).

Todos estos estudios se han hecho en cultivos que son cambiados de medio y cuando se han realizado en placa estos se estudian en cultivos que han sido inoculados por piquete en el centro de esta. El estudio de este tipo de cultivo ha permitido observar un crecimiento radial, con mayor densidad en la parte central de la colonia (fig. 19) y, una vez iniciada la conidiación, esta se propaga rápidamente a los extremos de la colonia (Figura 19); dejando a los conidióforos maduros en el centro (Lee y Adams, 1994), los que presentan el color típico de los conidias maduros.

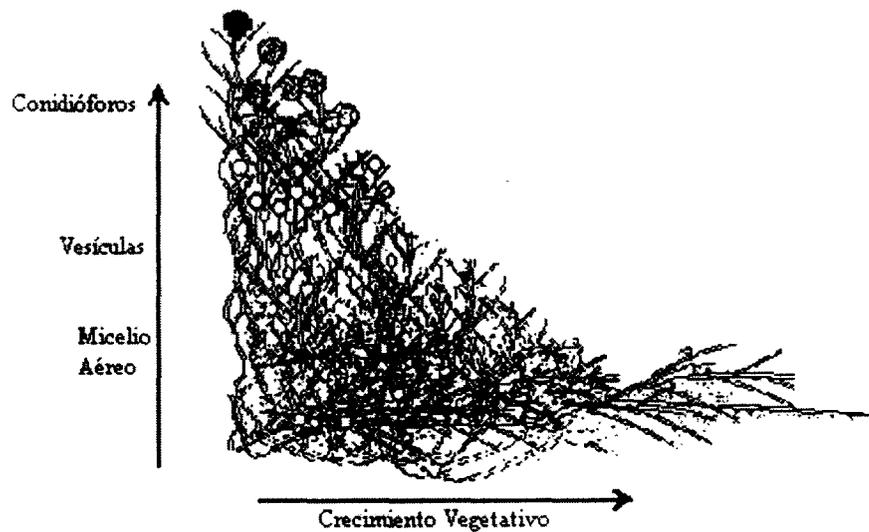


Figura 19. Crecimiento y aparición de estructuras reproductivas.

Por lo tanto, la fisiología de los micelios crecidos en cultivos sumergidos pudiera ser completamente distinta de la fisiología de los cultivos en placa, siendo la segunda opción la que más se acercaría al hábitat natural de estos organismos, los cuales crecen sobre la superficie de alimentos y otros productos orgánicos de fácil descomposición. De ahí el mérito de usar los cultivos en placa de agar, por ser más representativos de la forma natural de esporulación de los ascomicetos.

Aspectos morfológicos del crecimiento en placa

La siembra en césped con un medio adecuado favorece el crecimiento homogéneo en toda la placa. De este modo se puede ver que el crecimiento es igual en todos los puntos de la colonia.

Cuando estos cultivos fueron observados al microscopio, se identificó la formación de vesículas. Estas se encontraron muy temprano en el crecimiento del microorganismo. De hecho, el aumento en la biomasa del hongo está dado principalmente por la formación de estructuras reproductivas y no de micelio vegetativo. Pero aparentemente el hongo deja de crecer una vez que completa el desarrollo de los conidióforos (figuras 16 a 18).

Es curioso notar que la aparición de vesículas en la cepa de *A. nidulans* se dio a las 18 h después de inocular al microorganismo (Fig 16). No obstante este no es un argumento que apoye la idea de un

tiempo de capacitación de 18 hs, dado que en las condiciones de inóculo en que fueron hechos los experimentos se observó un retraso en el tiempo de todos los eventos relacionados con el desarrollo del microorganismo. Sería entonces interesante seguir el desarrollo del microorganismo con un inóculo menor y en las mismas condiciones de cultivo, donde, cabría esperar el inicio de la formación de estructuras reproductivas en un tiempo menor a 18 h, incluyendo a la cepa de *A. niger fluffy*, que mostraría únicamente la formación de micelio aéreo.

La formación de estructuras reproductivas no debería ocurrir si las cepas se encontrasen en un medio con baja tensión de oxígeno en cultivos en sustrato sólido.

Así, el tiempo de capacitación correspondería al tiempo de crecimiento en el que el microorganismo alcanza la biomasa mínima capaz de producir estructuras reproductivas, y esto dependería del desbalance en el potencial redox de la célula. Es decir, el tiempo de capacitación ocurriría cuando se alcanzara la biomasa mínima para producir estructuras reproductivas y esta sería inversamente proporcional al desbalance redox de la célula.

Esto podría deberse a la formación de gradientes locales de oxígeno en capas densas de micelio según lo descrito por Pirt (1967), quien estimó que una capa densa de un micelio con un espesor de 100 μm , bastaría para producir anoxia en su parte menos expuesta al aire.

Por ello sería muy interesante estudiar el efecto de distintas proporciones de O_2 y CO_2 en la atmósfera que rodea un cultivo en caja Petri y observar la existencia del tiempo de competencia para la esporulación de un cultivo superficial de hongos filamentosos.

Actividad enzimática.

En el presente trabajo se pudo apreciar un pico de producción de lacasa a la mitad de la fase exponencial de crecimiento del organismo. Esto puede hacernos pensar en la actividad de alguna de las 4 lacasas reportadas para *A. niger* (La lacasa conidial I, la cleistotecio lacasa II, tirosinasa hifal y la AHTasa, que se distinguen por su especificidad; Fogarty y Tobin, 1996). En el presente trabajo, se observó que la producción de lacasa precedió a la formación de las esporas y del NAHT, estos resultados están en contraposición a los reportados por Clutterbuck (1972, 1990) y por Law y Timberlake (1980) para *A. niger* y *A. nidulans*, respectivamente, quienes observan que la máxima actividad de lacasa se daba en la fase final de crecimiento. Comportamiento que es típico de

organismos crecidos en matraces en medio líquido y a los que posteriormente se les elimina el medio o se crecen en superficie

Si consideramos que las condiciones de cultivo del hongo en el presente trabajo son muy oxidantes, el microorganismo producirá una serie de compuestos, tales como las melaninas, que le protegerán de este ambiente, de este modo es importante la producción de lacasa. En condiciones de cultivo líquido, el hongo no necesita un antioxidante como la melanina (Fogarty y Tobin, 1996), pero al hacerse un cambio de medio, aumenta de súbito la concentración de oxígeno, lo que induce la conidiación; desencadenando la producción de lacasa, NAHT, esporas y otros productos en un tiempo muy corto y al final de la fase de crecimiento.

Por otro lado, el ajuste de Leudeking y Piret de la curva Enzima vs Biomasa muestra un comportamiento de producción de lacasa ligada a la producción de biomasa ($\alpha > 0$) ya que esta actividad cae al final de la fase de crecimiento ($\beta < 0$). Así mismo se observó que, $|\beta| < \alpha\mu$, en las cepas esporógenas, lo cual es compatible con un proceso de destrucción de la enzima, antes de terminar la etapa del crecimiento ya que indica que la tasa específica de destrucción, β , tiene una magnitud menor a la tasa específica de producción, $\alpha\mu$. Por otra parte, $\nu = |\beta|/\alpha\mu$, que permite calcular el nivel de la biomasa crítico en el cual se alcanza un pico de producción, $X_c = (1 - \nu)X_m$, tiene el mismo valor ($\nu = 0.125$) en las dos cepas de *Aspergillus niger* de este estudio. Esto apoya la idea de la necesidad de la lacasa durante el proceso de crecimiento del micelio. Este resultado difiere claramente de los obtenidos por los autores (Adams, 1992, 1998; Champe, y Simon, 1992; Clutterbuck, 1972, 1978, 1990; Timberlake, 1990) que habían estudiado este proceso, por la técnica de cambio de medio (sumergido a placa)

Producción de esporas.

Con respecto a la esporulación, se observó que el número de esporas reportados por Clutterbuck (1972) y Law y Timberlake (1980) de 10×10^9 a 30×10^9 conidiosporas por caja en *A. nidulans*, en el presente trabajo se encontró que el número máximo de conidioesporas para la cepa *A. nidulans bca*, fue de 3.9×10^9 por caja, que está dentro del valor esperado. Considerando que el microorganismo fue crecido en un solo tipo de medio, sin someterse al estrés que representa el cambio de ambiente.

Las cepas esporógenas de *A. niger fawn* y *C28B25* produjeron 7.9×10^9 esporas por caja, que es un número similar al encontrado en la cepa de *A. nidulans bca*; no obstante, es posible que este número pueda ser el máximo alcanzado por las cepas de *Aspergillus* en estas condiciones de cultivo.

Los cultivos en césped esporularon sin estar sometidos a una falta de nutrientes, hecho que ya ha sido observado en cepas de *A. nidulans* (Adams *et al*, 1992). Esta observación-podría indicar que las cepas de *A. niger* están programadas genéticamente para esporular con facilidad cuando alcanzan cierta densidad de micelio en superficie en respuesta a factores internos y externos (Adams *et al*, 1992; 1998; Marhoul y Adams 1995) como podrían ser los cambios del nivel de oxidación en un cultivo denso. En *A. nidulans* es muy importante el papel de FlbD (gen regulatorio necesario para el cambio de morfología), cuyo mRNA está presente a lo largo de todo el ciclo de vida y cuya secuencia de 314 aminoácidos de la proteína codificada por este, ha sido comparada. Se ha encontrado que los primeros 104 aminoácidos tienen una homología >30-40% con *c-myb*, un protooncogene humano (Wieser and Adams, 1995; Adams, 1998). Esto es especialmente relevante porque ha sido demostrado que cambios en el estado redox pueden inducir cambios conformacionales en el dominio Myb que se une al DNA, alterando su estabilidad de asociación con este.

Otro gen relacionado con la esporulación de *A. nidulans* es el *fluG*, que tiene un papel importante en la síntesis de la glutamina y la glutamino sintasa (en el metabolismo del nitrógeno). Es entonces interesante especular si las señales de esporulación interfieren de alguna manera con el metabolismo del nitrógeno, teniendo una limitación autorregulada de nutrientes y una activación controlada del desarrollo (Lee y Adams, 1994) o esta es consecuencia de un cambio en el potencial redox dentro de la célula (Hansberg, 1990; Ruiz-Herrera, 1997).

Alternativamente, un nivel bajo en la producción constitutiva de las señales de esporulación podría dar un medio para medir la densidad celular. La inducción solo ocurriría cuando hubiera un nivel umbral de factores FluG acumulados (Lee y Adams, 1994).

En el presente trabajo se observaron dos periodos de producción de esporas. El primero a las 48 h, y el segundo, a las 64 h en todas las cepas. Este comportamiento no ha sido reportado en cultivos que son cambiados de medio. El primer periodo de esporulación apareció después del pico de producción de lacasa. El segundo periodo de producción de esporas no parece estar relacionado con otro pico de

lacasa. Aunque el método de extracción de la enzima podría no ser el adecuado para extraer la enzima de los conidias, podría usarse la prensa francesa y ver si difiere en rendimiento del método usado aquí.

El número de esporas varió al final de la cinética, la cepa *A. niger C28B25*, produjo un número constante una vez que se completó el crecimiento vegetativo (Fig. 18). En cambio, las cepas de *A. nidullans bca* y *A. niger fawn* tuvieron un patrón bifásico de producción de esporas después de las 40 hs de cultivo y disminución en el número de esporas en *A. nidullans bca* después de las 50 hs (Fig. 15). En el caso de *A. nidullans bca*, no hay producción de NAHT, cabría preguntarse si el NAHT o alguno de sus derivados pudieran estar relacionados con la estabilidad en el número de esporas y si las mutaciones que afectan el pigmento de las esporas (*A. nidullans bca* y *A. niger fawn*) tienen un papel importante en la estabilidad de las esporas, comparadas con aquellas de pigmentación normal.

Secuencia de eventos.

En la figura 20 se da la secuencia de eventos encontrada en el presente trabajo en las cepas esporógenas de *A. niger*.

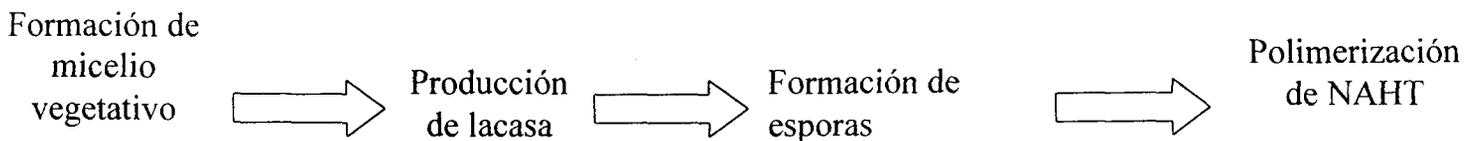


Figura 20. Secuencia de eventos observados durante el presente trabajo en las cepas de *Aspergillus niger*.

Esta secuencia de eventos es consecuencia de que el organismo crezca en un medio muy oxidante, la producción de enzima debe darse primero ya que está directamente relacionada con la producción de pigmentos antioxidantes, esto se demuestra observando que el pico se da a la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Por otra parte, aunque a simple vista el micelio se torna oscuro, no es posible detectar una gran cantidad de pigmentos a 530 nm y es posible que sean distintos a los que se encuentran en las esporas o que la concentración de los mismos sea muy baja.

La secuencia difiere de organismos cultivados en dos medios sucesivos, la razón es que cuando se crece a un hongo como *Aspegillus* en medio líquido, el ambiente es poco oxidante y no existe la necesidad de proteger a la célula con pigmentos, en ese sentido, es innecesaria la producción de lacasa, así, se observará un aumento de la biomasa, una vez alcanzado una masa crítica el hongo esporulará. Esta observación a llevado a plantear el tiempo de competencia (fig. 21), que es el tiempo mínimo de cultivo en medio líquido para que *A. nidulans* pueda esporular. No obstante, de acuerdo a esta idea el microorganismo tendría la capacidad de medir la densidad celular para iniciar la esporulación, como se pudo observar en el presente trabajo el tiempo mínimo para el inicio de la esporulación es de 24 hs para *A. nidulans bca* y de 28 hs para las cepas de *A. niger*, esto posiblemente debido al efecto protector del micelio creciendo densamente. Aunque hay que recordar que deben analizarse inóculos más pequeños, que darían como resultado una disminución en el tiempo de competencia dado el carácter oxidante del medio.

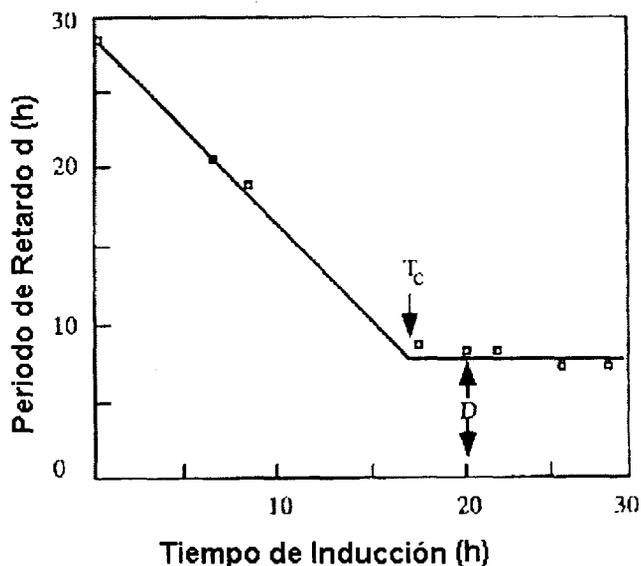


Figura 21. Determinación experimental del tiempo de competencia (T_c), D es el intervalo de tiempo entre el cambio de medio líquido a sólido y la aparición de esporas (tomado de Champe y Simon, 1992).

Los presentes resultados permiten abrir nuevas oportunidades de medir el proceso de la morfogénesis, por medio del desarrollo de métodos morfométricos e histoquímicos *in situ*, asociados a mediciones cinéticas y fisiológicas tan precisas y susceptibles de describirse por modelos cinéticos, como los cultivos sumergidos. Incluso, la heterogeneidad que se observa en las colonias crecidas por picadura también permitirá estudiar aspectos inéditos del control de la morfogénesis de los ascomicetos. En el presente trabajo se demostró que el cultivo en placa por siembra en césped produce resultados

cuantitativos reproducibles para la medición de enzimas, metabolitos y biomasa y para su seguimiento por medio de los modelos logístico y de Leudeking y Piret. Este avance metodológico podrá servir de sistema modelo para procesos industriales como la producción de esporas para el control biológico de las plagas de la agricultura, las cuales cada vez se utilizan más usando los cultivos de hongos filamentosos sobre sustratos sólidos.

Conclusiones.

- a) El presente estudio demostró que es posible el estudio de cinéticas de crecimiento de *Aspergillus* usando cultivos en césped en placas de agar y que el crecimiento se ajusta a un modelo logístico. Así mismo, se pudieron determinar las constantes de crecimiento de las cepas de estudio y las constantes de Leudeking y Piret para la producción de lacasa. Lo que demostró que la producción de la enzima está asociada al crecimiento con una etapa tardía de destrucción de la misma.
- b) En contraposición a lo indicado por distintos autores, el presente estudio demostró que la secuencia del ciclo de vida de las cepas de estudio fue

crecimiento→producción de lacasa→esporulación→polimerización de NAHT,

distinta de la observada cuando se usa el método de cambio de medios

crecimiento→ esporulación→producción de lacasa→ polimerización de NAHT

Lo cual indica que la secuencia de los eventos durante el proceso de diferenciación de los hongos filamentosos puede depender del sistema de cultivo utilizado.

- c) El presente estudio mostró que la actividad enzimática sobre ácido gálico no se presentó en la cepa *Aspergillus niger floffy* ya que esta actividad está relacionada con su capacidad esporulante. No obstante se sugiere hacer estudios con otros sustratos de la enzima para tener una mejor evaluación al respecto.
- d) En el presente estudio se encontró que las cepas mutantes de *Aspergillus* que tienen afectado el proceso de pigmentación o de esporulación (cítelas) presentan cambios en la duración de eventos tales como, formación de pigmentos y esporulación, a comparación con las cepas de tipo silvestre (A. niger C28B25) Y este resultado podría servir para mejorar la caracterización de los fenotipos asociados a este tipo de mutaciones.

ANEXO 1.

DESARROLLO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA MEDIR LA ACTIVIDAD DE LACASA.

El uso de ácido gálico como substrato cualitativo para medir la actividad de lacasa, se reportó en 1972 (Clutterbuck.). Sin embargo, su uso como substrato cuantitativo se reporta por primera vez en este trabajo, tomando como base de desarrollo el método del artículo de Clutterbuck (1972). El desarrollo de la metodología se describe a continuación.

El ácido gálico es un compuesto fácilmente oxidable. Por esta razón, el primer paso fue encontrar un regulador de pH en el cual, el nivel de oxidación, fuera mínimo.

Para tal efecto, se preparó regulador Tris-HCl y Tris-maleico 5 mM, a pH 7. Se midió espectrofotométricamente la estabilidad del ácido gálico, 50 μ l/ml de una solución 5 mM, a 235 nm. Se usó además un testigo de ácido gálico en agua. Los resultados se muestran en la figura 22.

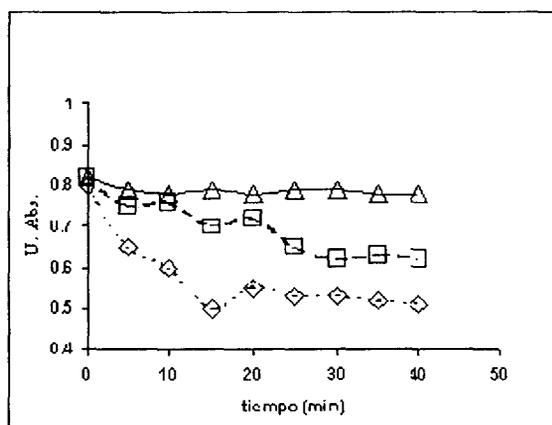


Figura 22. Oxidación de ácido gálico en diferentes reguladores. \diamond Agua \triangle Tris-maleico. \square Tris

Como se puede apreciar, el ácido gálico se mantiene estable en regulador Tris-maleico, en tanto que se aprecia un descenso de la absorbancia cuando se usó Tris-HCl o agua, siendo el agua en donde el ácido gálico se oxida más rápidamente.

Estos resultados muestran que, por lo menos durante 40 minutos, el buffer mantiene estable al ácido gálico, tiempo en el que se esperaba medir la actividad de lacasa.

Por otro lado, se realizaron curvas para determinar la concentración de ácido gálico que se puede medir en el espectrofotómetro. Como se puede apreciar en la figura 23, la tendencia lineal se conserva hasta una concentración de 20 μM de ácido gálico en el regulador Tris-maleico. La curva es:

$$y = 0.064x - 4E^{-16}$$

Teniendo una regresión lineal de: $R^2 = 1$

Dado que el valor $4E^{-16}$ es muy pequeño, se consideró despreciable y sólo se tomó $y = 0.064x$ para los cálculos posteriores.

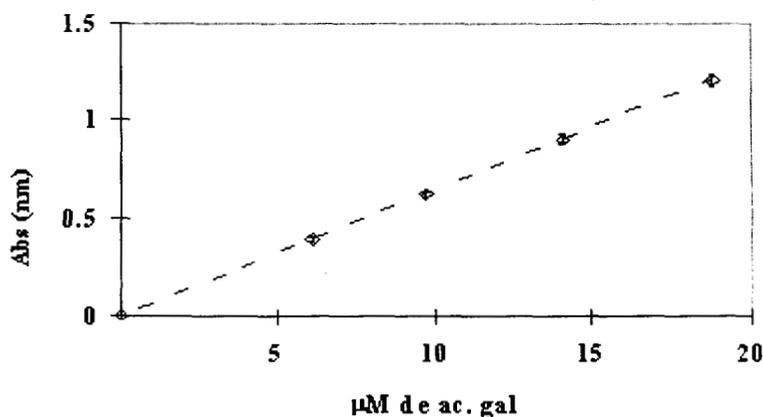


Figura 23. Absorbancia a 235 nm de ácido gálico a diferentes concentraciones.

El siguiente paso fue demostrar que entre el extracto enzimático de *A. niger* C28B25 y el ácido gálico no hay interferencia a la misma longitud de onda, de este modo se hizo un experimento (fig. 24) en donde se verificó que por parte del extracto crudo la absorbancia es muy baja.

A continuación se evaluó el efecto del extracto de las cepas de estudio en la oxidación del ácido gálico. Se usó *Agaricus bisporus* como cepa testigo, ya que este organismo presenta actividad de lacasa medible con ácido gálico. Se usó el método de extracción de lacasa reportado por Jiménez (1997), para este hongo.

Los resultados se muestran en la figura 25, se puede apreciar que el extracto de *Agaricus bisporus* provoca una disminución en la absorbancia del ácido gálico de manera constante hasta el final del experimento. Del mismo modo el extracto obtenido de *Aspergillus niger* C28B25, disminuye la absorbancia, pero este efecto se da en los primeros 10 minutos de reacción para después de este tiempo mantenerse estable hasta el final del experimento.

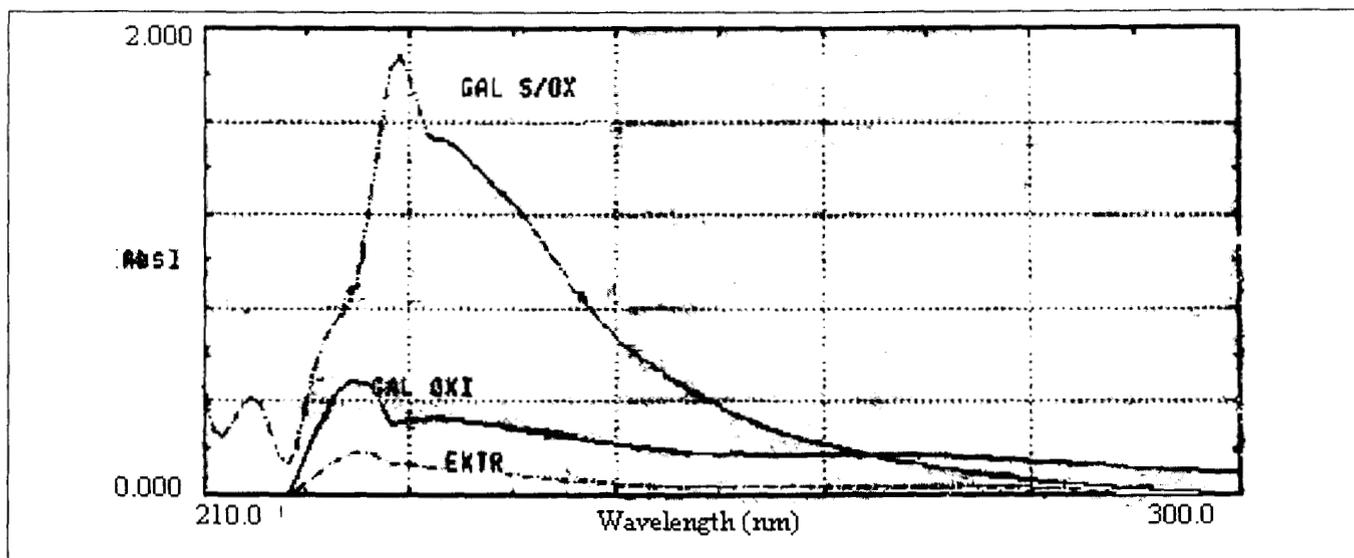


Figura 24. Absorción de Extracto enzimático de *Aspergillus niger* (EXTR), ácido gálico en regulador Tris-maleico 5mM, pH 7 (GAL S/OX) y ácido gálico oxidado por el extracto crudo de *Aspergillus niger* (GAL OXI)

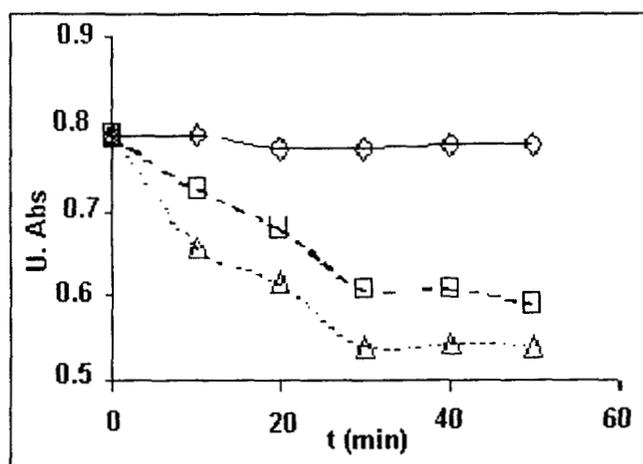


Figura 25. Oxidación del ácido gálico (200 μ l de ácido gálico 5 mM) en presencia de extractos de *Agaricus bisporus* y *Aspergillus niger* C28B25. \diamond Ácido gálico en regulador Tris-maleico 5mM, pH 7. \triangle *Agaricus bisporus*. \square *Aspergillus niger* C28B25.

Para demostrar que era la lacasa presente en el extracto de *A. niger* y no otro compuesto el que tenía un efecto en la disminución de la absorbancia del ácido gálico se usó calor para desnaturar a la enzima, pero esto generó que el extracto aumentara su absorbancia de 0.45 ± 0.0335 a 0.5976 ± 0.0353 UA a 300 nm, que es a longitud en que absorbe el extracto a las 24 h. probablemente por la oxidación de los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Se buscó eliminar entonces aquellos compuestos del extracto crudo que daban un color y que pudieran interferir con la determinación espectrofotométrica. Se preparó una bolsa de diálisis con límite de corte de 14 000 con 5 mL de

extracto crudo, se colocó en buffer de fosfatos pH 7 0.1 M, no obstante, después del primer cambio dejó de detectarse la actividad enzimática, posiblemente a que la concentración se diluyó. Por esta causa se decidió trabajar solo con el extracto crudo.

Para demostrar que el extracto de *A. niger C28B25* tiene un efecto en la disminución de la absorbancia, se hicieron barridos secuenciales cada 5 minutos.

Con los resultados obtenidos se hizo una gráfica en donde se ve la disminución de ácido gálico en el tiempo. Se tomó la absorbancia a 235 nm que es a la cual el ácido gálico al tiempo cero tiene un máximo de absorbancia. Los productos de oxidación del ácido gálico presentan máximos de absorbancia distintos de 235 nm (entre 225 y 230 nm, figura 26).

Por otro lado se midió la disminución de la absorbancia de ácido gálico con diferentes concentraciones de extracto enzimático (0, 50, 100 150 y 200 μ l), los resultados se pueden apreciar en la figura 27.

De estos resultados se puede concluir que la concentración de extracto es la adecuada para medir la actividad de la lacasa presente en el extracto.

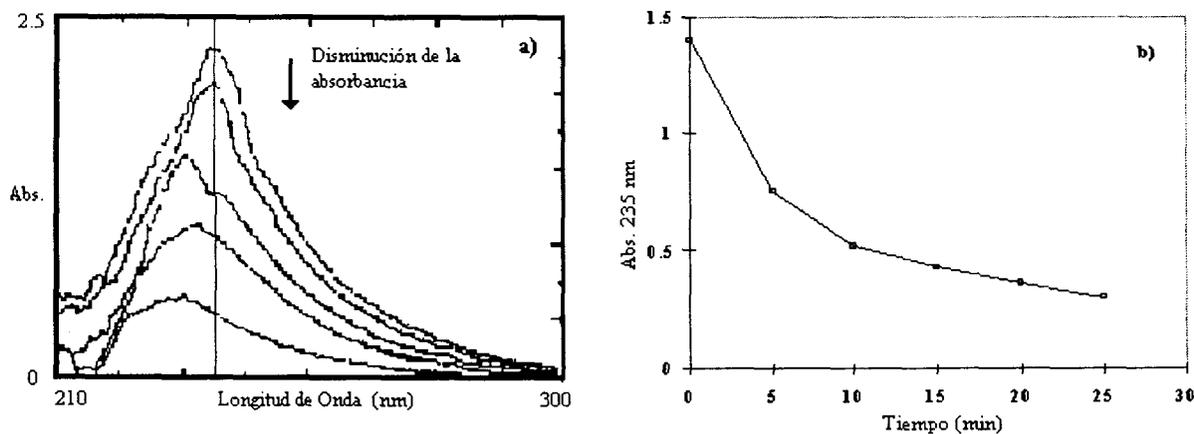


Figura 26. a) Espectro del ácido gálico 5 mM y extracto de *Aspergillus niger C28B25*, cada 5 min. b) Disminución del ácido gálico con el tiempo medido a 235 nm.

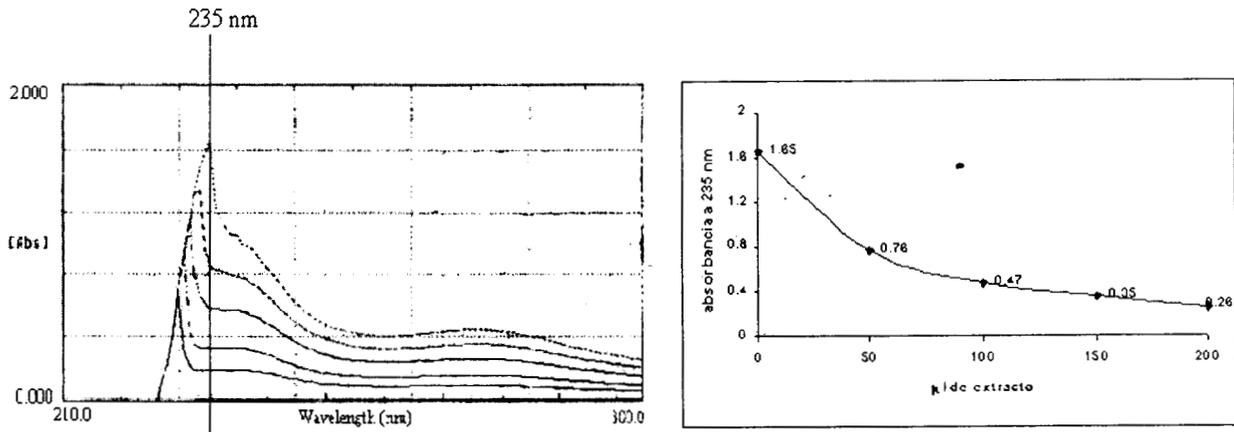


Figura 27. Disminución de la absorbancia del ácido gálico 5 mM en regulador Tris-maleico 5mM, pH 7, a diferentes concentraciones de extracto de crudo de *A. niger C28B25*. En la primera parte de la figura se aprecia el barrido obtenido en espectrofotómetro, en la segunda se ve la gráfica que se realizó tomando cada valor a 235 nm.

El método para la determinación de la actividad de lacasa se da en materiales y métodos.

Anexo 2.

Factores que influyen la formación de esporas en hongos filamentosos (Principios de Kleb, 1899).

1. Se detiene el crecimiento vegetativo vigoroso por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de factores tóxicos.
2. La reproducción se inicia cuando un micelio bien nutrido agota sus nutrientes o es privado de estos por transferencia a un medio distinto.
3. El tipo de nutrientes y su concentración influyen el desarrollo, pudiendo ser posible manipular los tipos y secuencia de la esporulación.
4. Las condiciones de los nutrientes durante el periodo de crecimiento pueden influenciar la esporulación después de la transferencia a un medio diferente.
5. Las sales inorgánicas pueden tener efectos específicos en la reproducción y sobretodo en el vigor del hongo.

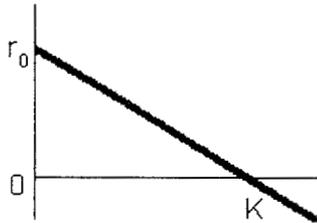
Tomado de Griffin (1994)

Anexo 3.

Modelo logístico.

El modelo logístico fue desarrollado por el matemático belga Pierre Verhulst (1838) quien sugirió que la velocidad de crecimiento de una población puede estar limitada, esto podría depender, entre otras cosas, de la densidad de la población:

$$r = r_0 \left(1 - \frac{N}{K}\right)$$



A bajas densidades ($N \ll 0$), la velocidad de crecimiento de la población es máxima e igual a r_0 . El parámetro r_0 puede ser interpretado como la velocidad de crecimiento de la población en ausencia de competencia intraespecífica.

La velocidad de crecimiento de la población declina con el aumento de la población N , y tiende a cero cuando $N = K$.

El parámetro K es el límite superior de crecimiento de la población y se conoce como capacidad de carga del sistema. Es usualmente interpretado como la cantidad de recursos como el número de organismos, que pueden ser mantenidos por estos recursos. Si la población excede K , entonces la velocidad de crecimiento de la población se volverá negativa y el número de organismos declina.

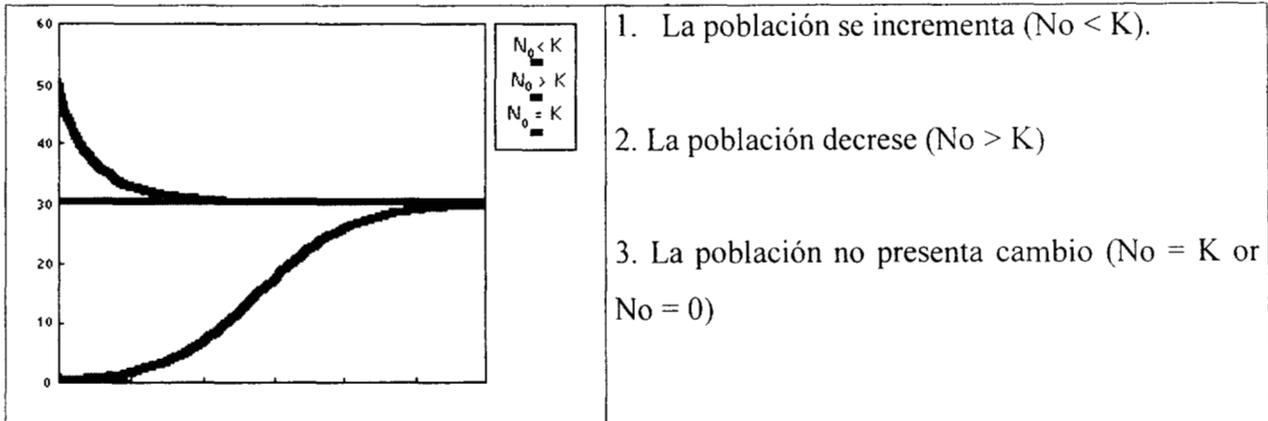
La dinámica de poblaciones es descrita por la ecuación diferencial:

$$\frac{dN}{dt} = rN \approx r_0 N \left(1 - \frac{N}{K}\right)$$

Cuya solución es:

$$N_t = \frac{N_0 \cdot K}{N_0 + (K - N_0) \cdot \exp(-r_0 t)}$$

El modelo tiene tres posibles soluciones dependiendo de los parámetros N_0 o K :



El modelo logístico tiene dos puntos de equilibrio: $N = 0$ y $N = K$. El primero es inestable ya que cualquier pequeña desviación de este equilibrio significa el crecimiento de la población. El segundo equilibrio es estable porque después de pequeñas perturbaciones la población regresa al estado de equilibrio.

El modelo logístico combina dos procesos ecológicos; la reproducción y la competencia. Ambos procesos dependen del número de organismos (o densidad). La velocidad de ambos procesos corresponde a la acción de la ley de masas con coeficiente r_0 para la reproducción y r_0/K para la competencia.

Interpretación de parámetros del modelo logístico.

El parámetro r_0 es relativamente fácil de interpretar, este es la velocidad máxima de crecimiento de la población que es el efecto neto de la reproducción y la mortalidad. Los organismos de reproducción lenta tienen una r_0 baja, en tanto que organismos de reproducción rápida tienen una r_0 alta.

El parámetro K tiene significado biológico para poblaciones con una fuerte interacción entre individuos que controlan su población, por ejemplo los hongos filamentosos compiten por espacio y nutrientes que se convierten en la limitante de crecimiento.

Glosario de los términos usados en el presente trabajo

ascospora (del gr. *askós*, odre, saco y *sporá*, simiente espora): espora haploide, propia de los hongos ascomicetes, que nace en el interior del asca como resultado de un proceso de reproducción sexual.

anamorfo (del gr. *ánamorphóo*, transformar): es el estado asexual, conidial o imperfecto de un hongo, que produce sus esporas por mitosis, en contraposición con el telemorfo (del gr. *telos*, completo, perfecto, y *morphé*, forma) que es el estado sexual o perfecto (ascógeno o basidiógeno) y cuyas esporas se producen por meiosis; el hongo en todas sus formas se denomina holomorfo (del gr. *holós*, todo, entero y *morphé*, forma).

célula pie: célula basal que soporta el conidióforo de *Aspergillus*. También se refiere a la célula basal del macroconidio de *Fusarium* (molinales) y a la del talo de los hongos acuáticos del orden de los blastocladiales (como *Blastocladia* y *Blastocladellia*), que en estos adoptan la forma general de un tronco con ramas portadoras de zoosporángios en la parte apical y rizoides u órganos de fijación basal.

cenocito (del gr *koinós*, común y *kitos*, célula, hueco): aseptado, talo en que los núcleos se encuentran incluidos en un citoplasma común, continuo, sin estar separados por tabiques o septos transversales.

cleistotecio (del gr. *Kleistós*, cerrado y *thêke*, teca o caja; aquí, asca): cuerpo fructífero (un tipo de ascocarpo angioscárpico) generalmente esférico delimitado por una pared propia que permanece cerrada, aunque en la madurez se rompe irregularmente o se disgrega para dejar libres a las ascas; estas se encuentran irregularmente distribuidas en el interior del ascocarpo (sin constituir un himemeno).

conidio: también se le llama conidioespora; es una espora asexual, no móvil, generalmente formada en un ápice o en un lado de una célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser, uni, bi, o pluricelulares, secos o mucosos, pero nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio, como sucede con las esporangiosporas. Los conidios son las esporas asexuales de los deuteromycetes, ascomycetes y basidiomycetes; los conidios blásticos se generan *de novo* (la mayoría), los tálicos lo hacen a partir de células hifales preexistentes.

conidióforo (del neo. lat. *conidium*, y éste de la forma dim del gr. *kónis*, polvo, y del gr. *phoros*, portador): hifa simple o ramificada, que se diferencia morfológicamente o fisiológicamente de una somática por producir y sustentar conidios; estos son generados en células especializadas denominadas conidiógenas, que pueden disponerse de manera muy diversa. En ocasiones se utilizan indistintamente, aunque erróneamente, los términos conidióforo y célula esporógena o conidiógena.

esporocarpio (del gr. *sporá*, simiente, espora y *kárpos*, fruto): tratándose de hongos, en general se refiere a un cuerpo fructífero portados de esporas (fruto esporófero).

esporóforo (del gr. *sporá*, semilla, espora, y *phóros*, portador): cualquier estructura portadora de esporas, ya sean asexuales o sexuales.

fiálide (del gr. *phialís*, pequeño vaso o pomo): tipo de célula conidiógena, en forma de botella, que produce conidios blásticos (filoconidios o fialosporas) en sucesión basípeta; la fiálide es una de las células conidiógenas más comunes entre los hongos imperfectos, tales como *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Chalara* y muchos otros géneros

heterotrófico (del gr *héteros*, otro, diferente, *trophós*, que nutre, que sirve de alimento): que se alimenta de la materia orgánica elaborada por otros organismos, es decir, que es incapaz de sintetizar los hidratos de carbono a partir de elementos inorgánicos, por lo que tiene que vivir como saprobio o como parásito.

micelio (del neo latín *mycelium*, y este del griego *mýkes*, hongo): conjunto o masa de hifas que conforman el cuerpo de un hongo.

métula (del lat. *metula*, diminutivo de *meta*, pirámide, extremo de cualquier cosa): ramita del conidióforo que origina fiálides o células conidiógenas, como se observa en los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* entre otros. A la métula también se le llama profiálide (del gr. *pro*, delante, anteriormente, y *phialís*, pequeño vaso o pomo), puesto que se halla por debajo de la fiálide. Erróneamente también “esterigma primario” (del gr. *sterigama*, sosten soporte), por encontrarse en la base del “esterigma secundario”; realmente éste último es la fiálide.

Modelo Logístico: se usa principalmente para describir el crecimiento de la población a través del tiempo, o el de la mortalidad con la edad (ver anexo 3).

saprobio (del gr *saprós*, podrido, y *bios*, vida): organismo que se desarrolla sobre otro ser orgánico muerto o sobre sustancias orgánicas, y utiliza estos sustratos como alimento.

septo (del lat. *Septum*, valla, tabique, partición): pared transversal en una célula o en una hifa. Los septos o tabiques se forman por crecimiento centrípeto de la pared celular, y se presentan con cierta regularidad espacial en los micelios septados.

*Los términos fueron tomados de Ulloa (1991)

Bibliografía

1. Adams, T. H., Hide, W. A., Yager, L. N. and Lee, B. N. (1992) Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol.* **12**(9):3827-3833.
2. Adams, T. H., Wieser, J. K. and Yu, J. H. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(1):35-54.
3. Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. (1979) *Introductory Mycology*, 3rd ed., John Wiley and Sons, New York.
4. Aquiahuatl, A. (1992) Destoxificación de la pulpa de café: morfología, fisiología y bioquímica de hongos filamentosos que degradan la cafeína. Tesis de maestría. Facultad de ciencias-UNAM. México, D. F.
5. Archer, D. B. and Peberdy, J. F. (1997) The molecular biology of secret enzyme production by fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**(4):273-306.
6. Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc Graw Hill. New York.
7. Bailey, M. A. M.; Herrera, E. A. y Ruiz, H. J. (1997) Biología molecular de hongos de importancia agrícola. *Avance y perspectiva* **16**: 27-36.
8. Barrios-González, J., Martínez, C, Aguilera, A. and Raimbault M. (1989) Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Let.* **11**(8):551-554.
9. Bennett, J. W. (1991) *Taxonomy of Fungia nd Biology of the Aspergilli*.
10. Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K and Xu, F. (1997) Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of

Myceliophthora thermophila and analysis of recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*.
Appl. Environ. Microbiol. **63**(8):3151-3157.

11. Blanch, H. W. and Clark, D. S. (1996) Biochemical Engineering. Marcel Dekker Inc. New York.
12. Bloomfield, B. J. and Alexander, M. (1967) Melanins and resistance of fungi to lysis. J. Bacteriol. **94**(4):1276-1280.
13. Brenna, O. and Bianchi, E. (1994) Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine. Biotechnol. Lett. **16**(1)35-40.
14. Champe, S.P. and Simon, L.D. (1992) Cellular differentiation and tissue formation in the fungus *Aspergillus nidulans*. In Rossomando, E.F. and Alexander, S. (ed.), Morphogenesis: an Analysis of the development of biological form. Marcel Dekker . Inc. New York.
15. Clutterbuck. A. J. (1972) Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. **70**:423-435.
16. Clutterbuck. A. J. (1990) The genetics of conidiophore pigmentation in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. **136**:1731-1738.
17. Cui, Y. Q., van der Lans, R. G. J. M. and Luyben, K. Ch. A. M. (1997) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. Biotechnol. Bioengin. **57**(4):409-419.
18. Davis, S. and Burns, R. G. (1990) Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**:721-726.
19. Davies, R. W. (1991) Expression of heterologous genes in filamentous fungi. In Applied Molecular Genetics of Fungi. Peberdy, J. F., Caten, C. E., Ogden, J. E. & Bennett, J. W. Eds. Cambridge University Press, Cambridge.

20. Denis, S. (1996) Degradation de la cafeine per *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. Etude physiologique et biochimique. These Doctorat. Université Montpellier II. France.
21. D'Enfert, C. (1997) Fungal sporegermination: insights from the molecular genetics of *Asprgillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Biol. **21**:163-172.
22. D'Souza, T. M., Boominthan, K. and Reddy C. A. (1996) Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. Appl. Envirom. Microbiol. **62**(10):3739-3744.
23. Fogarty, R. V. and Tobin, J. M. (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. Enzyme Microb Technol **19**:311-317.
24. Font, X., Caminal, G., Gabarrel, X., Lafuente, J. and Vicent, M. T. (1997) On-line enzyme activity determination using the stopped-flow technique: application to laccase activity in pulp mill wastewater treatment. Appl. Microbiol. Biotechnol. **48**:168-173.
25. Georgiou, G. and Shuler, M. L. (1986) A computer model for the growth and differentiation of a fungal colony on solid substrate. Biotechnol. Bioeng. **28** 405-416.
26. Griffin, D. H. (1994) Spore development. In Fungal physiology. Wiley-Liss Inc. New York.
27. Gutiérrez R., M. (1995) Contribución al estudio del modelado matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis de Doctorado. UAM-I. México.
28. Hansberg, W. And Aguirre, J. (1990) Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxigen. J. Theor. Biol. **142**:201-221.
29. Hansberg, W. (1996) A Hyperoxidant state at the start of each developmental stage during *Neurospora crassa* conidiation. Ciencia e Cultura J. Braz. Assoc. Adv. Sci. **48**(1/2)68-74.

30. Jacobson, E. S. and Tinnel, S. B. (1993) Antioxidant function of fungal melanin. *J. Bac.* **175**(21):7102-7104.
31. Jiménez, M. R (1997) Comunicación Personal.
32. Koch, A. L. (1975) The kinetics of mycelial growth. *J. Gen. Microbiol.* **89**:209-216.
33. Kuo, M. J. and Alexander, M. (1967) Inhibition of the lysis of fungi by melanins. *J. Bacteriol.* **94**(3):624-629.
34. Kurtz , M.B. and Champe, S.P. (1981) Dominant spore color mutants of *Aspergillus nidullans* defective in germination and sexual development. *J. Bacteriol.* **148**:629-638.
35. Larralde-Corona, C. P., López-Isunza. F. and Viniestra-González, G. (1997) Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnol. Bioeng.* **56**(3):287-294.
36. Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N and Golovleva L. (1997) 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Lett* **413**:446-448.
37. Law, J. D. and Timberlake, W. E. (1980) Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**(2):509-517.
38. Mansur, M., Suárez, T. and González, A. E. (1998) Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl Environ Microbiol* **64**(2):771-774.
39. Marhoul J. and Adams, T.H. (1995) Identification of developmental regulatory genes in *Aspergillus nidulans* by overexpression. *Genetics* **139**:537-547.

40. Marhoul J. and Adams, T.H. (1996) Isolation of *Aspergillus nidulans* mutants that overcome brlA-induced growth arrest. Fungal Genet Biol **21**(1): 109-17.
41. McCorkindale, N. J., Hayes, D., Johnston, G. A. and Clutterbuck, A. J. (1983) N-acetyl-6-hydroxytryptophan a natural substrate of a monophenol oxidase from *Aspergillus niger*. Phytochem **22**(4):1026-1028.
42. Moore-Landecker, E. (1982) Fundamentals of the fungi. 2nd ed., Prentice-Hall Ed., Englewood Cliffs, New Jersey.
43. Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T. and Martínez M. J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus aryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. Appl. Environ. Microbiol. **63**(6):2166-2174.
44. Nerud, F., Zouchová, Z. And Mišurcová Z. (1992) Lignolytic properties of different white-rot fungi. Biotechnol. Lett. **13**(9):657-660.
45. Okasaki, N., Sugama, S. and Tanaka, T. (1980) Mathematical model for surface culture of koji mold. J. Ferment. Technol. **58**(5):471-476.
46. O'Malley, D. M., Whetten, R., Bao, W., Chen., C-L. and Sederoff. C.(1993) The role of laccase in lignification. Plant. J. **4**(5):751-757.
47. Pandey, A. (1992) Recent process developments in solid-state fermentation. Proc. Biochem. **27**:109-117.
48. Pérez, J., Martínez, J. and de la Rubia, T. (1996) Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*. Appl. Environ. Microbiol. **62**(11):4263-4267.
49. Piattelli, M., Fattorusso, E., Magno, S. and Nicolaus, R. A. (1963) Ustilago melanin, a naturally occurring catechol melanin. Tetrahedron Lett. **15**:997-998.

50. Pirt, S. J. (1967) A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. *J. Gen. Microbiol.* **47**:181-197.
51. Prosser, J. I. and Trinci, P. J. (1979) A model for hyphal growth and branching. *J. Gen. Microbiol.* **111**:153:164.
52. Rajarathnam, S., Shashirekha, M. jU. and Bano, Z. (1998) Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. *Crit. Rev. Biotechnol.* **18**(2&3):91-236.
53. Rast, D. M., Stussi, H., Hegnauer, H., and Nyhlen, L.E. (1981) Melanins. In: *The fungal spore: Morphogenetic controls.* (Turian, G. and Hohl, H. R. Eds). Academic Press, New York pp.507-531.
54. Ratcliffe, B., Flurkey, W., Kuglin, J. and Dawley. (1994) Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushrooms (*Agaricus, crimini, oyster, shiitake*). *J. Food. Sci.* **59**(4):824-827.
55. Reddy, C. A. (1995) The potencial for White-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opinion Biotechnol* **6**:320-328.
56. Romero, G. S. J. (1997) Caracterización genética de cepas sobreproductoras de pectinasas y resistentes a 2-desoxiglucosa. Tesis de maestría. Facultad de química-UNAM. México, D. F.
57. Ruiz-Herrera, J. (1997) Las bases moleculares de la diferenciación de los hongos. En *Perspectivas de la microbiología en México.* José Ruiz Herrera, Doralinda Gúzman de Peña y Juan José Peña Cabriales, Editores. IPN. México.
58. Rüttimann, J. C. and Lamar, R. (1996) Polymerization of pentaclorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes. *App. Environ. Microbiol.* **62**(10): 3890-3893.
59. Salcedo-Hernández, R. & Ruiz-Herrera, J (1993) *Exp. Mycol.* **17**:142-154.

60. Sariaslani, F. S. (1989) Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. Crit. Rev. Biotechnol. **9**:171-257.
61. Sorochinskii, V. V. and Kurganov, B. I. (1998) Biosensors for detecting organic compounds: II. sensors for carbohydrates and aromatic, heterocyclic, and other organic compound (review). Appl. Biochem. Microbiol. **34**(1):19-38.
62. Timberlake, W. E. (1990) Molecular genetics of *Aspergillus* development. Annu. Rev. Genet. **24**:5-36.
63. Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiol **140**:19-26.
64. Trinci, A. P. J. (1969) A kinetic study of the mode of growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. J. Gen. Microbiol. **57**: 11-24.
65. Trombly, J. (1995) Engineering enzymes for better bioremediation. Environ. Scienc. Technol. **29**(12): 560-564.
66. Ulloa, M. y Hanlin, R. (1978) Atlas de micología básica. Editorial Concepto, S. A. México.
67. Ulloa, M. (1991) Diccionario ilustrado de micología. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. México.
68. Viniegra-Gonzalez, G., Saucedo-Castaneda, G., Lopez- Isunza, F. & Favela-Torres, E. (1993) Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. Biotechnol. Bioeng. **42**: 1-10.
69. Wahleithner, J. A., Xu, F., Brown, K. M., Golightly, E. J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. and Schneider, P. (1996) The identification and characterization of four laccases from the pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Curr. Gen. **29**:395-403.

70. White, L. P. (1958) Melanin: a naturally occurring cation exchange material. *Nature* 4647:1427-1428.
71. Wieser, J. and Adams, T. (1995) *flbD* encodes a Myb-like DNA-binding protein that coordinates initiation of *Aspergillus nidulans* conidiophore development. *Genes. Develop.* 9:491-502.
72. Williamson, P. R. (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a lacase.
73. Wood, D. (1980) A: Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 117:327-338.
74. Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey M. W., Schneider, P. Halkier, T., Mondorf, K and Dalboge H. (1996) Purification characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:834-841.
75. Ye, X.S., Lee, S.L., Wolkow, T.D., McGuire, S.L., Hamer, J.E., Wood, G.C. and Osmani, S.A. (1999) Interaction between developmental and cell cycle regulators is required for morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 18(24): 6994-7001.