



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

C. B. I.

“CINÉTICA DE CRECIMIENTO
DE HONGOS FILAMENTOSOS”

Morfometría de los micelios de *A. niger* y *G. fujikuroi* y su posible utilización en la predicción de la tasa específica de crecimiento.

Tesis presentada para obtener el grado de Doctora en Ciencias por:

M. en I.Q. Claudia Patricia Larralde Corona.

Asesores:

Dr. Felipe López Isunza (Depto. Ing. Procesos e Hidráulica, DCBI)

Dr. Gustavo Viniegra González (Depto. Biotecnología, DCBS)

México D.F. a 28 de noviembre de 1996.

AGRADECIMIENTOS

Mil gracias a los revisores (y sinodales) de esta tesis:

Dr. Enrique Galindo F. (IBT, UNAM)

Dr. Leobardo Serrano C. (IBT, UNAM)

Dr. Jaime Ortega. (BIOTEC. BIOING., CINVESTAV)

Dr. Sergio Revah M. (IPH, UAM-I)

Dr. Gerardo Saucedo C. (BIOTEC., UAM-I)

Y un millón a mis asesores:

Dr. Felipe López Isunza.

Dr. Gustavo Viniegra González.



Durante la realización de este trabajo (3 años), se contó con el apoyo económico de CONACyT (becaria número 60107).



RESUMEN

Utilizando relaciones establecidas para la descripción del crecimiento microbiano y fúngico, se derivó una expresión que, utilizando los parámetros morfológicos de una hifa: longitud crítica (L_c) y diámetro (D_h); y los de la colonia: velocidad de extensión radial (u_r), longitud de sus hifas distales (L_{av}), predice satisfactoriamente el valor de la tasa específica de crecimiento (μ) de la biomasa. La expresión derivada fue la siguiente

$$\mu_{calc} = \frac{u_r}{\alpha L_{av}} \left(\frac{\ln 2}{\ln \left(\frac{L_c}{D_h} \right)} \right)$$

Se investigó el crecimiento, bajo diferentes condiciones nutricionales, de *Gibberella fujikuroi* en cultivo líquido, y de *Aspergillus niger* en cultivo superficial, para comparar dos mohos de diferente velocidad de crecimiento, cultivados en medios de diferente naturaleza. Esto con el fin de conocer el rango de validez de la expresión propuesta.

Para el crecimiento superficial de *A. niger*, se observó que, a menor concentración de glucosa, la longitud crítica (L_c) del túbulo germinal era mayor. El diámetro hifal (D_h) estuvo inversamente correlacionado con la concentración de glucosa, y la velocidad de extensión radial (u_r) tuvo un comportamiento parabólico, con un máximo a la concentración de glucosa de 120 g/L. Se encontró que el proceso de elongación sigue una cinética de saturación tipo Monod ($\mu_{max} = 0.30 \pm 0.035 h^{-1}$, $K_i = 132 \pm 52$ g/L).

La longitud crítica del túbulo germinal (L_c) fue menor que la longitud alcanzada por las hifas del borde de la colonia madura (L_{av}) por lo que se puede concluir que el volumen de citoplasma que contribuye al crecimiento en cada estadio es diferente, siendo mayor para el caso de la colonia madura.

El crecimiento en líquido de *G. fujikuroi* presentó una morfología filamentosa dispersa. La longitud crítica (L_c) mostró (al igual que con *A. niger*) valores crecientes a menor concentración de glucosa. Sin embargo, la velocidad de extensión radial fue la misma a las diferentes composiciones de medio utilizadas, y la longitud de las hifas distales (L_{av}) mayor a menor concentración de glucosa. El diámetro hifal (D_h) en cambio, fue mayor al aumentar la cantidad de glucosa del medio.

Los parámetros que describieron la tasa específica de crecimiento de los cultivos fueron: la velocidad de extensión radial (u_r), la longitud promedio de las hifas distales (L_{av}), la longitud crítica de ramificación (L_c), y el diámetro promedio de las hifas (D_h).

El hecho de que la expresión propuesta fuera adecuada para ambas clases de hongos, y para diferente tipo de medio, se interpretó como un indicio de que la derivación realizada tomaba en cuenta, efectivamente, los fenómenos que mejor describen el aumento de biomasa de un cultivo fúngico. Esto se corroboró por el hecho de que, aún y cuando los hongos elegidos presentaban comportamientos diferentes en su morfología, se predijo adecuadamente el valor de la tasa específica de crecimiento, para cada uno, y a diferentes condiciones nutricionales.

Este trabajo presenta una nueva metodología para cuantificar la tasa específica de crecimiento de cultivos fúngicos. Se basa en la determinación morfométrica de los micelios, durante la fase de germinación y el crecimiento vegetativo.

ÍNDICE

	página
Lista de figuras	i
Lista de tablas	ii
Nomenclatura	ii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1. Los hongos filamentosos en la biotecnología.	1
I.2. El género <i>Aspergillus</i> . Generalidades.	3
I.3. El género <i>Gibberella</i> . Generalidades.	4
I.4. Mecanismos generales del crecimiento de los mohos.	5
I.4.1. El ciclo de duplicación.	7
I.5. Crecimiento fúngico en medio sólido.	7
I.6. Crecimiento fúngico en medio líquido	8
I.7. Cuantificación del crecimiento fúngico. Revisión.	8
I.7.1. El análisis y procesamiento de Imágenes. Principios, alcances y limitaciones.	11
I.7.1.1. El procesamiento de imágenes en la biotecnología.	13
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.	17
II.1. Antecedentes experimentales del crecimiento fúngico en m. sólido.	17
II.1.1. Efecto de la concentración de glucosa.	18
II.1.2. Efecto de los metabolitos secundarios	18
II.1.3. Efecto de la actividad del agua (a_w) del medio.	18
II.2. Antecedentes experimentales del crecimiento fúngico en m. líquido.	19
II.2.1. Crecimiento fúngico durante la germinación.	20
II.2.2. Crecimiento fúngico en la etapa vegetativa.	21
II.2.2.1. Efecto del oxígeno disuelto.	21
II.2.2.2. Efecto de la concentración de glucosa.	21
II.2.2.3. Efecto de las sustancias iónicas.	22
II.3. Modelamiento matemático del crecimiento fúngico.	23
II.3.1. Modelos para crecimiento fúngico en medio sólido.	23
II.3.2. Modelos para crecimiento fúngico en medio líquido	26

CAPÍTULO III. OBJETIVOS.	31
Objetivo general.	33
Objetivos particulares.	33
Hipótesis.	33
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	35
IV.1. Los microorganismos. Conservación de las cepas.	35
IV.1.1. <i>Aspergillus niger</i> .	35
IV.1.2. <i>Gibberella fujikuroi</i> .	35
IV.2. Sistemas experimentales.	36
IV.3. Composición de los medios de cultivo.	36
IV.3.1. Medios para <i>Aspergillus niger</i> .	36
IV.3.2. Medios para <i>Gibberella fujikuroi</i> .	37
IV.4. El inóculo.	37
IV.4.1. Inóculo de <i>Aspergillus niger</i> .	37
IV.4.2. Inóculo de <i>Gibberella fujikuroi</i> .	38
IV.4.3. Inoculación en caja Petri.	38
IV.4.4. Inoculación en medio líquido.	39
IV.5. Cuantificación del peso seco	39
IV.6. Análisis de imágenes. Generalidades.	39
IV.6.1. Conservación de la muestra para el procesamiento de imágenes.	40
IV.6.2. Parámetros morfométricos de hifas individuales.	40
IV.6.3. Parámetros morfométricos de la colonia.	41
IV.7. Métodos de ajuste del modelo.	42
CAPÍTULO V. DESARROLLO TEÓRICO .	43
V.1. Modelo macroscópico de producción de biomasa.	43
V.2. Modelo microscópico de producción de biomasa.	45
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN . PRIMERA PARTE: CRECIMIENTO FÚNGICO SUPERFICIAL DE <i>Aspergillus niger</i>.	49
VI.1. Crecimiento fúngico colonial en medio sólido de agar.	49
VI.1.1. Velocidad de extensión radial (u_r).	49
VI.1.2. Longitud distal promedio (L_{av}) y longitud máxima (L_{max}).	52
VI.1.3. Elongación del túbulo germinal: longitud crítica promedio (L_c) y tasa específica de elongación (k_1).	53
VI.1.4. Diámetro hifal (D_h).	55

VI.1.5. Evolución de la biomasa: tasa específica de crecimiento (μ_{obs}).	56
VI.1.6. Predicción de la tasa esp. de crecimiento de la colonia (μ_{calc})	56
VI.1.7. Conclusiones del crecimiento fúngico superficial de <i>A. niger</i> .	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN . SEGUNDA PARTE: CRECIMIENTO FÚNGICO EN FORMA DISPERSA DE <i>Gibberella fujikuroi</i> .	59
VI.2. Crecimiento fúngico disperso en medio líquido.	59
VI.2.1. Velocidad de extensión radial (u_r).	59
VI.2.2. Diámetro hifal (D_h) y longitud distal (L_{av}).	59
VI.2.3. Longitud crítica (L_c) en sólido y líquido.	60
VI.2.4. Predicción de la tasa específica de crecimiento (μ_{obs}).	61
VI.2.5. Conclusiones del crecimiento fúngico disperso de <i>G. fujikuroi</i> .	62
CONCLUSION GENERAL .	63
RECOMENDACIONES .	65
BIBLIOGRAFÍA .	67
APÉNDICE: ARTÍCULOS PUBLICADOS .	73

LISTA DE FIGURAS

	página
I.1. Estructuras características de <i>Aspergillus niger</i>	4
I.2. Estructuras cracterísticas de <i>Gibberella fujikuroi</i>	5
I.3. Esquema simplificado de una hifa	6
I.4. Equipo típico para el procesamiento de imágenes	23
I.5. Morfologías fúngicas típicas en cultivo sumergido.	30
II.1. Parámetros cuantificados en los túbulos germinales	46
II.2. Mediciones realizadas en el borde de las colonias.	47
IV.1.1. Colonias de <i>A. niger</i> a las 96 horas, a varias conc. iniciales de glucosa.	56
IV.1.2. Efecto de la concentración de glucosa en la velocidad de extensión radial de <i>A. niger</i> .	56
IV.1.3. Curvas de elongación del tubo germinal de <i>A. niger</i> en agar.	60
IV.1.4. Evolución de la biomasa de colonias de <i>A. niger</i> a diferentes concentraciones de glucosa, con sus valores de m_{obs} obtenidos.	63
IV.1.5 Comparación tipo observado-predicho para la tasa específica de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en medio de caja Petri	64
IV.2.1 Comparación tipo observado-predicho para la tasa específica de crecimiento de <i>Gibberella fujikuroi</i> en cultivo líquido.	69

LISTA DE TABLAS

	página
I.1. Compuestos de importancia industrial producidos por mohos	2
IV.1.1. Variación de la velocidad de extensión radial (u_r) con la relación C/N y la concentración de nitrogenados (urea y sulfato de amonio).	57
IV.1.2. Parámetros morfométricos de las colonias de <i>A. niger</i> a dif. concentraciones iniciales de glucosa.	59
IV.1.3. Parámetros morfométricos del tubo germinal.	62
IV.2.1. Parámetros morfométricos de las colonias de <i>G. fujikuroi</i> , a diferentes mezclas de glucosa-almidón.	67
IV.2.2. Longitud crítica de las hifas de <i>G. fujikuroi</i> , en diferentes tipos de medio	68

NOMENCLATURA

D_h	Diámetro hifal, μm .
k_1	Tasa específica de elongación durante la germinación, h^{-1} .
k_2	Tasa específica de elongación de la colonia, h^{-1} .
K_i	Constante de inhibición, g/L .
K_{Ls}	Longitud de saturación, μm .
L	Longitud hifal, μm .
L_{av}	Longitud distal promedio, μm .
L_c	Longitud crítica del túbulo germinal al comenzar el proceso de ramificación, μm .
L_{max}	Longitud máxima de las hifas distales, μm .
L_0	Longitud hifal inicial, que coincide con D_h , μm .
N_t	Número de puntas de un micelio.
S	Concentración de glucosa, g/L .
S_0	Concentración inicial de glucosa, g/L .
u_r	Velocidad de extensión radial de la colonia, $\mu\text{m h}^{-1}$.
X	Concentración de biomasa, en $\text{mg}_{p.seco} \text{cm}^{-2}$ (cultivo superficial).
X_{max}	Concentración máxima de biomasa, $\text{mg}_{p.seco} \text{cm}^{-2}$.

Letras griegas

α	Relación de tasas específicas de elongación (k_2/k_1).
μ	Tasa específica de crecimiento, h^{-1} .
μ_{calc}	Tasa específica de crecimiento predicha con la expresión propuesta, h^{-1} .
μ_{max}	Tasa específica máxima de crecimiento, h^{-1} .
μ_{obs}	Tasa específica de crecimiento, calculada con la ecuación logística, h^{-1} .
τ	Tiempo característico de inicio del proceso de ramificación, h .

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los hongos constituyen un reino de la naturaleza, dado que presentan características únicas dentro de los seres vivos. Dentro de este grupo se tiene una amplia variedad de morfologías y nichos, ya que se agrupan especies muy diversas, desde el bien conocido champiñón (*Agaricus bisporus*), la popular levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), microscópica y ovoide, indispensable en la industria alcohólica y de panificación, hasta el micelio microscópico del moho productor de penicilina (*Penicillium chrysogenum*). La producción de penicilina por este hongo en los años 40's, marcó el inicio de lo que hoy conocemos como Tecnología de Fermentaciones, siendo este desarrollo tecnológico una piedra angular de la Biotecnología actual (Wainwright, 1992).

Antiguamente los hongos eran estudiados por los botánicos, siendo considerados, hasta mediados del siglo XIX, como pertenecientes al Reino Vegetal. Sin embargo, dado principalmente a que no tienen la característica de los vegetales de la autotrofia por fotosíntesis, fueron clasificados en un Reino separado, el Fungi. Según Herrera y Ulloa (1990) este Reino comprende las siguientes divisiones: Myxomycota (hongos mucilaginosos), Eumycota (hongos verdaderos) y Lichens (hongos simbioses). Dentro de los hongos verdaderos tenemos cuatro subdivisiones: Ficomycetos, Ascomycetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos (Fungi imperfecti). Esta última es generalmente designada como la de los hongos filamentosos, grupo de estructura prácticamente microscópica, que se caracteriza por formar un micelio bien desarrollado, septado y ramificado, generalmente multinucleado, y que se propaga mediante la producción asexual de conidios, que pueden tomar las formas más diversas. La importancia industrial, agrícola y médica de este grupo es, como se verá mas adelante, indiscutible.

I.1. Los hongos filamentosos en la biotecnología.

Los hongos filamentosos, designados más comúnmente como mohos, han sido de gran importancia en la vida del género humano a lo largo de su historia, inicialmente en la parte gastronómica y, a partir de este siglo, en la industria farmacéutica.

La variedad de compuestos bioquímicos sintetizados por los mohos es enorme, tal y como lo muestra, a manera de ejemplo, la Tabla I.1 (Wainwright, 1992).

Tabla I.1. Compuestos de importancia industrial producidos por mohos

<i>Organismos</i>	<i>Productos</i>
Antibióticos	
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cefalosporina C
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilina
<i>Fusidium coccineum</i>	Acido fusídico
<i>Penicillium sp.</i>	Griseofulvina
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina
<i>Helminthosporium siccans</i>	Sicanina
Ácidos orgánicos	
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico
<i>A. niger</i>	Ácido glucónico
<i>A. terreus</i>	Ácido itacónico
Enzimas	
<i>Aspergillus sp.</i>	Lipasa, pentosanasa,
<i>Aspergillus niger.</i>	proteasa, β -glucanasa,
	celulasa, glucoamilasa,
	glucosa oxidasa, lactasa,
	pectinasa.
<i>A. oryzae</i>	α -amilasa
<i>A. awamori</i>	Glucoamilasa
<i>Trichoderma sp</i>	Dextranasa, celulasa
<i>Penicillium sp.</i>	Dextranasa
<i>Mucor sp</i>	Renina
Alimentos tradicionales	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Miso
<i>Mucor, Rhizopus</i>	Ragi
Cultivos mixtos	Shoyu (salsa de soya)
Misceláneos	
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Giberelinas
<i>Gibberella zeae</i>	Zearalenona
<i>Claviceps sp.</i>	Alcaloides del ergot
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pululano
<i>Sclerotium sp.</i>	Escleroglucano

Aparte de las aplicaciones anteriormente mencionadas, los metabolitos de mohos tienen muchos otros usos conocidos, entre los que se incluyen, además de antibióticos, enzimas y ácidos orgánicos: la producción de micofungicidas por *Trichoderma sp.* y micoinsecticidas para el control biológico de plagas en el campo. En la industria papelera se sigue desarrollando la técnica del bioblanqueo de la pulpa y el tratamiento de los residuos lignocelulósicos utilizando *Trametes versicolor* y *Lentinus edodes*. En la industria minera, su aplicación incluye la solubilización del carbón de baja calidad o de mineral muy erosionado; la solubilización de minerales (biolixiviación) tales como: hierro, níquel y aluminio, utilizando cepas de *Penicillium* y *Aspergillus*, las cuales actúan produciendo ácidos orgánicos que facilitan la disolución del mineral. La bioacumulación de metales pesados, tales como el uranio, el cual

es adsorbido por el micelio de *Aspergillus ochraceus*, fijándolo de ésta manera en la fase sólida (biomasa), facilitándose su recuperación. El tratamiento de efluentes industriales que contengan herbicidas, cianuro, taninos, compuestos fenólicos, carbohidratos ó ácidos grasos (Wainwright, 1992).

I.2. El género *Aspergillus*. Generalidades.

El género *Aspergillus* pertenece a la familia Moniliaceae, orden Moniliales, Clase Hyphomycetes, Subdivisión Deuteromycotina, División Eumycota del Reino Fungi. Este género comprende unas doscientas especies y una gran cantidad de variedades, siendo un grupo heterogéneo de mohos que no tienen (o no se les ha encontrado) estadio sexual, llevándose a cabo su reproducción mediante la producción de conidios o esclerotias (Fig.I.1). Su talo es filamentoso, constituido por hifas septadas ramificadas, generalmente multinucleadas. Los septos están centralmente perforados, por lo que se puede dar la circulación del núcleo y del citoplasma de una célula a otra. Posee organelos tales como aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplásmico, lomasomas, ribosomas, aparato de Woronin, lisosomas, vacuolas y microtúbulos, todos ellos inmersos en el citoplasma (Laskin y Lechevalier, 1973).

Este género presenta una amplísima distribución geográfica, encontrándose ejemplos de sus miembros prácticamente en todo el mundo, desde la zona ártica hasta el ecuador (Herrera y Ulloa, 1990). Forman colonias algodonosas y secas, y pueden crecer en la superficie de una amplia variedad de sustratos (consecuencia lógica de la gran diversidad de enzimas que son capaces de producir extracelularmente). Generalmente, las condiciones necesarias para su crecimiento incluyen que el sustrato sea orgánico y que haya cierta humedad.

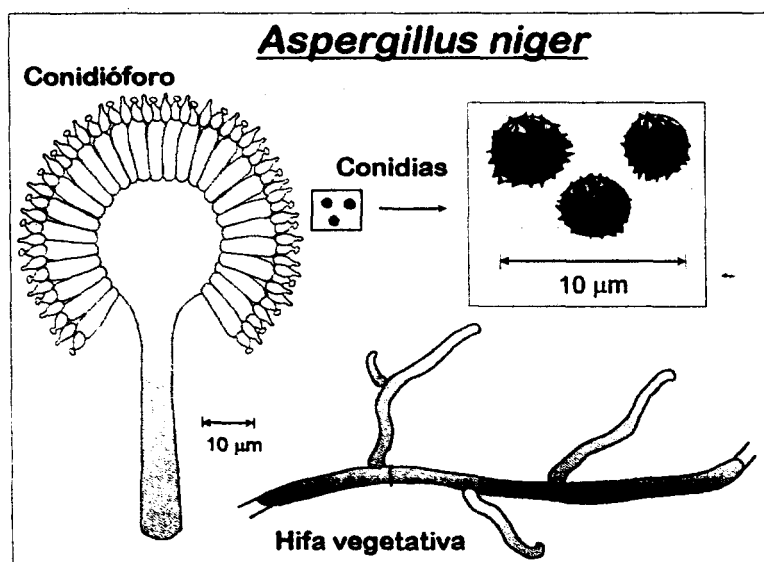
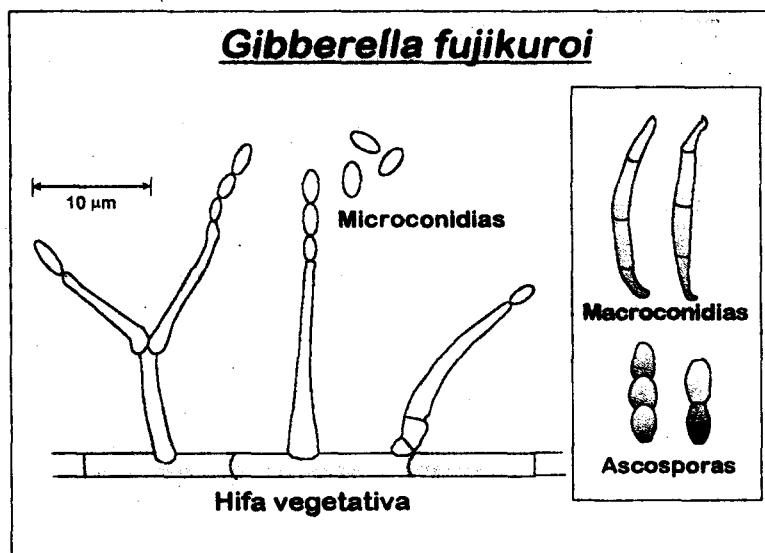


Fig.I.1. Estructuras características de *Aspergillus niger*.

Por su misma característica de invasividad, este género es multifacético, ya que puede ser, dependiendo del lugar de su presencia, desde una plaga molesta, y aún mortal, hasta un aliado de la industria farmacéutica y alimentaria. Considérese en primer lugar el papel de los *Aspergillus* en el deterioro de granos y alimentos almacenados y la producción de micotoxinas (que generalmente acompaña a esto). Un caso específico es el de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus ochraceus*, cuyas toxinas tienen efecto hepatotóxico y nefrotóxico. También hay que considerar la invasión fúngica a la que son sujetos el papel, cuero y tela, en las regiones húmedas del planeta. En contraste, del género *Aspergillus* se tienen los productos industriales, mencionados en la Tabla I.1, como son los antibióticos, las enzimas, ácidos orgánicos y alimentos tradicionales, los cuales son de indudable valor comercial y social.

I.3. El género *Gibberella*. Generalidades.

El género *Gibberella* pertenece al Orden Hypocreales, Clase Euascomycetes, Subdivisión Ascomycotina, División Eumycota del Reino Fungi. Es un género generalmente saprófito en el suelo y restos vegetales. *Gibberella fujikuroi* es la forma teleomorfa (con reproducción sexual) de *Fusarium moniliforme* (Fig. I.2), el cual es el que se usa industrialmente para la producción de giberelinas y ácido giberélico (Breton, 1985).



s

Fig. I.2. Estructuras características de *Gibberella fujikuroi*.

Las colonias de este moho varían del blanco al rosa salmón, que con el tiempo torna a violeta. El micelio aéreo es denso, de aspecto algodonoso ó polvoso, debido a la producción de microconidias. Los microconidióforos (20-30 x 2-3 mm) son no ramificados, formados a partir del micelio aéreo, con 1 a 3 fiálides simples elongadas. Las fiálides pueden producir dos tipos de conidias: microconidias (5-12 x 1.5-2.5 μm), fusiformes con pocos o ningún septo; o más raramente las macroconidias (25-60 x 2.5-4 μm).

mm) fusiformes, elongadas y multiseptadas. La forma teleomorfa produce peritecios globosos, violáceos ó azulados, blandos y ostrófados, los cuales se pueden formar superficialmente o dentro de un estroma carnoso. Las ascas son hialinas, cilíndricas a claviformes, y contienen de 4 a 8 ascosporas fusiformes (14-18 x 4.5-6 mm), mono o triseptadas (Samson *et al.*, 1981; Breton, 1985; Herrera y Ulloa, 1990).

I.4. Mecanismos generales del crecimiento de los mohos.

La unidad de crecimiento de los mohos es la *hifa*, la cual es una estructura tubular microscópica, de diámetro y longitud característicos, dependientes de la especie y las condiciones del medio. Presenta un crecimiento longitudinal, y que eventualmente produce ramificaciones (Peberdy, 1980). Axialmente la hifa puede ser dividida, según su composición citoplásmica de organelos, en 3 regiones principales: *apical*, *subapical* y *distal* (Fig.1.3).

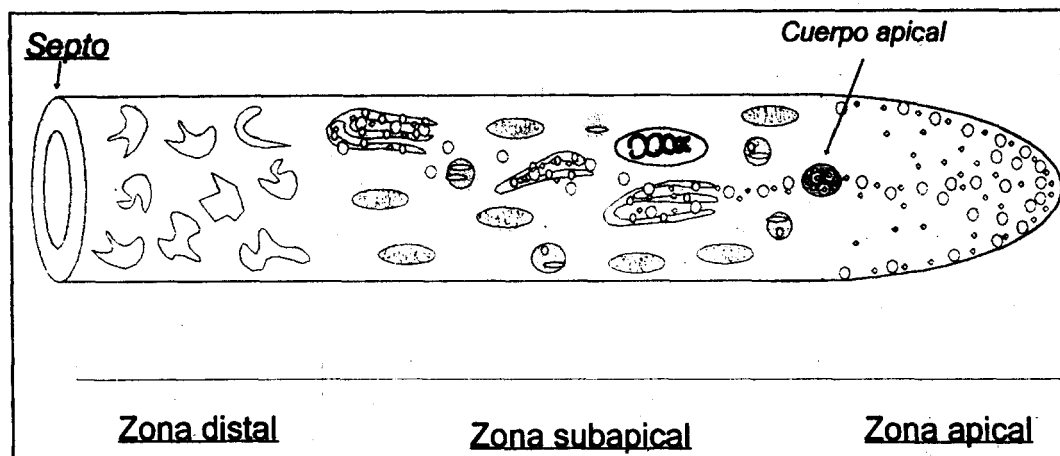


Fig.1.3. Esquema simplificado de una hifa .

Generalmente, ésta segmentación se da dentro de un compartimento, el cual es una porción de hifa delimitada por septos. En algunas especies, la aparición de un septo marca el inicio de una ramificación, aunque en un mismo compartimento pueden existir varias ramas.

En la región *apical* se pueden hallar ribosomas y vesículas, y es en esta zona donde se presenta el crecimiento (Wösten *et al.*, 1991), mediante el depósito focalizado de vesículas y microvesículas en la punta, de acuerdo con la Teoría Vesicular (Bartnicki-García, 1973), la cual propone el siguiente mecanismo: las enzimas líticas y los monómeros de quitina, necesarios para la síntesis de pared, son sintetizados y almacenados dentro de estructuras, denominadas vesículas y microvesículas, en la región subapical, y de ahí se transportan hacia la punta, donde se aglomeran en una región denominada *cuerpo apical* (*spitzenkörper*), de donde son distribuidas hacia la punta. Ahí la creación de nueva pared se lleva a cabo según el siguiente esquema: las vesículas, que contienen las enzimas líticas, llegan a la

pared plasmática de la punta, uniéndose a ella y liberando su contenido, lo que provoca una despolimerización de la pared en ciertas zonas, debilitándola y permitiendo que el citoplasma se expanda (debido al turgor de éste) y por consiguiente haya un ligero aumento de área superficial. Luego entran en acción las microvesículas, que contienen a las moléculas de quitina y las enzimas que las polimerizan, llenándose los espacios creados en la pared, produciéndose como resultado neto el aumento de área de pared.

Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que, también en la punta es donde se presenta la excreción de enzimas (Jaklitsch *et al.*, 1991), supuestamente gracias a que la pared celular es laxa en esta zona, lo que permite el paso de moléculas de gran tamaño (Peberdy, 1994).

Entre las numerosas dudas que aún faltan por resolver, se encuentra la cuestión de cómo es que las vesículas son transportadas, a través de la masa de los organelos, hasta la punta (Peberdy, 1980). Así, por definición, en la región apical se da el crecimiento longitudinal de la hifa. Es de hacer notar que, estudios químicos han revelado que el material depositado en la punta forma una pared flexible, pero a medida que ésta pasa a formar parte de la pared lateral se va rigidizando, y ésta velocidad de rigidización parece determinar el diámetro de la hifa. Así, una alta velocidad provocará un menor diámetro (Farkaš, 1990).

En la región subapical se encuentran casi todos los organelos característicos de las células eucariontes, tales como núcleo(s), ribosomas, mitocondrias y Aparato de Golgi. Esta es la zona donde prácticamente todo el metabolismo de síntesis de la hifa se lleva a cabo, y por consiguiente es también el lugar en el que se realiza la mayor absorción de nutrientes. Aquí se producen las enzimas y precursores que van a intervenir en la creación de nueva pared, siendo almacenados en estructuras denominadas vesículas y microvesículas. También hay evidencia de que, en ésta zona, se produce síntesis de nueva pared, aunque en mucho menor grado que en la zona apical. Esto fue demostrado con experimentos utilizando como marcadores radiactivos moléculas de glucosa ^{14}C y de N-acetilglucosamina ^{14}C y realizando la autorradiografía del micelio (Gooday, 1971).

La región distal es la zona más alejada de la punta, y se caracteriza por no contener organelos, solamente vacuolas en número y tamaño variable, dependiendo de la edad del micelio. En algunas especies incluso puede llegar a carecer de citoplasma, por lo que prácticamente se convierte en una región sin actividad metabólica, que va quedando vacía conforme avanza el citoplasma y es retenido por los septos, por lo que en realidad la hifa va semejando un plasmodio que avanza por un tubo (Smith, 1975). Generalmente en ésta zona se acumulan los materiales de reserva, como el glicerol, y los productos del metabolismo secundario, como en el caso de la penicilina (Thomas, 1992; Jüsten *et al.*, 1994).

I.4.1. El ciclo de duplicación.

Al igual que las bacterias, los mohos presentan un ciclo de crecimiento, definido por eventos citológicos, aunque la principal diferencia con respecto a los microorganismos unicelulares es que no ocurre la separación física de la unidad creada. Así se tiene que, después de la septación, el compartimiento apical se elonga hasta alcanzar un tamaño crítico, momento en el cual ocurre la división nuclear y se presenta una nueva septación. Una característica esencial del ciclo es que el volumen de citoplasma, en relación al contenido de ADN, se ha duplicado cuando se presenta la mitosis (Peberdy, 1980). El hecho de que las ramas dentro de un micelio generalmente no estén sincronizadas en sus ciclos de duplicación sugiere que, aún en las especies que presentan septos perforados, el retromezclado de citoplasma entre compartimentos es muy limitado.

La duplicación se presenta por primera vez después de la germinación de la conidiospora, la cual da origen a un túbulo germinativo, de dimensiones que dependen de la especie de la que proceda y de las condiciones del medio, pudiendo variar tanto la longitud como el diámetro de la hifa (Trinci, 1969). Al llegar el túbulo a una longitud característica, se completa el ciclo y el resultado es la formación de un septo, el cual dará lugar a que se origine una rama, la cual puede aparecer adyacente a un septo o en algún lugar de la pared lateral del segmento subapical o apical (Peberdy, 1980). Se cree que en el primer caso el septo actúa como barrera al flujo de vesículas, causando una acumulación de éstas, iniciándose de esta manera un nuevo foco de distribución (Trinci, 1974). Cuando la rama aparece en otro sitio se presume que se debe a una acumulación aleatoria de vesículas alrededor de ese punto (Bartnicki-García, 1973). También se puede observar que en algunas ocasiones la punta es la que sufre la ramificación, lo cual puede ser debido a que el flujo de vesículas es mayor a su tasa de utilización en la punta, creándose un punto de inserción adyacente al original.

En general, todos los modelos de crecimiento fúngico propuestos en la literatura se basan en la Teoría Vesicular para justificar sus suposiciones. Consideran que existe un segmento básico que se multiplica, acorde con la evidencia experimental vigente. Dada la complejidad y variabilidad de morfologías en los cultivos fúngicos, la gran mayoría de los modelos son no estructurados, es decir, consideran a la biomasa como una sola entidad promedio, aunque a últimas fechas, gracias al desarrollo mejores equipos de procesamiento de imágenes y avances en las técnicas analíticas y de microscopía, empiezan a aparecer un número creciente de modelos estructurados.

I.5. Crecimiento fúngico en medio sólido.

Por lo general en la naturaleza los hongos suelen crecer en sustratos más o menos sólidos, aireados y húmedos, lo cual los hace ideales como inóculo de procesos de fermentación sólida, en los que se busca que el micelio invada lo más extensamente posible la matriz del soporte. Este sistema ha sido utilizado,

de manera tradicional, en la obtención de algunos alimentos orientales (Hesseltine, 1972), y mas recientemente, en el composteo de desechos orgánicos (Pandey, 1992) para la obtención de abonos, y de sustratos para el cultivo de hongos comestibles (Derikx *et al.*, 1990).

Sin embargo, dado que la mayoría de los procesos, a escala industrial, contemplan el uso de la fermentación sumergida, la fermentación en medio sólido es un sistema relativamente menos estudiado, hecho que se refleja en el volumen de literatura publicada (Hesseltine, 1972).

El crecimiento fúngico en placas de agar ha sido abordado de manera importante por A.P.J. Trinci (1969, 1971, 1974; Fiddy y Trinci, 1975; Inch y Trinci, 1987; Robson *et al.* 1987), por lo que una revisión a sus publicaciones es de interés e importancia para comprender los mecanismos de crecimiento en éste sistema de cultivo. En general, este autor ha observado que, en condiciones de limitación de sustrato carbonado, los mohos tienden a formar hifas más largas, y un micelio de baja densidad, es decir, tienen menor frecuencia de ramificación.

I.6. Crecimiento fúngico en medio líquido.

Aunque depende del diseño del equipo, se supone que en medio líquido no se presentan gradientes de concentración de los sustratos, ya que se trata de un sistema que se mezcla continuamente, por lo que se pueden realizar estudios cinéticos en ausencia de los efectos del transporte de masa. Esto es especialmente válido durante la germinación, cuando la cantidad de biomasa presente es muy baja y las hifas pueden ser observadas de manera individual. También en esta etapa todavía no se presentan limitaciones nutricionales.

El crecimiento de los mohos en medio líquido puede presentar diversas morfologías, las cuales van a depender de numerosos factores, entre ellos: la cepa y su velocidad relativa de crecimiento en el medio utilizado. El crecimiento filamentos disperso se asocia generalmente a un comportamiento no Newtoniano del cultivo, mientras que con la formación de agregados de micelio compactos, se favorece el mezclado y aereación del medio, aunque la parte central de éstos generalmente sea inactiva, es decir, la productividad generalmente es más baja. El cultivo de mohos en medio líquido ha sido utilizado principalmente a escala industrial, en donde se han desarrollado los procesos de producción de penicilina y ácido cítrico, principalmente.

I.7. Cuantificación del crecimiento fúngico. Revisión.

La cuantificación de la biomasa de los mohos presenta algunas dificultades, debido a la estructura que adoptan al crecer, tanto en medio líquido (donde tienden a formar agregados, que dificultan el muestreo); como en medio sólido, donde, dependiendo del tipo de sistema, a veces la separación del

micelio de la matriz del sustrato es prácticamente imposible.

Para la detección de la biomasa fúngica se han utilizado diversas metodologías, casi todas creadas a partir de una necesidad específica, por lo que no siempre la técnica más precisa es la aplicable (Boyle y Kropp, 1992). Se han utilizado diversos enfoques para resolver el problema, los cuales se pueden clasificar en los siguientes grupos: *químico*, *enzimático*, *gravimétrico* y *óptico* (donde se incluye al análisis de imágenes), aunque no es raro encontrar que algunas de las técnicas implican al menos dos de los enfoques para tener un patrón de comparación.

Dentro de las metodologías *químicas* se encuentra la de Frankland *et al.* (1978) en la cual cuantifican la hexosamina, que se produce al hidrolizar la quitina presente en la pared celular de *Mycena spp.* Comparan ésta técnica con la de la película de agar, la cual es una técnica *óptica*, que consiste en medir el radio y la densidad relativa de las hifas, que se encuentran en suspensión en una película de agar de volumen conocido. Encuentran que la técnica de hexosamina es recomendable para monocultivos, mientras que la de película de agar es adecuada para mezclas de microorganismos. Una de las limitaciones del método de la determinación de hexosamina es que, se sabe que el micelio presenta diferentes proporciones de quitina, según su estado fisiológico, por lo que no se puede utilizar siempre el mismo factor de conversión (Hepper, 1977).

Otra sustancia que algunos hongos sintetizan es el ergosterol, por lo que la cuantificación de éste es de utilidad cuando existe la presencia de otros microorganismos que, por ejemplo, podrían influenciar los resultados si se determinara el ATP (Suberkropp *et al.*, 1993). Schnürer (1993) cuantificó el ergosterol de *Fusarium culmorum*, *Penicillium rugulosum* y *Rhizopus stolonifer*, encontrando que éste sigue la misma tendencia que la longitud hifal total para los tres mohos, la cual resultó tener un peso de 4.2 mg/m de micelio, para *P. rugulosum*. Un problema con el factor de conversión se presenta al envejecer el micelio, pues se incrementa la concentración de ergosterol, dado que el proceso de vacuolización conlleva una reducción en el peso por unidad de longitud, aumentando la relación ergosterol/biomasa.

Otra de las sustancias que dan una idea de la biomasa producida es el CO₂, el cual puede correlacionarse con el micelio producido, por ejemplo, en un sistema cerrado de columna empacada con un medio sólido (Auria *et al.*, 1993). En éste tipo de sistema se puede también monitorear el cambio en la caída de presión del lecho, la cual también es un indicativo de la fase del crecimiento en la que se encuentra el cultivo fúngico (Auria *et al.*, 1995), constituyendo éste último método una forma física de evaluar el crecimiento fúngico.

Dentro de las metodologías *enzimáticas* se tiene la de Söderström (1977), la cual se basa en la

hidrólisis (mediada por proteinasas y esterasas), del diacetato de fluoresceína (FDA) el cual fluoresce durante 30 segundos (una de las limitantes del método). Dado que este colorante tiñe únicamente el micelio metabólicamente activo, puede correlacionar la intensidad de tinción con las tasas de crecimiento y de respiración, para *Saccharomyces cerevisiae* y *Mortierella ramanniana*. Para la adecuada utilización de ésta técnica, el cuidado en el manejo de la muestra es vital para evitar dañar al micelio (Söderström, 1979).

Boyle y Kropp (1992) también utilizaron el ensayo de FDA, con *Lentinula edodes*, *Pleurotus sajor-caju* y *Flammulina velutipes*, creciéndolos en dos tipos de medio (líquido y "slurry"), comparando los resultados con las pruebas químicas del contenido de quitina y de proteína (método de Bradford). Encontraron que, el ensayo de FDA es el que presenta menor variabilidad, detecta concentraciones más bajas y es el más sencillo de realizar, esto en un medio con astillas tipo "slurry". En medio líquido se presentó el problema de que la actividad de hidrólisis del diacetato, la proteína y la quitina no mantenían una relación constante con el peso seco del micelio, observándose que algunos hongos podían disminuir su contenido de proteína celular cuando el medio tenía una baja concentración de nitrógeno, por lo que el ensayo de proteína no era confiable. En este medio el mejor ensayo resultó ser el de quitina.

La cuantificación de biomasa mediante su peso seco, es la técnica *gravimétrica* por definición. Ésta consiste en filtrar un volumen conocido de muestra a través de una membrana, previamente puesta a peso constante, ponerla a desecar, para después pesarla y, por diferencia, encontrar el peso de la muestra. El problema con esta técnica es que, para que sea confiable, se debe asegurar que la única contribución al peso sea debida a la biomasa, es decir, que el medio sea totalmente soluble y no existan partículas suspendidas. Para el caso de fermentación sólida, donde el micelio y el sustrato están mezclados es obvio que ésta técnica es, generalmente, de poca utilidad.

Las técnicas *ópticas* se consideran a aquellas que reportan un cambio en forma, número de elementos ó color de la muestra. La técnica *óptica* más conocida es el conteo de las unidades formadoras de colonias (CFU), la cual viene a ser efectivamente un método cuantitativo, que sin embargo, tiene algunas limitaciones importantes en los cultivos fúngicos, dado que su validez parece estar justificada solamente en el caso de especies no esporuladas (Schnürer, 1993), ó cuando se tiene micelio vegetativo disperso (Hosobuchi et al., 1993a).

Otra técnica de principio *óptico* es la espectrofotometría. Este principio fue utilizado por Ramana Murthy et al. (1993) para monitorear el cambio de la biomasa de *Aspergillus niger* en un sustrato sólido (salvado de trigo), mediante la reflectancia de la muestra, es decir, obteniendo el

conjunto de números que describen la naturaleza y magnitud de la diferencia de color, entre la muestra y un estándar (generalización tricromática). Los autores encuentran una buena correlación entre la diferencia de color y la concentración de biomasa, trabajando con patrones de biomasa de concentraciones en el rango de 4 al 20 % en peso seco.

El desarrollo de aditamentos para el microscopio, capaces de proyectar o capturar la imagen en una escala macro, promovió la inquietud de cuantificar las imágenes. Las primeras técnicas desarrolladas consistieron en proyectar el campo del microscopio en un papel, donde podía ser copiado a mano, para después medirlo con un escalímetro (Sundman y Sivelä, 1978). El uso de la fotografía permite mejorar éste procedimiento, aún y cuando las mediciones siguen siendo manuales, tal y como lo muestra el trabajo de Trinci (1969) quien fotografió la fase de germinación y la periferia de colonias de *Aspergillus nidulans* bajo el microscopio, realizando las mediciones sobre la proyección de las diapositivas obtenidas.

En los últimos quince años se ha desarrollado la técnica del *Procesamiento de Imágenes* en la cual se utiliza una cámara de video para capturar la imagen (Thomas, 1992), y con una computadora se realiza la digitalización necesaria para cuantificar los diferentes campos de ésta (Fig. I.4). En la siguiente sección se amplía éste tema, dada su importancia en el desarrollo de esta tesis.

I.7.1. El análisis y procesamiento de imágenes. Principios, alcances y limitaciones.

De manera general, analizar una imagen significa extraer información de ésta, mediante una computadora (Thomas, 1992). En forma más específica, es una serie de funciones computacionales que se realizan sobre una imagen digitalizada para capturarla, mejorarla y cuantificarla.

El equipo que se emplea para llevar a cabo esta técnica comprende: una cámara de circuito cerrado, conectada al microscopio (en su caso), de donde se capta la imagen, enviándola a una computadora, que cuenta con el programa (software) necesario para digitalizar la señal y realizar operaciones sobre ella; por último, es deseable contar con un dispositivo de salida (generalmente una impresora). En la Figura I.4. se esquematiza el equipo que se utiliza comúnmente para realizar esta técnica.

A continuación se hace una breve descripción del funcionamiento de un equipo de procesamiento típico, tomada de la interesante revisión realizada por Caldwell *et al.* (1992).

El corazón de un procesador de imágenes es el programa, el cual debe tener la capacidad de realizar las siguientes funciones:

- **Adquisición:** la imagen analógica, capturada con la cámara de video, es convertida por la computadora en una imagen digitalizada, lo que significa transformarla en una matriz de puntos (píxeles), con un nivel asignado dentro del rango de tonos de gris para cada uno. El tono va de negro (0) a blanco (255). La pantalla está definida para capturar un campo de 512 x 512 píxeles. Generalmente donde se pierde resolución de la imagen es cuando pasa por la cámara de video, la cual tiene menor capacidad de resolución, por lo que es muy importante la adecuada selección de ésta. La medición suele ser más precisa si se utilizan bajas resoluciones e imágenes de campo oscuro.
- **Mejoramiento:** se pueden hacer una serie de operaciones matemáticas para mejorar la resolución de la imagen, o resaltar la característica que se desea medir. Entre las operaciones más comunes se encuentran: modificar (normalizar) el rango de la distribución de tonos de gris, filtros (funciones: mediana, no-lineal, gaussiana, laplaciano, de gradiente), erosión y dilatación de los contornos.
- **Segmentación:** se realiza la discriminación y selección del rango de tonos de gris en donde se encuentra la característica que se desea cuantificar de la imagen. Esto se puede hacer manualmente, o utilizar un modelo probabilístico, realizándose para ello un análisis del histograma de tonos de gris de la imagen. Otro método comúnmente utilizado es el de sustraer a la imagen de interés la imagen original o ideal (visualización diferencial). También puede utilizarse pseudocolor, el cual es más fácilmente discernible por el ojo humano que los tonos de gris. Este método es especialmente útil cuando, ligeros cambios en el tono de gris significan un cambio importante en algún parámetro biológico, como por ejemplo, en el uso de sondas fluorescentes sensibles a cambios de pH o de potencial redox. Otra opción es utilizar una cámara de video a color (Durant *et al.*, 1994; Vanhoutte *et al.*, 1995).
- **Medición:** en un equipo convencional de análisis, la imagen obtenida está en dos dimensiones (2-D), por lo que esto limita a una y dos dimensiones lo cuantificable, esto es, centros de gravedad, longitudes y áreas. Las mediciones más comunes son: número de objetos, largo, ancho, área, diámetro, circularidad y tono de gris promedio, además de parámetros que surgen de la combinación de los anteriores.
- **Salida de datos:** el aparato que se puede utilizar depende del uso posterior que se le vaya a dar a los datos. Lo más común es contar con una impresora, también se puede generar un archivo y almacenarlo en diskette ó en video-cinta.

Una de las limitaciones de esta técnica es que trabaja en dos dimensiones, siendo que la realidad generalmente se encuentra en tres, por lo que se pierde información al pasar por la cámara de video.

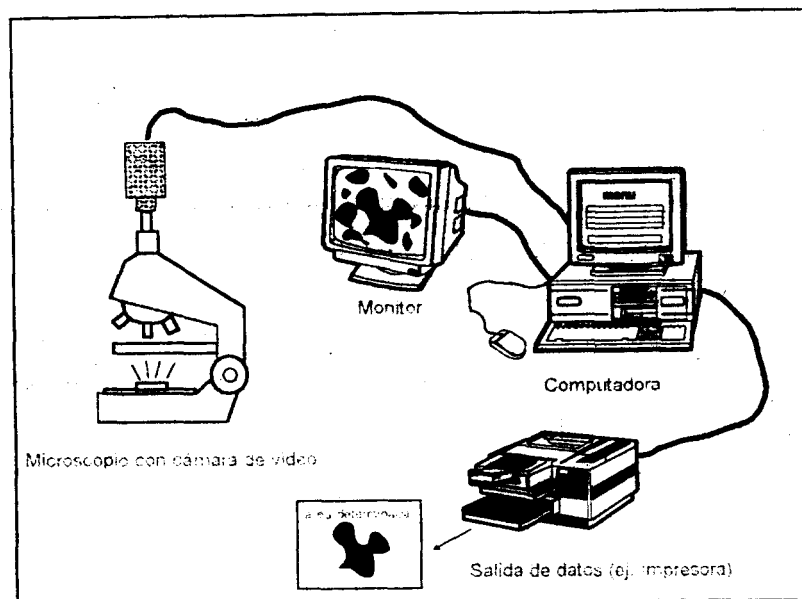


Figura I.4. Equipo típico para el procesamiento de imágenes.

El procesamiento de imágenes en 3-D necesita el generar una imagen de $512 \times 512 \times 512$ píxeles, lo que aumenta los requerimientos de cómputo enormemente, trabajándose en este caso en voxeles, que requieren una memoria RAM de alrededor de 135 Mbites para su almacenamiento (Caldwell *et al.*, 1992). También el número de operaciones se incrementa en esta proporción. Por ejemplo, para medir el diámetro promedio de un objeto en 2D se trazan 32 líneas, y se saca el promedio. Para hacer lo mismo en 3-D se trazan 1024 líneas. El avance más reciente a este respecto es el desarrollo de la "microscopía láser confocal", la cual consiste en utilizar un rayo láser para iluminar la muestra, y la señal es procesada por un detector, que selecciona solamente los focos de luz, eliminándose la luz desviada, con lo cual se genera una imagen clara, equivalente a una rebanada del objeto, de aproximadamente $0.2 \mu\text{m}$ de espesor, dependiendo de los lentes utilizados y el tamaño del orificio por donde se canaliza la luz (*pinhole*). La imagen obtenida está en 2-D, pero se convierte a 3-D si se reconstruye digitalmente el objeto, con las imágenes enfocadas a diferentes niveles.

I.7.1.1. El procesamiento de imágenes en la biotecnología.

Los usos más comunes del procesamiento de imágenes, con aplicaciones biotecnológicas, han sido los siguientes: conteo de microorganismos en superficies; la estimación de biovolumen utilizando las suposiciones adecuadas de esféricidad; la estimación de características morfométricas para distinguir entre especies de bacterias; el conteo automático de placas; el seguimiento de colonias bacterianas y fúngicas y la visualización de las respuestas microbianas a gradientes físico-químicos. Casi todos los trabajos han sido realizados cuantificando el cambio de área de la muestra. Si las células crecen en monocapa este cambio puede ser relacionado directamente con la tasa de crecimiento.

Desafortunadamente, rara vez es éste el caso (Caldwell *et al.*, 1992).

El análisis de imágenes está siendo utilizado ampliamente en el seguimiento del crecimiento microbiano. Un ejemplo lo constituye el trabajo de Matzuoka *et al.* (1990) los cuales monitorearon (en línea) el efecto de compuestos volátiles sobre la cinética de elongación de varios mohos. Realizan sus experimentos sobre una colonia que crece dentro de una botella de cultivo, con una delgada capa de agar. Los autores seleccionaban una hifa aérea y, después de comprobar que se encontraba en la fase de crecimiento lineal, introducían un compuesto volátil a la fase gaseosa, para ver su efecto sobre la elongación. Los resultados, aunque cualitativos, permitieron comprobar, de manera rápida, el efecto de ciertos compuestos sobre el crecimiento fúngico, teniéndose así una manera práctica de clasificar fungistáticos y fungicidas, según la observación de si se reestablece o no el proceso de elongación apical.

Inbar y Chet (1991) cuantificaron la actividad quitinolítica de bacterias que colonizan las raíces del algodón, colocándolas sobre una placa de agar que contenía el sustrato. Encuentran que existe una correlación positiva entre el logaritmo del número de bacterias, medido por dilución en placa, con el área de sustrato decolorada, revelada con Rojo Congo.

Packer *et al.* (1992) calcularon el volumen celular y la biomasa promedio de cultivos de *Penicillium chrysogenum*, basándose en la cuantificación del área total del micelio, el área de la región citoplásmica y el diámetro hifal promedio, mediante la metodología automática desarrollada por Packer y Thomas (1990). Encontraron que el método es confiable en el rango de concentración de biomasa de 0.03 a 38 g/L, aún con la presencia de sólidos suspendidos en concentraciones mayores de 30 g/L, siendo ésta última característica una ventaja sobre los métodos de cuantificación tradicionales, que suelen requerir un sobrenadante limpio. El grupo de Thomas continúa actualmente su trabajo de buscar aplicación práctica del análisis de imagen automatizado, y sugieren que puede ser utilizado para verificar la viabilidad de un inóculo de esporas (Paul *et al.*, 1993), siguiendo en forma estadística el cambio del hinchamiento (volumen de las esporas), formación del túbulo germinativo y la cinética de elongación de éste, en respuesta a diferentes composiciones del medio de cultivo.

Willaert y Baron (1993) estudiaron en línea la cinética de crecimiento de levaduras inmovilizadas en gel de alginato de calcio, en un microrreactor acoplado al microscopio. Logran monitorear el cambio de una microcolonia que crece en forma esférica, por lo que, al ajustar los datos con un modelo de fracción de volumen celular del tipo raíz cúbica, y en base a los datos de crecimiento y cálculos de difusividad, concluyen que, a esa escala, no se presentan limitaciones internas en la transferencia de masa dentro de la colonia, dado que su cinética es idéntica a la de células en crecimiento libre.

Surh *et al.* (1995), utilizando un analizador de imágenes en 3-D, monitorearon en línea la concentración de levaduras dentro de un fermentador, dado que el microscopio (láser cofocal) se fijó a una de las paredes del reactor. Para hacer el cálculo de concentración de células, se basaron en la reconstrucción de las imágenes adquiridas a diferentes alturas de enfoque.

Vanhoutte *et al.* (1995) clasificaron el micelio de *P. chrysogenum* en 6 zonas, según su nivel de actividad metabólica, utilizando para ello técnicas de tinción diferencial, y el procesamiento de imágenes a color. Esto representa un avance en el planteamiento de modelos de crecimiento estructurados, donde solamente ciertas partes del micelio están asociadas a la producción de metabolitos.

El análisis químico de superficies es posible mediante la detección de gradientes de coloración, técnica que ha sido empleada en el monitoreo del crecimiento fúngico por Olsson (1994), quien cuantificó las concentraciones de glucosa, fósforo y biomasa de *Fusarium oxysporum* en caja Petri. Mediante el uso de una membrana de celofán podía retirar la biomasa fácilmente, y revelar el agar. Midiendo la luz transmitida y la reflejada por la colonia, encontró que ésta última era proporcional al peso seco de la biomasa. Observó que, a bajas concentraciones de glucosa (trabajó en el rango de 1.5 a 6 g/L) la concentración de biomasa es mayor en el borde que en el centro de la colonia; a concentración intermedia, la biomasa está distribuida de manera uniforme, con una ligera disminución en el centro. A alta concentración de glucosa, el borde y el centro tienen menos biomasa que la región intermedia. Sin embargo, los perfiles de consumo de glucosa y fósforo fueron los mismos para todos los niveles probados, lo que le hace suponer que las hifas del borde de la colonia (distales) consumen el exceso y lo traslocan hacia la región central, tal y como lo demuestran las imágenes a alta concentración de sustrato.

Los trabajos presentados anteriormente son representativos de los usos que se le han dado a la técnica de análisis y procesamiento de imágenes para el monitoreo del crecimiento fúngico, y seguramente en el futuro serán ideados muchos más diseños experimentales utilizando este tipo de herramienta.



CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

A continuación se presenta una revisión de los resultados experimentales, y los modelos, que han sido propuestos en la literatura para describir el crecimiento filamentoso, tanto a nivel individual como en colonia, clasificándolos para éste efecto según el medio en que fueron probados.

II.1. Antecedentes experimentales del crecimiento fúngico en medio sólido.

Una colonia microbiana, que crece sobre una placa de agar, establece una serie de características que han sido descritas por Pirt (1967), las cuales son las siguientes:

- Las células pueden crecer con la tasa exponencial máxima, siempre y cuando las concentraciones de nutrientes permanezcan muy por arriba de las constantes de saturación, y no se desarrolle ninguna condición inhibitoria del crecimiento.
- Pueden formarse gradientes de concentración de nutrientes debajo de la colonia.
- Eventualmente la concentración de algún nutriente limitante puede caer a cero debajo del centro de la colonia, provocando que las células centrales dejen de crecer.
- El crecimiento radial de la colonia pudiera estar restringido a un anillo exterior, cuyo ancho puede permanecer constante, siendo ésto determinado por el balance entre el consumo y la difusión de nutrientes hacia la zona en crecimiento.
- Una vez establecido un ancho constante para el anillo exterior de crecimiento, la colonia puede establecer una tasa lineal de expansión de su radio.

Estos postulados fueron verificados experimentalmente para mohos por Trinci (1974). En uno de sus primeros trabajos Trinci (1969) concluyó que la cinética colonial era idéntica a la de la hifa sin ramificar, esto es, que presenta las mismas fases: de retardo (lag), exponencial (log), desaceleración y lineal. Encontró que una disminución en la velocidad de extensión radial (llamada por él K_r) esta correlacionada con el aumento en la densidad hifal, y que la temperatura afecta el valor de esta velocidad.

Trinci (1971) también propuso el uso de la velocidad de extensión radial (K_r) como un

parámetro de cuantificación del crecimiento superficial de una colonia fúngica, ya que le permitió calcular la tasa específica de crecimiento fúngico mediante la expresión siguiente: $K_r = w \mu$, para lo cual realizó experimentos cortando el borde de la colonia hasta encontrar la longitud mínima de corte (w), a partir de la cual el borde de la colonia sigue creciendo después del corte, debido a que, a partir de esa longitud, no se pierde el citoplasma del anillo en crecimiento. Para encontrar K_r , midió el cambio en el diámetro de la colonia durante un cierto período de días. El autor indica que esta técnica para estimar μ es confiable, siempre y cuando no varíe el ancho del anillo exterior de crecimiento (w) durante los experimentos.

II.1.1 Efecto de la concentración de glucosa.

Fiddy y Trinci (1975) al observar el crecimiento de colonias de *Geotricum candidum* y *Neurospora crassa*, encontraron que, la velocidad de extensión radial (K_r) disminuía a concentraciones de glucosa bajas, observándose en general que, en el rango de 20 a 100 mg/L de glucosa, existe una relación lineal entre K_r y el logaritmo de la concentración de sustrato. En este trabajo los autores también calcularon el valor de la constante de afinidad del micelio por la glucosa (K_s) encontrando que los valores obtenidos para medio sólido eran más altos (1440 mg/L) que los presentados en medio líquido (2 mg/L), lo cual indica una resistencia difusional mayor en medio sólido, lo cual provocaría que la concentración de sustrato en la pared de la hifa fuera diferente (menor) a la del seno del medio.

II.1.2. Efecto de metabolitos secundarios.

La presencia de metabolitos secundarios o productos autolíticos pueden influenciar la extensión del anillo exterior de crecimiento. Tal es el caso de la producción de penicilina por *Rhizoctonia cerealis* estudiada por Robson et al. (1987), los que observaron que este producto se difunde más allá del borde de la colonia, afectando la tasa de extensión radial, aún cuando todavía quedan nutrientes en esa zona. La concentración de penicilina siempre fue mayor en el centro, donde el crecimiento cesa al desaparecer la glucosa en esta zona. A tiempos largos, la penicilina era consumida por la colonia.

II.1.3. Efecto de la actividad del agua (a_w) del medio.

Una de las características del medio sólido es su actividad de agua (a_w) variable, generalmente menor a 1.0, lo que ocasiona que el micelio se vea sometido a estrés osmótico, por lo que éste ha sido un parámetro de importancia en el estudio de la cinética de crecimiento fúngico. Este aspecto ha sido abordado en el trabajo de Inch y Trinci (1987), en el cual ajustaron la actividad de agua de los medios con polietilenglicol, encontrando como resultados que la tasa de rendimiento de la biomasa de *Paecilomyces farinosus* disminuía al bajar a_w , lo cual expresa que la energía de mantenimiento del micelio aumentaba. También observaron que existe una relación similar entre la tasa específica de crecimiento (μ) en medio líquido y la tasa de extensión radial (K_r) en medio sólido, como función de a_w .

Gervais *et al.* (1988) realizaron experimentos en agar con *T. viride* TS y *P. roqueforti*, disminuyendo la actividad de agua con glicerol para ver su efecto sobre la velocidad de extensión radial. Utilizando valores de a_w de 0.86 a 1.0, encontraron que la tasa de extensión radial presenta un óptimo para ambas cepas, siendo 0.99 la de *T. viride* y 0.97 la de *P. roqueforti*, y que, fuera de éstos valores, se observa un fuerte efecto negativo sobre este parámetro.

Oriol *et al.* (1988) también estudiaron el efecto de a_w sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y, al igual que en el trabajo anterior, concluyeron que éste es un factor muy importante en la fermentación en estado sólido, encontrando que la tasa específica de crecimiento se ve reducida de manera importante al disminuir el valor de a_w en el rango de 0.98 a 0.91, presentándose a la vez un comportamiento inverso en el tiempo de germinación. Estos autores concluyeron que la limitación del crecimiento fúngico que se observa en muchos de los procesos de fermentación sólida es debida a problemas en la disponibilidad del agua, aunque no hay que perder de vista también la variable de densidad de empaque, que afecta el arreglo tridimensional del cultivo y la transferencia de masa intrapartícula.

Así, tenemos que el cultivo de hongos filamentosos en una matriz sólida ha sido estudiado principalmente en el sistema modelo de placa de agar, dado que la observación del crecimiento en un soporte tridimensional implica casi invariablemente la destrucción de la muestra, además de ser metodológicamente imposible en muchos sistemas por la heterogeneidad del sustrato.

II.2. Antecedentes experimentales del crecimiento fúngico en medio líquido.

A tiempos largos (generalmente más de 3 días), los cultivos fúngicos presentan el problema de comportamiento no Newtoniano, estableciéndose una suspensión pseudoplástica (Lee y Rho, 1994), lo cual dificulta la transferencia de oxígeno y la agitación de manera considerable. Esto es especialmente acentuado cuando el micelio se desarrolla en forma filamentosa, ya que tiende a formar largas madejas de biomasa que se enredan en el impulsor, mamparas y sondas, creándose así heterogeneidades dentro del reactor, lo cual va a provocar una disminución de la productividad del sistema. A este respecto una de las soluciones propuestas (Nienow, 1990) es el utilizar diferentes configuraciones del impulsor, más adecuados para las características morfológicas de los micelios.

Una forma de disminuir estos problemas es el favorecer la formación de agregados fúngicos esféricos, denominados comúnmente *pellets*, los cuales presentan un núcleo de formación y un diámetro que puede ir de 50 a 5000 μm . Si bien se ha demostrado que, generalmente, el núcleo de un *pellet* es una zona inactiva y aún lisada, la formación de estas estructuras está asociada a un comportamiento Newtoniano del medio y a un adecuado nivel de oxígeno disuelto, por lo cual es

recomendable su presencia en muchos de los procesos aerobios a escala industrial.

La germinación es la etapa del crecimiento fúngico más estudiada, dado que es la más sencilla de visualizar. En contraste, la determinación gravimétrica o química de biomasa en ésta etapa es muchas veces imposible, dado el bajo peso de las esporas y los túbulos germinales.

Se ha observado que la hifa, si bien varía en el valor de sus dimensiones características, sigue el mismo mecanismo de crecimiento en medios líquido y sólido, pudiéndose proponer mecanismos de crecimiento globales, como el de Katz *et al.* (1972) quienes presentan un esquema general de elongación y ramificación hifal, que comprende los siguientes tres puntos:

- En hifas cortas, la tasa de elongación apical es proporcional a la longitud de la hifa y a la tasa específica de crecimiento.
- Cada punta en crecimiento puede extenderse a una tasa que varía entre un valor bajo y un máximo, característico del organismo e independiente de la tasa de crecimiento.
- Un nuevo punto de crecimiento se forma cuando la capacidad de elongación de la hifa supera a la de las puntas existentes.

Katz *et al.* (1972) también observaron que, al aumentar la tasa de crecimiento, crece el número de ramas por unidad de hifa, esto es, la frecuencia de ramificación (Φ) es proporcional a la tasa específica de crecimiento (μ). Este resultado parece ser dependiente de la especie y el tipo de medio utilizado, ya que ha sido observado el comportamiento contrario en algunos casos (Wiebe y Trinci, 1991). Por ello es recomendable tener precaución al comparar la literatura. Ésto también se aplica en cuanto al tipo de sistema que se está utilizando, puesto que el comportamiento es diferente según si se trata de un sistema por lotes o continuo.

II.2.1. Crecimiento fúngico durante la germinación.

Uno de los primeros trabajos en el que se aborda el proceso de elongación del tubo germinal es el de Smith en la década de los 20's (citado por Prosser (1991)) en el que menciona que esta etapa sigue una cinética de primer orden. Esta observación es válida tanto para medio líquido como para sólido y ha sido corroborada por otros autores, como Trinci (1969) y Larralde Corona (1992).

Varios investigadores han utilizado micro-cámaras de cultivo que pueden ser colocadas bajo el microscopio para seguir (sin perturbaciones) el crecimiento de la hifa. Uno de estos trabajos es el de

Reichl *et al.* (1990), los cuales, utilizando a *Streptomyces tendae*, monitorearon el cambio en la longitud hifal y el número de puntas durante las primeras siete horas del proceso, en una cámara enchaquetada de 2 mL de volumen. Encontraron que la longitud total del micelio se incrementa exponencialmente con el tiempo, a una tasa específica de elongación de 0.66 h^{-1} , y que el proceso de ramificación también es exponencial, con una tasa de $0.044 \text{ mm}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

II.2.2 Crecimiento fúngico en la etapa vegetativa.

El crecimiento de los micelios, en cultivo sumergido, ha sido investigado principalmente en sistemas por lote (Trinci, 1969; Steele y Trinci, 1975; Trinci y Saunders, 1977; Inch y Trinci, 1987; Wiebe *et al.*, 1990), aunque también se pueden hallar trabajos en quimiostato (Carter y Bull, 1971; Fiddy y Trinci, 1975; Wiebe y Trinci, 1991; Olsvik y Kristiansen, 1992), sistema difícil de establecer con cultivos fúngicos dada la heterogeneidad de la suspensión que se presenta después de un par de días de fermentación.

II.2.2.1. Efecto del oxígeno disuelto.

En experimentos en quimiostato, Carter y Bull (1971) observaron que, a una baja tasa de dilución (0.05 h^{-1}), la tensión del oxígeno disuelto, arriba del valor crítico de 1.75 mmHg , no tiene ningún efecto sobre la longitud promedio de los segmentos ni en el grado de ramificación de *Aspergillus nidulans*, siendo éstos resultados diferentes a lo que observaron en cultivo por lotes en matraz agitado, atribuyendo esto al tipo de agitación de cada sistema.

Otro trabajo en el que se investiga la influencia de la tensión de oxígeno en quimiostato (con *Aspergillus niger*) es el de Olsvik y Kristiansen (1992), los cuales tratan de ver además el efecto de la concentración de biomasa y la tasa específica de crecimiento sobre las propiedades reológicas del medio. Al igual que los autores anteriores, no encontraron un efecto del nivel de oxígeno disuelto sobre la morfología; sin embargo, la concentración de biomasa sí cambió, afectando el índice de consistencia del medio. Estos autores sugieren que lo que cambia, además del peso seco de micelio, son las interacciones entre hifas, las cuales no pueden ser cuantificadas visualmente.

II.2.2.2. Efecto de la concentración de glucosa.

Fiddy y Trinci (1975) trabajaron con *Geotrichum candidum*, en condiciones de limitación de glucosa ($20\text{-}100 \text{ mg/L}$). Observaron que la tasa de dilución no afecta la longitud del compartimento hifal, ni el diámetro de la hifa, además de que estos valores son más bajos que en medio sólido.

Wiebe y Trinci (1991) observaron el efecto de la tasa de dilución sobre la morfología de dos cepas de *Fusarium graminearum*, una silvestre y una variante colonial que aparece cuando el cultivo

continuo se prolonga por mucho tiempo. La concentración de fragmentos de ambas cepas se incrementó al disminuir la tasa de dilución, lo cual atribuyeron a un mayor tiempo de contacto del micelio con el agitador. En cuanto a los parámetros morfométricos, se obtuvieron resultados contradictorios, ya que, al aumentar la tasa de dilución, aumentó en ambas el diámetro hifal, pero la longitud de la unidad de crecimiento de las hifas (L_{hgu}) definida como la longitud total dividida entre el número de puntas (Trinci, 1971), en el caso de la cepa variante disminuyó, y para la cepa silvestre aumentó. Esto significa que la cepa variante presenta una frecuencia de ramificación mayor que la silvestre, lo que se manifestó en la viscosidad del medio, que aumentó en el cultivo con la cepa silvestre, y disminuyó en el cultivo de la cepa variante.

Otro efecto que provoca la limitación de la glucosa es el fenómeno de vacuolación (Paul *et al.*, 1994), observándose al mismo tiempo una disminución en la longitud total y en el número de puntas. Ellos concluyen que éste es un fenómeno que hace variar la resistencia de la pared, junto con el esfuerzo de corte, lo que provoca la fragmentación del micelio que se observa durante la mayoría de las fermentaciones. Es de hacer notar el hecho de que, generalmente, la tasa de fragmentación es mayor en fermentador que en matraz agitado, aún y cuando se utilicen perlas de vidrio u otras partículas que promueven la abrasión del micelio (Meyerhoff y Bellgardt, 1995).

II.2.2.3. Efecto de las sustancias iónicas.

El crecimiento de una hifa implica un fenómeno de polarización, el cual establece la dirección de elongación al determinar la dirección de flujo de las microvesículas (Grove y Bracker, 1970). La forma en que se provoca esta polarización es motivo de discusión, pero en general las teorías más aceptadas son las siguientes: existe un flujo de protones que modulan la actividad de las proteínas o la conformación y actividad del citoesqueleto; o bien, que esta polarización se crea mediante proteínas de la membrana con grupos de carga expuestos.

La presencia de ciertos iones parece ser de vital importancia para la polarización de la elongación. El efecto del calcio en el crecimiento ha sido abordado por Schmid y Harold (1988) los cuales concluyeron que, al disminuir la concentración de Ca^{++} se afecta la tasa de elongación de la hifa de *Neurospora crassa*, siendo esta más corta y ancha, dando incluso lugar a hifas bulbosas; sin embargo, la tasa específica de crecimiento permanece más o menos constante. De estudios con un marcador fluorescente concluyeron que la morfología parece estar controlada por el calcio ligado a la pared, y no por el que se encontraba disuelto en el medio.

Se ha observado que existe un flujo de cationes dentro de la punta de la hifa durante el crecimiento, reforzando esta observación el hecho de que, en células que no están en crecimiento y no están polarizadas no se generan éstas corrientes. Para estudiar esta polarización McGillivray y Gow

(1986) aplicaron campos eléctricos de diferente intensidad durante la germinación de varias especies, entre ellas *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, encontrando que, con la primera, disminuye el tiempo de germinación y aumenta la sincronización de ésta, orientándose el túbulo hacia el ánodo. Con *A. nidulans* no se dió la polarización, y tanto el túbulo como las ramas crecieron hacia el cátodo. En general, las ramificaciones se orientaron al ánodo o al cátodo, según la especie, lo que no concuerda con el hecho de que en todos los hongos probados hay una corriente positiva que entra por el ápice de las hifas, lo cual indica que no existe una correlación simple entre las corrientes eléctricas endógenas y la respuesta a los gradientes de voltaje externos.

De la revisión anterior se puede concluir que, el sistema de fermentación sumergida con hongos filamentosos ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, los problemas de mezclado y caracterización de los agregados fúngicos están lejos de resolverse. Una línea muy importante es el desarrollo de agitadores adecuados a los cultivos fúngicos, así como el mejoramiento de los sistemas de aireación, tópicos que indudablemente se encuentran ligados al diseño del equipo. Otra línea es la predicción y manipulación de la morfología filamentosa, para el control de la reología y productividad del sistema.

II.3. Modelamiento matemático del crecimiento fúngico.

Para el modelamiento de cultivos fúngicos se han empleado varios enfoques, dependiendo si toman a la biomasa como a un todo, o describen el crecimiento individual de la hifa, o si son para cultivo sumergido o superficial.

En general, los modelos se basan en parámetros de concentración en el medio, es decir, en la cinética global de la fermentación. Las expresiones de crecimiento exponencial y las cinéticas tipo Monod siguen demostrando su validez a través de los experimentos y los años, por lo que no es raro encontrar éste tipo de expresiones en casi todos los modelos publicados.

Los conocimientos de fisiología y bioquímica son fundamentales cuando se desea proponer un modelo de crecimiento, máxime si se pretenden formular expresiones estructuradas. El mecanismo propuesto por la Teoría Vesicular es, actualmente, el esquema de crecimiento más aceptado en la Micología, por lo que no es de extrañar que ése sea el enfoque de la mayoría de los modelos publicados en los últimos veinte años.

II.3.1 Modelos para crecimiento fúngico en medio sólido.

Basado en un estudio cinético, Trinci (1969, 1971) propuso que la tasa específica de crecimiento (la que denomina α) de un moho en la zona periférica de crecimiento, podía ser calculada mediante los parámetros K_r (tasa de crecimiento radial) y w (longitud de la zona de crecimiento) obtenidos en cultivo

superficial, y que el valor de α era muy parecido al de la tasa específica de crecimiento (μ) en cultivo sumergido. Esto sugiere que las hifas en el borde de la colonia aumentan de longitud de manera exponencial, a una tasa parecida al valor de μ , teniéndose con esto una expresión para predecir más rápidamente el comportamiento en cultivo sumergido. Esto sería válido siempre y cuando el valor de w no fuera influenciado por las variables del medio. Concluye que los hongos filamentosos pueden variar la concentración celular de su colonia (densidad) de tal manera que, el sustrato disponible es aprovechado eficientemente en alcanzar una mayor velocidad de extensión radial, cuando se tiene limitación de nutrientes; y que al encontrar una zona de mayor concentración, entonces la colonia crece más densamente, disminuyendo su velocidad radial.

Koch (1975) desarrolló un modelo, basado en la suposición de que el crecimiento fúngico sigue la ley de crecimiento logístico. Deriva una expresión que toma en cuenta la geometría del crecimiento, es decir, puede ser aplicada tanto para el desarrollo superficial de una colonia como para los pellets en un cultivo sumergido, ajustándose, de manera confiable, los datos experimentales en ambos sistemas de cultivo.

La idea de que la morfometría es, de alguna manera, una aproximación adecuada para describir el crecimiento de la hifa, ha sido manejada también por Trinci y Saunders (1977) que se avocaron a caracterizar matemáticamente la forma de la punta hifal, con la idea de que, si éste es el sitio de síntesis de pared, la descripción de su tasa de formación debería estar relacionada con la cinética de elongación de la hifa. Concluyeron que la forma de la punta es descrita adecuadamente por un hemielipsoide de revolución de alta excentricidad, por lo que la tasa específica de expansión de la pared es proporcional a la cotangente del ángulo de posición. En un trabajo posterior, Saunders y Trinci (1979) introdujeron la variable de la elasticidad de la pared, por lo que derivaron una ecuación diferencial que relaciona la rigidez de la pared con su curvatura, aunque metodológicamente es difícil calcular sus parámetros.

Como culminación de los estudios anteriores, Prosser y Trinci (1979) propusieron un modelo, en diferencias finitas, que muestra que la distribución espacial de las hifas, el proceso de septación y la cinética de ramificación, pueden ser predichos por la Teoría Vesicular. Consideraron unidades de crecimiento de longitud característica (segmentos hifales o compartimentos), que se van obteniendo al alcanzarse una concentración crítica de vesículas dentro de éstos; esto lo respaldan experimentalmente con el hecho de que, efectivamente, existe una unidad de duplicación (*Hyphal Growth Unit*), expresada como una longitud hifal promedio (L_{hgu}) asociada a cada punta en crecimiento (Trinci, 1974). Distinguen entre segmentos apicales e intercalares, dándose la producción de ramas en estos últimos. En su modelo no se considera la influencia de factores externos.

Edelstein (1982) planteó el uso de la distribución promedio de la densidad de las hifas, para describir el crecimiento de una colonia fúngica. Define términos algebraicos para tomar en cuenta las interacciones entre puntas, muerte y creación de nuevas puntas. El modelo es adecuado para la descripción de la biomasa de una colonia indiferenciada de *Sclerotium rolfsii* (Edelstein et al., 1983).

Georgiou y Shuler (1986) plantearon los balances de sustrato y biomasa de una colonia que crece sobre agar, tomando en cuenta las variables de muerte, rendimiento del sustrato, coeficiente de mantenimiento y diferenciación celular. Este modelo es útil para explicar los cambios morfológicos del moho, en términos de que se presentan limitaciones en la transferencia de sustratos, en el entorno de la hifa, pero es complicado el obtener experimentalmente la cantidad de biomasa diferenciada (conidióforos, esporas y micelio vegetativo) y los gradientes espaciales de los sustratos en el agar.

Una mejora al modelo anterior fue planteada por Mitchell et al. (1991), ya que simplificaron el término de biomasa, e introdujeron los términos de excreción de una amilasa, la cual se difunde y actúa contra la matriz sólida, y cuyo producto de reacción se difunde en contrasentido, hacia la colonia, para incorporarse como nueva biomasa. Este es un modelo para la fase exponencial de crecimiento, que es cuando se puede detectar la actividad de la enzima.

En un intento por integrar los conocimientos que se tienen del crecimiento de mohos, a nivel micro y macro, Viniegra González et al. (1993, 1994) utilizan la definición del crecimiento binario simétrico de un árbol (para calcular el nivel promedio de ramificación) y la distribución de puntas activas en un micelio (estimación de la biomasa que está en crecimiento, mediante una función de ley de potencia de factor n) para describir la tasa específica de crecimiento macroscópica de la biomasa. Es decir, mostraron un tipo de correspondencia entre los parámetros micro y macroscópicos del crecimiento fúngico.

Gutiérrez-Rojas et al. (1995a) presentan un modelo que describe el crecimiento fúngico, en un lecho empacado con un soporte simétrico inerte. El modelo se deriva de los balances de materia y energía dentro de un volumen representativo del sistema, siendo capaz de predecir el comportamiento del cultivo a concentraciones crecientes del sustrato carbonado, y considerando la naturaleza heterogénea del lecho empacado. Entre la información que aporta, la más importante es la de establecer que el paso limitante del crecimiento es la desaparición del azúcar disponible, siendo esto independiente de la concentración inicial proporcionada.

Así se tiene que, de manera general, los modelos propuestos para medio sólido, a excepción del anteriormente descrito, no contemplan la influencia de la composición del medio, debido a la naturaleza heterogénea del sistema, ya que una fermentación sólida implica la interacción del micelio

con 3 fases: la matriz sólida, el líquido embebido en ella, y la fase gaseosa. Es de esperarse que, con el desarrollo de las técnicas analíticas para éste tipo de sistemas, puedan plantearse en un futuro modelos más completos que tomen en cuenta éstas interacciones.

En resumen, se tiene la idea de que μ puede ser estimada dividiendo la velocidad de elongación de las hifas, llamada K_r por Trinci (1971), y en este escrito denominada u_r , sobre una distancia crítica, denominada w también por Trinci (1971), y que hasta ahora ha sido difícil de evaluar usando técnicas de procesamiento de imágenes, dado que involucra el conocer el volumen de citoplasma que contribuye directamente en el crecimiento de la punta hifal. Hasta la fecha, la estimación de dicha longitud se ha convenido que sea la llamada L_{hgu} (longitud de la unidad de crecimiento hifal) la cual se define como la longitud total (L) entre el número de puntas, pero, según Viniestra González *et al.* (1993) dicha longitud puede variar en micelios muy pequeños, lo que se discute más adelante. De ahí que el tema principal de análisis consista en definir el valor de esa distancia " w " que, dividiendo a la velocidad de elongación apical, estime correctamente el valor de μ , definido éste de forma empírica como la tasa específica de crecimiento $\mu = 1/X (dX/dt)$.

II.3.2. Modelos para crecimiento fúngico en medio líquido.

El cultivo de mohos en medio líquido ha sido muy estudiado, dada su utilización industrial (ácido cítrico y penicilina). En la presente revisión se describen, cualitativamente, los modelos que han sido propuestos para éste medio. Para mayor detalle de cada uno de los modelos, se sugiere consultar las fuentes originales. Dependiendo de las condiciones del medio, se sabe que el crecimiento en cultivo sumergido, puede presentar diversos niveles de agregación (morfologías), los cuales pueden ser los siguientes: hifas individuales (micelio disperso); agregados de hifas, laxos y amorfos (agregados miceliarios), y agregados simétricos con un núcleo compacto (pellets) los cuales se esquematizan en la Figura I.5.

De manera general, se acepta que la biomasa, en un cultivo fúngico sumergido, puede ser descrita, frecuentemente, por un ajuste cúbico, como lo demuestra el trabajo de Pirt (1966), el cual justifica teóricamente la validez de ésta relación, en un cultivo fúngico que crece en forma de *pellets*, y el cual tiene que ver con la distancia de penetración (denominada por él W) de los sustratos en la masa de hifas. Utilizando datos del coeficiente de difusión de la glucosa y del oxígeno, calculó el valor teórico de W al cual no existe limitación de cada uno de esos sustratos. Concluyó que el valor mínimo de W para glucosa es de 1 mm, mientras que para oxígeno es de 0.077 mm, por lo que justifica la observación experimental más común de que, en *pellets* compactos, los cortes histológicos muestran un núcleo lisado, aún y cuando se trabaje a condiciones adecuadas oxígeno disuelto, es decir, la limitante más importante del crecimiento es el aporte de oxígeno a las hifas.

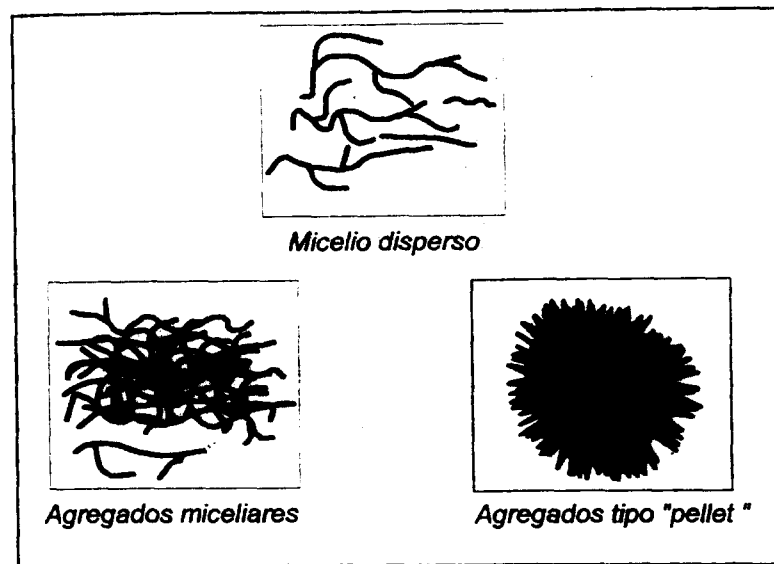


Figura I.5. Morfologías fúngicas típicas en cultivo sumergido.

Van Suijdam *et al.* (1982) propusieron un modelo no estructurado, que describe el crecimiento de *pellets* de *P. chrysogenum* en una columna de burbujeo, y el cual integra los balances de biomasa, sustrato carbonado limitante, oxígeno en la fase líquida y oxígeno en los *pellets*, y considera un factor de efectividad para describir el efecto de limitación de oxígeno dentro de los *pellets*.

Utilizando el esquema vesicular, Bartnicki-García *et al.* (1989) crearon un simulador morfológico que reproduce el proceso de germinación y elongación del túbulo germinal en pantalla. Ésto se logra definiendo una distancia entre el *cuero apical* y el ápice de la punta. Esta distancia se genera partir de la relación de la cotangente de la posición en x (eje axial) por la velocidad de desplazamiento del *cuero apical*, entre el número de vesículas lanzadas. Utilizan datos experimentales para calcular ésta distancia, y a la expresión propuesta la denominan *hiploide*, diferenciándola de la propuesta, a partir de un planteamiento semejante, por Trinci y Saunders (1977).

Aynsley *et al.* (1990) utilizaron la aproximación de considerar a la hifa como un reactor tubular autoelongable en solo uno de sus extremos, con transporte de nutrientes en toda su superficie, los cuales, al entrar, son transformados en precursores y transportados hacia el ápice; ahí, mediante una reacción tipo Michaelis-Menten, son transformados en biomasa. Haciendo el promedio volumétrico, fueron capaces de describir el aumento de biomasa dentro del fermentador.

Utilizando un enfoque mixto, Yang *et al.* (1992 a, b) presentaron un modelo en dos partes: una *determinística*, para representar la cinética de crecimiento de las puntas y la septación; y otra *estocástica*, para describir la ramificación (dirección y orientación). Se basaron en datos experimentales

de la medición de los ángulos de inserción y orientación de las ramas (Yang *et al.*, 1992a) para proponer las funciones de distribución, que resultó ser normal. El crecimiento se establecía por la difusión del sustrato clave. Con éste enfoque lograron simular el desarrollo de micelio desde la germinación hasta la formación del *pellet* de un estreptomiceto.

Patankar *et al.* (1993) a diferencia del resto de los autores, plantearon una manera novedosa de modelar la distribución espacial de las hifas: especificando cuantitativamente la morfología, mediante el valor de la dimensión fractal (D). Dicho parámetro representa la distribución de masa M en un elemento de volumen, dentro de un objeto fractal tridimensional de longitud r, de acuerdo con una ley de potencia de la siguiente forma: $M(r) = r^D$, donde D toma cualquier valor positivo, menor a dimensión Euclidiana de 3. La ventaja de éste enfoque es que la dimensión fractal es insensible a la dilución -por lo que no depende de la concentración absoluta de biomasa- siendo de ésta manera un índice morfológico muy conveniente. Experimentalmente obtuvieron ésta cantidad de masa midiendo la dispersión que causan las hifas de un haz ultrasónico. El modelo, geométrico y probabilístico, contempla la elongación (a tasa constante) de las puntas viables, y la formación de ramas nuevas, las cuales son perpendiculares a la hifa generadora, y la dirección que siguen se define estocásticamente. Encontraron una alta correlación de la dimensión fractal con el índice de compresibilidad y la constante de Kozeny (que tiene que ver con el flujo a través de lechos empacados), observando que la torta formada por un caldo con *pellets* era más compresible que la formada por el que contenía micelio disperso, y que las suspensiones con *pellets* tenían una dimensión fractal más baja que las miceliarias.

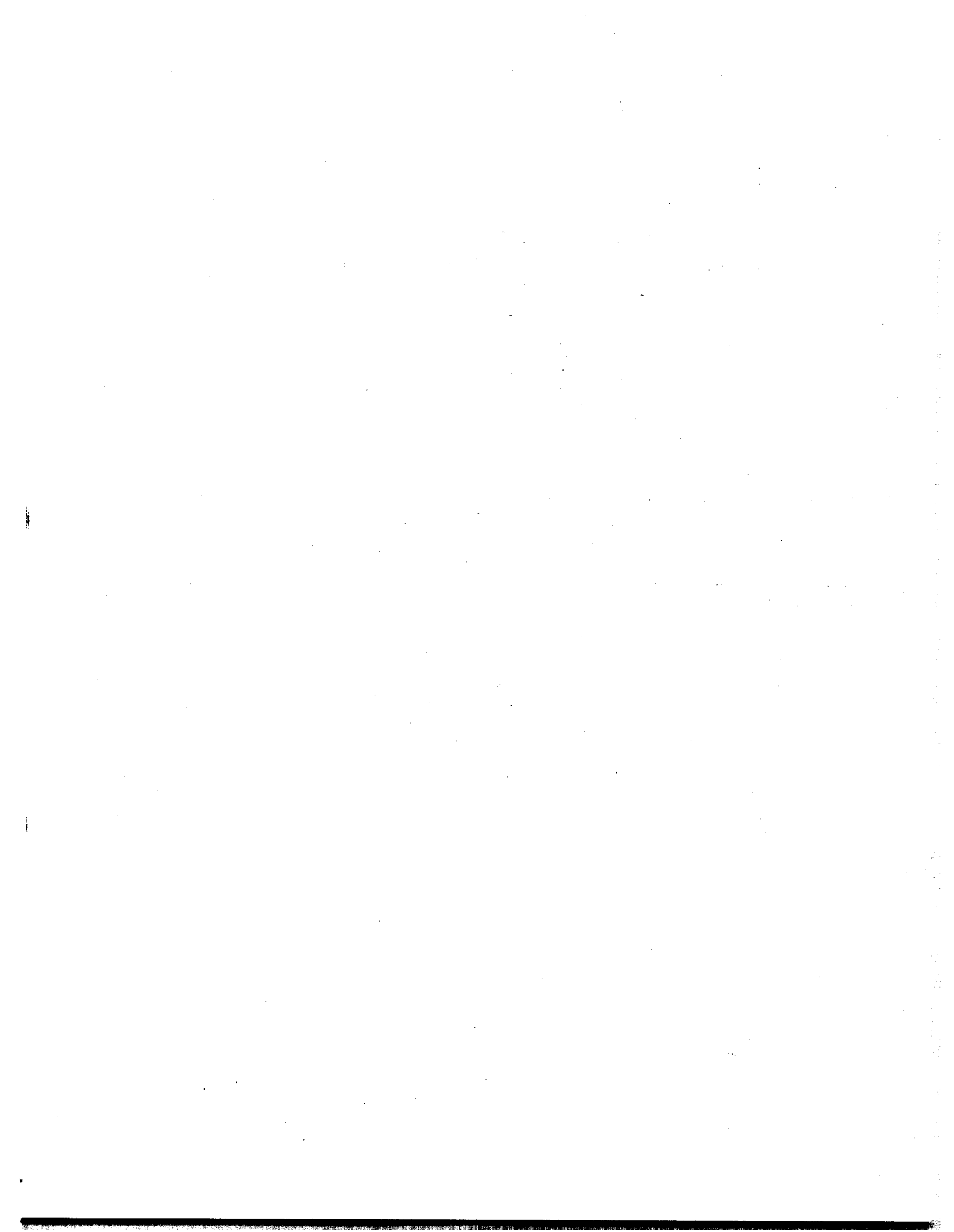
La tendencia en el campo del modelamiento biológico, es el de proponer esquemas cada vez más integrados, que contemplen tanto la estructura microbiana como la bioquímica del proceso de crecimiento, y producción de metabolitos. Esto va siendo posible a medida que las metodologías a nivel citológico se refinan. Un esquema totalmente integrado debiera contemplar todas las reacciones que ocurren en el organismo, pero, dado que se calcula que son más de mil (Nielsen, 1992), un enfoque más práctico es el de considerar las principales, o al menos las detectables.

Un esfuerzo encaminado a éste enfoque es el que presenta Nielsen (1992, 1993), el cual se plantea un modelo morfológicamente estructurado, integrado mediante esquemas estequiométricos de reacción, en el cual se toman en cuenta tres procesos principales: 1) Captación del sustrato, 2) Formación de la biomasa y productos metabólicos, y 3) Excreción de éstos productos. Su naturaleza estructurada radica en que toma en cuenta 3 entidades morfológicas: apical, subapical e hifal, presentándose el crecimiento únicamente en las dos primeras. El cambio de un forma a otra se lleva a cabo mediante un grupo de reacciones empíricas de metamorfosis, de primer orden, las cuales sirven para establecer los procesos de ramificación, crecimiento de la punta y diferenciación (vacuolización). Para describir lo que pasa en el volumen del fermentador realiza un balance de población de las entidades

Este modelo logra describir adecuadamente los cambios de concentración de sustratos y productos durante la producción de penicilina; sin embargo, la cuantificación de las diferentes morfologías es difícil y requiere un mayor refinamiento.

Meyerhoff y Bellgardt (1995a) consiguieron simular una fermentación de penicilina por lote alimentado, tomando como modelo básico el crecimiento del *pellet*, construido a partir de capas radiales de densidad constante de micelio, acoplado además, los fenómenos de germinación, precultivo, fragmentación del *pellet* y producción de penicilina ligada a la morfología. De esta forma, explican la distribución de tamaños del *pellet* como una consecuencia de la distribución gaussiana (truncada en el tiempo) de la germinación de las esporas. Para considerar el proceso de fragmentación propusieron una expresión empírica, que considera una función lineal de probabilidad de ruptura (W_{dam}), que se basa en la edad promedio del cultivo. Observaron que, después de la ruptura, ya no se recupera el nivel de la tasa de crecimiento, aún cuando se alimente más glucosa y aire, por lo que concluyen que el micelio resulta dañado. Consideran que la penicilina no se produce en las puntas, por lo que cada micelio tiene una zona improductiva. Así, si el valor de la unidad de crecimiento hifal (L_{hgu}) disminuye, significa que hay más ramificaciones, y por lo tanto más puntas, por lo que la productividad disminuye. Proponen una tasa de producción de primer orden, y una hidrólisis constante. Aclarando que, al final de la fermentación la morfología predominante es la del micelio disperso, los autores enfatizan la necesidad de acoplar otro modelo al final. También proponen un modelo simplificado, que acorta el tiempo de simulación (Meyerhoff y Bellgardt, 1995b).

En resumen, la fermentación en medio líquido ha sido más ampliamente descrita que la de medio sólido, sin embargo, también presenta dificultades técnicas y conceptuales por resolver. Los modelos descritos son los más representativos, y en general, el objetivo de la mayoría de ellos es la descripción de lo que sucede durante una fermentación fúngica de manera global.



CAPÍTULO III

OBJETIVOS

La idea principal, en la que se basó este trabajo, fue la siguiente: se sabe que es posible, mediante el procesamiento de imágenes, realizar el seguimiento microscópico de la elongación hifal, y que ésta es la causal directa del aumento de la biomasa, por lo que, en principio, si se lograra cuantificar el cambio total de volumen, y se conociera la densidad de este micelio, sería posible estimar la biomasa producida.

Desde el punto de vista experimental, se sabe que, una vez establecido el crecimiento vegetativo, es prácticamente imposible diferenciar cada segmento hifal individualmente, pues tanto en sólido como en líquido se da la agregación y entrecruzamiento de las hifas, produciéndose una masa compacta de micelio al cabo de poco tiempo, dificultándose enormemente la observación, aún en los casos que se realizan altas diluciones, por lo que el simple seguimiento de las hifas resulta de poco éxito práctico.

Desde el punto de vista conceptual, el problema principal ha sido el definir, de una manera operacional, la unidad de crecimiento, es decir, el módulo de la biomasa que se duplica en una cierta unidad de tiempo. Trinci (1969, 1971, 1974) acuñó el término de "unidad de crecimiento hifal", asociada a una longitud característica (L_{hgu}) que se estima dividiendo la longitud total (L_T) de la hifa entre el número de puntas (N_T): $L_{hgu} = L_T / N_T$. Viniestra-González *et al.* (1993) han sugerido un módulo distinto, denominado L_c , y que es la distancia entre la punta de un segmento distal y el primer sitio de ramificación. Estos autores han propuesto que la longitud total, en función del análisis combinatorio entre segmentos y puntas de cualquier árbol binario, está dada por:

$$L_T = L N_s$$

Donde L es la longitud media de los segmentos y N_s el número de segmentos, que puede ser calculado como:

$$N_s = 2N_T - 1$$

Por lo que

$$L_T = L (2N_T - 1)$$

Dividiendo entre N_T se obtiene lo siguiente

$$L_{hgu} = L (2N_T - 1) / N_T$$

Cuando $2N_T \gg 1$ esta expresión se aproxima a

$$L_{hgu} \approx 2 L$$

Pero si L y L_c son aproximadamente iguales, entonces

$$L_{hgu} \approx 2 L_c$$

La ventaja experimental de trabajar con L_c consiste en que ésta pudiera ser cuantificada durante la primera etapa del crecimiento, cuando todavía no se da el entrecruzamiento de las hifas, o puede ser medida en el borde de cultivos densos de superficie o sumergidos.

Dado lo anterior se decidió que, si se querían utilizar datos morfométricos para predecir el crecimiento fúngico, era necesario trabajar en las zonas de espacio y tiempo en las que se pudieran tomar mediciones fácil y confiablemente. Ésto corresponde, en tiempo, a la germinación de las esporas, y en espacio, al borde de la colonia.

La estimación del parámetro μ es clave para el modelamiento de todos los procesos de fermentación, pues de ahí se pueden estimar muchas de las propiedades de un cultivo, tanto en la modificación del medio de cultivo como en sus actividades metabólicas.

En los cultivos en superficie, ésta medición se puede realizar mediante el trabajo laborioso de medir la densidad de biomasa del cultivo, pero ésto no siempre es posible cuando se trata de cultivos en medios porosos, de geometría irregular y composición compleja. En cambio, la medición de las longitudes de las hifas distales y de las velocidades microscópicas de elongación es factible, en principio, para cualquier cultivo de micelios observables al microscopio.

Por tanto, el desarrollo de un modelo empírico que relacione la morfometría con la estimación de μ resulta de gran interés, especialmente para caracterizar cultivos fúngicos en medios muy diversos. En forma global se espera que esta tesis contribuya a sentar bases empíricas de las relaciones que existen entre la morfometría microscópica y la evolución gravimétrica (macroscópica) de cultivos fúngicos modelo (*Aspergillus niger* y *Gibberella fujikuroi*).

La importancia de encontrar éstas relaciones, es la de justificar y validar a la morfometría como una herramienta de monitoreo de fermentaciones fúngicas, para buscar una manera de acortar el tiempo de análisis de este tipo de procesos. En ésta tesis se recapitulan algunos de los modelos conocidos del crecimiento de las hifas, para predecir el valor de la tasa específica de crecimiento (μ), la cual se estima, a partir de la cuantificación del peso seco, mediante la expresión logística, para utilizarla como patrón de comparación. El modelo logístico es comúnmente aceptado como modelo empírico adecuado para la descripción del crecimiento de un cultivo fúngico.

Se decidió que resultaba de interés predecir la tasa específica de crecimiento de la biomasa, con dos mohos de diferente velocidad de crecimiento, y en diferentes sistemas de cultivo: superficial y sumergido. Además, se planeó modificar la morfología mediante la variación de la concentración de la fuente de carbono, para tratar de encontrar, indirectamente, una expresión de validez más general, que contemplara el efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento fúngico global.

También se quiso investigar si la morfometría de los cultivos fúngicos, en medio líquido, estaría correlacionada con parámetros básicos del crecimiento de las hifas, en medio sólido, como un ejemplo adicional en el cual los estudios morfométricos pudiesen ayudar a predecir la conducta de los agregados fúngicos.

De la revisión realizada, y de los antecedentes experimentales en el campo, se plantearon diversas cuestiones de interés, de ahí que en la presente tesis se propusieran los siguientes objetivos:

Objetivo general

- ♣ Establecer la relación funcional entre la morfometría del crecimiento fúngico y la síntesis de biomasa, en cultivos sólido y líquido.

Objetivos particulares

- ♣ Proponer parámetros morfométricos que describan el crecimiento de las hifas de hongos filamentosos, eligiéndose como modelos a *Aspergillus niger* y *Gibberella fujikuroi*.
- ♣ Seguir el crecimiento de las hifas, tanto en la fase de germinación como durante el crecimiento vegetativo, en placa de agar y en medio líquido.
- ♣ Evaluar los parámetros morfométricos elegidos y la síntesis de biomasa.
- ♣ Establecer las correlaciones existentes entre los parámetros morfométricos y la biomasa sintetizada.

Hipótesis

- ♣ El seguimiento de la morfometría microscópica del micelio permitirá predecir el comportamiento macroscópico de la biomasa del cultivo.



CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

Uno de los problemas en el estudio de los mohos, durante una fermentación sólida, es la cuantificación de la biomasa, ya que el micelio se encuentra muchas veces fuertemente adherido a la matriz sólida, dificultando su separación. Para resolver este problema, se han propuesto principalmente dos técnicas: el medir un compuesto específico de los mohos, como es el caso de la quitina y la glucosamina; y el procesar digitalmente la imagen del hongo creciendo en el sustrato, si bien para ésto se tienen no pocos problemas que resolver en cuanto a la forma del muestreo.

En este trabajo se utilizó el procesamiento de imágenes, técnica que se puede manejar gracias a que los medios de cultivo son totalmente solubles, transparente en el caso de medio líquido, y translúcidos en los medios con agar. También se cuantificó la biomasa, utilizando la técnica del peso seco.

II.1. Los microorganismos. Conservación de las cepas.

II.1.1. *Aspergillus niger*:

Se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* No. 10 var. *hennebergii* (Raimbault, 1980), proporcionada por el ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération).

La conservación de la cepa se realizó en agua estéril, según el protocolo presentado por Smith (1991), y que consistió en crecer y dejar esporular la cepa en un medio adecuado (Agar Papa-Dextrosa en este caso), cortar tiras de la colonia (con todo y agar), y depositarlas en recipientes con tapa de rosca, que contengan agua destilada estéril. Éstos se guardaron a temperatura ambiente (entre 5 y 20 °C). La viabilidad de la cepa se conservó sin problemas por más de un año.

II.1.2. *Gibberella fujikuroi*:

La cepa utilizada fue la de *Gibberella fujikuroi* IMI 58289 (Commonwealth Mycological Institute, U.K), proporcionada por E. Cerdá, de la Universidad de Sevilla (España). La conservación de la cepa se realizó en viales con agar Czapek (su composición se muestra mas adelante), almacenándose a 4 °C. La reactivación y obtención de esporas se llevaba a cabo también en agar Czapek, cultivándolo a 28 °C durante 7 días.

II.2. Sistemas experimentales.

El sistema elegido para medio sólido fue la caja de Petri (diámetro = 9 cm), de plástico. En todos los casos se depositaban 20 mL de medio en cada caja, con lo cual se obtenía una profundidad del medio de aproximadamente 0.5 cm.

Para los experimentos en líquido, con *G. fujikuroi*, se utilizaron diferentes sistemas. Se describen a continuación cada uno de ellos

1) Matraz Erlenmeyer; de 250 mL, con tapón de algodón y gasa. Se utilizó un volumen de medio de 100 mL por matraz. La agitación utilizada fue de 250 rpm, y temperatura de 28 °C, dentro de un agitador orbital de matraces marca Labline.

2) Fermentador instrumentado de 3 litros de volumen nominal, al que se le agregaban 2.5 litros de medio. Se tenían dos agitadores tipo Rushton y 4 mamparas. Las condiciones que se utilizaron en todas las corridas fueron: agitación de 500 rpm; temperatura constante de 28 °C, pH de 5 y aireación de 1.5 litros por minuto. Como inóculo se utilizaron 250 mL de un cultivo líquido, en matraz agitado, de 48 horas de edad. El oxígeno disuelto no fue controlado. La solución de oligoelementos se agregaba una vez frío el fermentador, esterilizándola al momento de usarse con un filtro estéril (Millipore™) de 0.2 mm de diámetro de poro.

II.3. Composición de los medios de cultivo.

Los medios utilizados fueron diferentes para cada uno de los mohos, dado que sus requerimientos nutricionales así lo exigieron. Se buscó que, en cada caso, el medio fuera lo más transparente posible, y que promoviera un crecimiento adecuado, aunque no tan abundante que dificultara la observación al microscopio.

II.3.1 Medios para *Aspergillus niger*.

La relación C/N del medio basal fue de 12 (g/g), y los oligoelementos se agregaron en una concentración tal que no se presentara la limitación de estos compuestos a lo largo del proceso. Este medio era adecuado para promover un crecimiento vegetativo vigoroso, tanto en medio líquido como en agar.

El medio basal tuvo la siguiente composición (g/L): Glucosa (10), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.98), urea (0.24), KH_2PO_4 (0.50), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6), extracto de levadura (0.1), sol. de oligoelementos (2 mL/L).

Solución de oligoelementos (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.5), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (11), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.15), H_3BO_3 (5.5), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.55), Na_2EDTA (25), $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.8), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.8).

Para los experimentos a diferentes concentraciones de glucosa y relaciones C/N, solamente se variaba la cantidad de glucosa utilizada, excepto en donde se especifica alguna otra condición. El extracto de levadura contribuyó con algo de nitrógeno al medio, sin embargo, dado que el contenido de este elemento era de aproximadamente 7.4% en peso, su uso no modificó de manera importante la relación C/N.

II.3.2. Medios para *Gibberella fujikuroi*.

Se utilizaron medios con mezclas de glucosa y almidón, probándose un total de siete composiciones diferentes. Los medios permitían el adecuado desarrollo del micelio.

El medio Czapek tiene la siguiente composición (g/L): NH_4NO_3 (0.96), KH_2PO_4 (5.0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0), sol. de oligoelementos (2 mL/L). Las mezclas de glucosa y almidón se calcularon de manera que en todos los casos se conservara una cantidad de carbohidratos totales de 80 g/L. Las composiciones, expresadas en porcentaje de glucosa, fue la siguiente: 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5 y 100 %. El pH de los medios se ajustó a 5. La solución de oligoelementos fue la misma que para *A. niger*.

II.4. El inóculo.

Dadas las características de crecimiento y esporulación de cada cepa, el inóculo varió en cada una. *A. niger* presenta una esporulación abundante y muy visible (negra), por lo que la obtención y cuantificación de las esporas no representa problema alguno. Para *G. fujikuroi* el caso es el contrario, ya que presenta una esporulación muy escasa, y de color blanco o cremoso, lo que dificulta su observación. Para éste organismo, se presentó la necesidad de realizar un precultivo, para utilizarlo como inóculo.

II.4.1 Inóculo de *Aspergillus niger*.

En los experimentos se utilizaron esporas recién cosechadas como inóculo, y para obtener éstas se inoculaba una gotas de la preparación de conservación en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA, Oxoid CM139), y al cabo de cinco días se cosechaban las esporas de la superficie de la colonia, utilizándose una solución estéril de Tween 80 al 0.1%, y un agitador magnético, al que se dejaba raspar la superficie de la colonia por aproximadamente 15 minutos. La suspensión obtenida se vaciaba a un matraz estéril, y de ahí se tomaba una muestra para realizar el conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer.

II.4.2. Inóculo de *Gibberella fujikuroi*.

Dada la baja tasa de crecimiento de éste moho, se vió la conveniencia de realizar la germinación previa de las microconidias, en un medio líquido, para posteriormente utilizar la suspensión de micelio y esporas obtenida como inóculo. Esta suspensión se obtenía de la siguiente manera: de cultivos en agar Czapek, crecidos durante 7 días, se obtenían microconidias, las cuales eran suspendidas con agua estéril, para ser utilizadas como inóculo, en una proporción 1/10 (v/v), de medios líquidos Czapek. Estos se cultivaban por 48 horas a 28 °C, para ser utilizados inmediatamente como inóculo.

II.4.3. Inoculación en caja Petri.

En el medio de agar se utilizaron dos tipos de inoculación (en césped ó por piquete), para caracterizar el crecimiento a dos niveles: 1) El crecimiento individual (la hifa), y 2) El crecimiento colonial (el micelio).

Para *Aspergillus niger*.

La inoculación tipo césped consistía en depositar una cantidad conocida de la suspensión de esporas en el centro de la caja Petri, dispersándola con una barra de vidrio, de manera que en toda la superficie hubiera una distribución uniforme de esporas. El volumen utilizado de suspensión fue generalmente de 0.5 mL, para tener una concentración final de esporas de aproximadamente 1×10^5 esporas/caja. En éste sistema se siguió el proceso de germinación hasta que las hifas presentaban las primeras ramificaciones, después de lo cual era prácticamente imposible distinguir algo que no fuera una madeja de micelio. En estas cajas también se realizó el seguimiento del peso seco de la biomasa sintetizada, que se expresó en forma de $X [=] \text{mg}_{\text{peso seco}}/\text{cm}^2$.

La inoculación en piquete se realizaba depositando el inóculo en el centro de la caja, cuidando que no se dispersara el líquido, para lo cual se utilizaba un bajo volumen de suspensión de esporas (aprox. 10 μL), y una punta de pipeta adecuada a este volumen, enterrándola ligeramente en el agar antes de depositar el inóculo, para formar un pocito. Con éste tipo de inoculación se lograba obtener una colonia circular por caja, particularidad sumamente adecuada a la hora de medir el cambio del diámetro de la colonia. También permitía la medición de las hifas distales en el borde de la colonia, y que se encuentran en condiciones cuasi-estacionarias de crecimiento, ya que van cubriendo al agar que tiene la composición original del medio. Éste hecho se vió corroborado por la observación de una tasa lineal de aumento del radio de la colonia.

Para *Gibberella fujikuroi*

Para éste organismo se utilizaron también las inoculaciones por piquete y tipo césped, utilizándose los mismos volúmenes de suspensión utilizados para *A. niger*.

II.4.4. Inoculación en medio líquido.

La suspensión de micelio y esporas de *G. fujikuroi* fue utilizada como inóculo, en una proporción 1/10 (v/v) con respecto al medio de cultivo.

II.5. Cuantificación del peso seco.

Dado el hecho de que se trabajó con un medio completamente soluble, se pudo utilizar la técnica de cuantificación del peso seco de la biomasa, ya que se podía tener la seguridad de que lo medido era efectivamente la biomasa, y no partículas suspendidas del medio.

Para el caso de crecimiento sobre agar, se tuvo la necesidad de realizar un pretratamiento sencillo a la muestra para eliminar la presencia de agar en el micelio. Los experimentos se realizaron por duplicado. La metodología realizada en ambos tipos de medio se describe a continuación.

En medio líquido: Un volumen conocido de muestra era filtrado al vacío, a través de una membrana Millipore™ de 0.45 µm de tamaño de poro (en el caso de *A. niger*), o un papel filtro Whatman No.40 (para *G. fujikuroi*), previamente puestos a peso constante dentro de un desecador. La muestra era secada en una estufa a 60° C, durante 24 horas; después se almacenaban en un desecador toda una noche, pesándose posteriormente en una balanza analítica. El peso seco de la muestra se obtenía de la diferencia del peso de la membrana o papel filtro, antes y después de haber filtrado la muestra, dividiendo entre el volumen filtrado. El resultado se reportó en $\text{mg}_{\text{peso seco}}/\text{mL}_{\text{medio}}$.

En medio sólido (agar): El micelio presente en la caja Petri se separaba del agar, con ayuda de una pinza de disección, colocándose en un vaso de precipitados de 500 mL, el cual contenía 150 mL de agua destilada acidificada (pH 2). Esto se mantenía en ebullición por dos minutos, dentro de un horno de microondas a la máxima potencia. Esto para permitir que los restos de agar adheridos al micelio fueran completamente solubilizados. Después se procedía de la misma forma que con el medio líquido. El resultado se reportó en $\text{mg}_{\text{peso seco}}/\text{cm}^2$ de caja. La superficie de una caja Petri de 9 cm de diámetro se consideró ser de 64 cm^2 .

II.6. Análisis de imágenes. Generalidades.

Para realizar las mediciones morfométricas se utilizó el programa IMAGENIA 2000 (Biocom, Francia). El equipo constaba de un microscopio Carl Zeiss, conectado a una cámara de circuito cerrado, en blanco y negro, modelo Sentinel EEV PS46510 (G&C, Inglaterra), la cual enviaba la señal a una computadora HP386, equipada con una tarjeta digitalizadora Matrox y un coprocesador matemático 387, tras lo cual la imagen aparecía en un monitor de color marca Acer, mientras que en la pantalla de

la computadora se podía ver el menú del programa, y de ésta manera trabajar sobre la imagen. El programa contenía las opciones necesarias para segmentar la imagen, aplicar filtros y otras serie de operaciones para mejorar la imagen, y para realizar las mediciones de longitud, área y factor de forma, entre las mas importantes.

Las mediciones se realizaron manualmente, moviéndose el campo del microscopio y capturando el micelio en turno, para evitar sesgar el muestreo. Cuando se requería mediciones macroscópicas, tal y como es el caso del radio de la colonia, se tenía otra cámara, con el lente adecuado, fija en un sistema para fotografiado.

Todos los experimentos se realizaron por lo menos dos veces, para corroborar la reproducibilidad de los resultados. Las mediciones de radios de la colonia se hicieron por quintuplicado; la medición de longitudes y diámetros hifales se realizó tomando muestras de 30 ó 50 hifas por caja o matraz, por duplicado. El análisis estadístico de los datos (ANOVA) se realizó con el programa SAS y en Excell 5.

II.6.1. Conservación de la muestra para el procesamiento de imágenes.

Las muestras, tanto sólidas como líquidas, fueron procesadas lo más pronto posible, sin embargo, dada la cantidad de replicados, fue necesario utilizar un método para preservar las características morfométricas de la muestra por varios días. Para ello se utilizó el fijado con una solución de formalina, la cual es una mezcla volumétrica de etanol al 50%:sol. de formaldehído:ácido acético glacial (200:13:5), que se agregaba a las muestras líquidas en proporción 1:2, y a las muestras sólidas se le rociaba directamente sobre la superficie del agar. Esta solución preservaba la longitud del micelio, sin embargo, se observó cierto cambio en el diámetro de las hifas a las pocas horas de encontrarse en contacto con esta solución, por lo cual se decidió medir éste parámetro en fresco y antes de cualquier otro, para evitar este efecto.

II.6.2. Parámetros morfométricos de hifas individuales.

Independientemente de si el medio era líquido o sólido, se cuantificaron ciertos parámetros cuando se presentaban hifas individuales, que correspondían a la etapa de germinación. A continuación se describen cada uno de éstos:

Longitud (L). Largo del túbulo germinal a cualquier altura del proceso de germinación, medida desde la conexión de la espora con el túbulo hasta el ápice de éste.

Longitud crítica promedio (L_c). Largo promedio del túbulo germinal a la cual se observa aparecer la primera ramificación. Esto marca el fin de la germinación, y comienzo de la etapa vegetativa.

Diámetro de hifa (D_h). Promedio del ancho de las hifas.

Para cuantificar estos parámetros en cultivo sumergido se tomaba la muestra líquida y se depositaba en un portaobjetos, se cubría con un cubreobjetos y se procedía a colocarla bajo el microscopio. Para seguir el crecimiento en medio sólido se tomaban rectángulos de agar de aproximadamente 1 x 3 cm, se fijaban con la solución de formalina y eran colocados en un portaobjetos para poder manejarlo en la platina del microscopio.

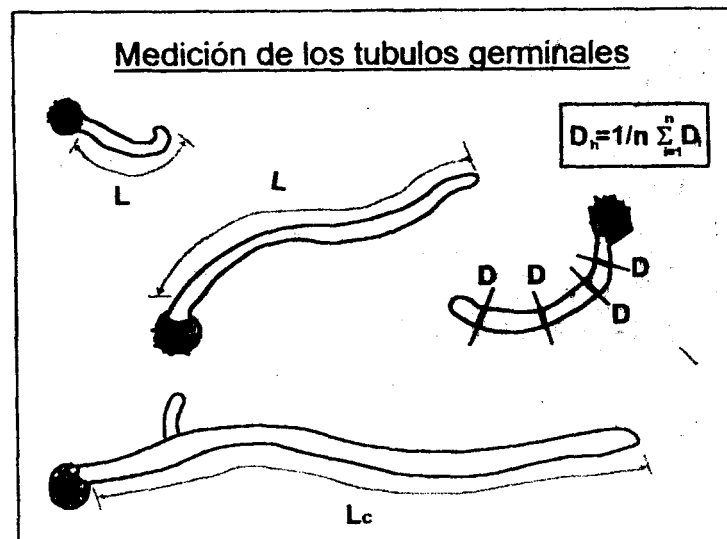


Figura II.1. Parámetros cuantificados en los túbulos germinales.

II.6.3. Parámetros morfométricos de la colonia.

La colonia miceliar, obtenida de la inoculación por piquete, era sujeta a dos niveles de medición: macro y micro. El primero era el **Diámetro de colonia**, el cual era medido durante varios días, para calcular la velocidad de extensión radial (u_r). Había que colocar la caja completa en un sistema para fotografiado, para poder obtener la imagen digitalizada de la colonia, a la cual se le estimaba el diámetro equivalente a su perímetro digitalizado.

A nivel micro se observaba el borde de la colonia, para medir las hifas que allí crecen (denominadas distales), para lo cual se colocaba bajo el microscopio una muestra del bloque de agar que contenía a ésta sección. Los parámetros (Fig.II.2) medidos en ésta región fueron los siguientes:

Longitud distal promedio (L_{dv}). Largo promedio de las hifas desde la punta hasta la primera ramificación visible.

Longitud máxima (L_{max}). Largo máximo, de la punta hasta la primera ramificación, que era alcanzado por las hifas distales.

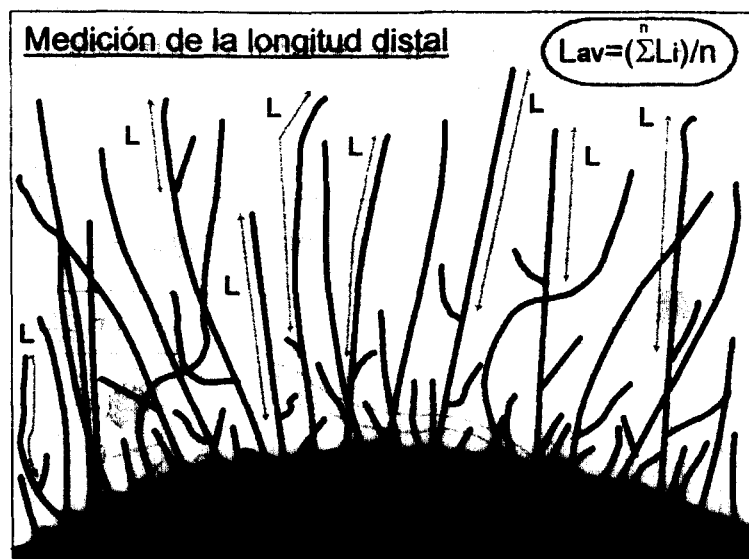


Figura II.2. Mediciones realizadas en el borde de las colonias.

II.7. Métodos de ajuste del modelo.

Para calcular los parámetros de las diferentes ecuaciones, se utilizó tanto una hoja de cálculo (Excell 5), como un programa comercial (Enzfitter, Sigma), el cual contiene subrutinas de ajuste no lineal, que utilizan el algoritmo de Marquardt para minimizar la suma del cuadrado de los errores residuales.

CAPÍTULO V

DESARROLLO TEÓRICO

En éste capítulo se desarrollan las ecuaciones que se utilizaron en la derivación de una expresión de la tasa específica de crecimiento , en términos de los parámetros morfométricos de las hifas individuales y la colonia fúngica.

En un trabajo previo (Larralde Corona , 1992), se realizó el estudio de las cinéticas de germinación, tanto en medio líquido como en placa de agar, resultando ser, aproximadamente, un proceso de primer orden con respecto a la longitud L del túbulo germinal, tal y como se encuentra reportado en la literatura (Prosser, 1991; Carlsen *et al.*, 1996). Para completar el conocimiento de la cinética miceliar, se hizo la caracterización morfométrica de éstos, acción que marcó la diferencia con los enfoques propuestos por la literatura, pues ésto vino a complementar la información que se requería para realizar la propuesta de éste trabajo, dado que integró información micro y macroscópica en una sola expresión.

A continuación, se muestra la deducción de la ecuación de la tasa específica de crecimiento, en función de parámetros morfométricos de la hifa individual y de la colonia.

V.1 Modelo macroscópico de producción de biomasa

El crecimiento de una población microbiana, dentro de un sistema por lote, generalmente presenta una cinética de crecimiento sigmoideal, que comprende cuatro fases: retardo (lag), exponencial (log), estacionaria y muerte. Han sido propuestas varias expresiones para ajustar esta curva, las cuales generalmente contienen parámetros que no tienen necesariamente un sentido mecanístico o biológico, pero que, sin embargo, describen la tendencia de los datos experimentales adecuadamente.

Una de estas expresiones es la *ecuación logística*, que es un ajuste empírico a la curva de crecimiento (Okazaki *et al.*, 1980), y la cual considera que, al principio, el crecimiento es exponencial, con una tasa de crecimiento constante, característico de una fase en la que los elementos celulares son independientes unos de otros. Conforme pasa el tiempo, la tasa específica de crecimiento disminuye, hasta que, eventualmente, la población alcanza un valor límite (Koch, 1975). La forma de esta expresión es la siguiente:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad \dots(\text{V.1})$$

En esta ecuación, X_{\max} es un valor de biomasa límite del sistema, y el parámetro μ es aproximadamente la tasa específica de crecimiento observada en la fase exponencial de la curva (μ_{\max}), en donde $X < X_{\max}$, y la cual será considerada como el valor experimental de la tasa específica de crecimiento (μ_{obs}). La expresión logística ya ha sido utilizada por diversos autores (Okazaki *et al.*, 1980; Koch, 1975; Oriol *et al.*, 1988; Viniegra González *et al.*, 1993) en la descripción del cambio de la biomasa de un cultivo miceliar, tanto en crecimiento superficial como sumergido.

Se sabe que μ varía con la concentración del sustrato limitante, y que este cambio es descrito adecuadamente por la expresión de Monod (Monod, 1949) de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad \dots(\text{V.2})$$

Donde K_s es la constante de saturación, que corresponde al valor de concentración de sustrato en donde el valor de μ es de $\frac{1}{2}\mu_{\max}$. Las expresiones V.1 y V.2 han sido ampliamente utilizadas en el ajuste del crecimiento miceliar, ya que han demostrado su validez descriptiva.

Es común que, con altas concentraciones de sustrato, se presente una disminución en la tasa específica de crecimiento, lo cual puede ser descrito introduciendo en la Ec.V.2 un término de inhibición, de manera que se obtiene la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S \left(1 + \frac{S}{K_i} \right)} \quad \dots(\text{V.3})$$

Cuando $S \gg K_s$, y suponiendo que $K_i \gg K_s$, la ecuación V.3 puede reescribirse como:

$$\mu \cong \frac{\mu_{\max}}{1 + (S / K_i)} \quad \dots(\text{V.4})$$

Las ecuaciones anteriores han sido utilizadas, principalmente, para la descripción de la cinética de cultivo de poblaciones bacterianas, las cuales se reproducen por división binaria (Pirt, 1967); y

aunque los mohos no siguen precisamente este mecanismo de crecimiento, también presentan una "unidad de duplicación" definida (Trinci, 1974), por lo que pueden utilizarse estas expresiones para modelar su crecimiento, en sustratos con alta concentración de la fuente de carbono, tal y como ha sido demostrado por Oriol *et al.* (1988) y Gutiérrez Rojas *et al.* (1995). Cabe hacer notar que μ es un parámetro empírico, que se determina por el ajuste matemático de modelos del crecimiento de una masa de micelio, y que ésta masa generalmente se expresa en términos gravimétricos (g/L ó mg/cm²), según se trate de cultivos sumergidos o de superficie.

V.2 Modelo microscópico de producción de biomasa

La biomasa fúngica también puede ser caracterizada por su forma y tamaño, lo cual implica estudios de morfometría (Trinci, 1974; Packer y Thomas, 1992; Nielsen, 1993; Viniegra-González *et al.*, 1994; Larralde Corona, 1992). Los cambios morfométricos que pueden ser cuantificados son: cambio del radio de la colonia en el tiempo ($u_r = dR/dt$), longitud (L) y diámetro (D_h) de la hifas, tanto en el borde de la colonia como en un micelio individual. Estos parámetros pueden ser utilizados para describir el crecimiento de la colonia fúngica.

En los hongos filamentosos, ha sido observado (Steele y Trinci, 1975) que la elongación de las hifas, y la frecuencia de ramificación (Φ) de éstas, son variables interdependientes. Esta dependencia es inversa, es decir, una rápida extensión axial de la hifa provoca una menor producción de ramas, y viceversa (Trinci, 1974). La frecuencia de ramificación (Φ) es la velocidad específica de aparición de una nueva rama, es decir, el inverso del tiempo (τ) transcurrido, desde que una rama, con longitud L_0 , alcanza la longitud crítica L_c , después de la cual aparece una nueva rama. Viniegra González *et al.* (1993) propusieron que el fenómeno de ramificación puede ser aproximado considerándolo un proceso binario, que depende de la tasa de aparición de puntas (ramificación del micelio, Φ), y que éste cambio va a estar relacionada con un incremento en la biomasa, dado que las puntas son las partes activas, encargadas del crecimiento del micelio (Peberdy, 1994). Dado esto, la expresión, de primer orden, del incremento exponencial de la biomasa, puede ser igualada con el proceso de ramificación (aparición de puntas) de la siguiente manera:

$$\frac{X}{X_0} = e^{\mu\tau} = 2^{\Phi\tau} \quad \dots(V.5)$$

Considerando que Φ es el inverso τ , se reacomoda la ecuación anterior, para obtener una expresión para μ en función del tiempo característico τ , de la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} \quad \dots(\text{V.6})$$

La ecuación anterior es la conocida expresión para el cálculo del tiempo de duplicación, utilizada comúnmente en la Microbiología. En este caso fue derivada de la Eq. V.5, que considera a la ramificación como un proceso binario.

Para caracterizar a un micelio se requiere conocer la longitud crítica promedio (L_c) a la que se forma una nueva rama. Ésto se consigue fácilmente siguiendo el crecimiento a partir de la germinación (Trinci, 1974), hasta la aparición de la primera rama. Este proceso sigue, aproximadamente, una cinética de primer orden, tal y como ha sido demostrado por diversos autores (Trinci, 1974; Nielsen, 1992; Larralde Corona, 1992; Viniegra González *et al.*, 1993) expresándose como:

$$\frac{dL}{dt} = k_1 L \quad \dots(\text{V.7})$$

Al integrar considerando que al tiempo $t = \tau$, $L = L_c$, se obtiene la longitud crítica promedio como:

$$L_c = L_o e^{k_1 \tau} \quad \dots(\text{V.8})$$

Reacomodando la Ec. V.8, el valor de τ se obtiene de la siguiente forma:

$$\tau = \frac{\ln \left[\frac{L_c}{L_o} \right]}{k_1} \quad \dots(\text{V.9})$$

Por otro lado, el valor de dL/dt (Ec. V.7) también puede estimarse a nivel global, macroscópicamente, siguiendo el avance periférico superficial de la colonia, en donde la tasa promedio de extensión hifal correspondería a la tasa de extensión radial observada (u_r), tomándose en cuenta de esta manera a las hifas de crecimiento promedio, ya que son las que pueden ser observadas en el borde de la colonia. Siendo así considerada, la Ec. V.8 puede reescribirse como:

$$u_r = k_2 L_{av} \quad \dots(V.10)$$

Donde L_{av} es la longitud promedio de las hifas que crecen en el borde de la colonia (hifas distales), considerándola desde la punta hasta la intersección con la primera ramificación observable; y k_2 es la tasa específica de elongación. Cabe señalar que k_1 y k_2 presentan una relación del tipo : $k_2 = \alpha k_1$.

Igualando las Ecs. V.6 y V.9, se obtiene una expresión más simple para μ , como una función inversa de τ . Substituyendo la expresión para k_2 de la Ec. V.10, se obtiene una expresión para μ en función de u_r , L_c , L_{av} y L_o como:

$$\mu_{calc} = \frac{u_r}{\alpha L_{av}} \left(\frac{\ln 2}{\ln \left(\frac{L_c}{L_o} \right)} \right) \quad \dots(V.11)$$

Es importante hacer notar el hecho de que esta ecuación solamente utiliza parámetros morfométricos del micelio, para predecir la tendencia global de la biomasa. También se puede inferir que, aquellas condiciones fisicoquímicas que provoquen un cambio en la tasa específica de crecimiento (específicamente su valor máximo, en la etapa exponencial), van a ser evaluadas indirectamente a través de su efecto sobre la morfología de las hifas. Esto puede ser fácilmente verificado mediante la variación de la concentración de la fuente de carbono del medio, la cual se sabe tiene un efecto determinante sobre la longitud, diámetro y grado de ramificación del micelio (Trinci 1969, 1971).

Del seguimiento del crecimiento de la hifa individual, a tiempos largos, se ha observado (Trinci, 1971; Carlsen *et al.*, 1996) que la tasa de elongación presenta un comportamiento análogo al de la tasa específica de crecimiento, en la que se tiene una cinética de saturación tipo Monod, por lo que podemos utilizar ésta expresión para describir lo que sucede con la longitud hifal de la siguiente manera:

$$\frac{dL}{dt} = \frac{u_r L}{K_{SL} + L} \quad \dots(V.12)$$

Resolviendo para $t = \tau$ cuando $L = L_c$ se obtiene

$$\tau = \frac{1}{u_r} \left[K_{SL} \left(\ln \left[\frac{L_c}{L_o} \right] \right) + (L_c - L_o) \right] \quad \dots(V.13)$$

Con ésta expresión es posible calcular el valor de K_{SL} , el cual, se puede proponer, nos estaría indicando una longitud característica, que está relacionada con la velocidad de extensión radial (u_r) de la colonia. Es de hacerse notar que la Ec. V.13 toma en cuenta los fenómenos microscópicos (elongación individual) de las hifas.

La estimación de L_c puede ser obtenerse de mediciones en las fases tempranas del cultivo, cuando apenas empieza a ramificarse el micelio. Sin embargo, ésta fase parecen no ser, directamente, fisiológicamente equivalentes a lo que sucede con la colonia madura (Trinci, 1974; Gooday, 1995). Dado esto, se propone que también se realice la estimación del valor medio (L_{av}) de los segmentos distales de las hifas, en el borde de una colonia, donde el crecimiento se encuentra en estado estacionario, debido a que las hifas están en contacto con medio fresco (Pirt, 1967; Trinci, 1971). Es de esperarse que la distribución de longitudes siga una función de distribución normal o de Gauss (Molin *et al.*, 1992; Viniegra González *et al.*, 1993), y de que el valor promedio (L_{av}) sea un parámetro más importante en la descripción del micelio maduro.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRIMERA PARTE:

CRECIMIENTO FÚNGICO EN FORMA SUPERFICIAL DE *ASPERGILLUS NIGER*.

VI.1. Crecimiento fúngico colonial en medio sólido de agar.

Los experimentos sobre agar fueron realizados a dos niveles: crecimiento colonial (cajas con inoculación por piquete), y germinación (cajas con inoculación tipo césped). Se siguió el crecimiento individual promedio de las hifas, desde la germinación de las esporas, hasta la aparición de las primeras ramificaciones; y se cuantificó el comportamiento colonial, morfométricamente, tomando en cuenta a las hifas distales, y gravimétricamente, mediante el peso seco del micelio (cajas con inoculación tipo césped). Se utilizaron las concentraciones de glucosa (S_0) de: 10, 40, 70, 120 y 300 g/L, a una relación C/N de 12.

A continuación se muestran los resultados obtenidos. Primeramente, para las colonias (velocidad de extensión radial y longitud de sus hifas distales). Después se abordarán los resultados para las hifas durante la etapa de germinación. Finalmente se presentan los resultados de biomasa total sintetizada por la colonia (y su tasa específica de crecimiento, μ_{obs}), y la predicción obtenida (μ_{calc}) utilizando la expresión propuesta (Ec.V.11).

VI.1.1. Velocidad de extensión radial (u_r).

La velocidad de extensión radial fue cuantificada como, el cambio del radio de la colonia en el tiempo, obteniéndose un comportamiento lineal ($r^2=0.99$) reproducible, y una alta circularidad de las colonias, para todas las concentraciones de glucosa (Fig.VI.1.1).

Inicialmente se probó un amplio rango de concentraciones de glucosa (0.1, 1, 10, 40, 70, 100, 120, 200 y 300 g/L), a una relación C/N de 12, para conocer el comportamiento de éste parámetro ampliamente (Figura VI.1.2).

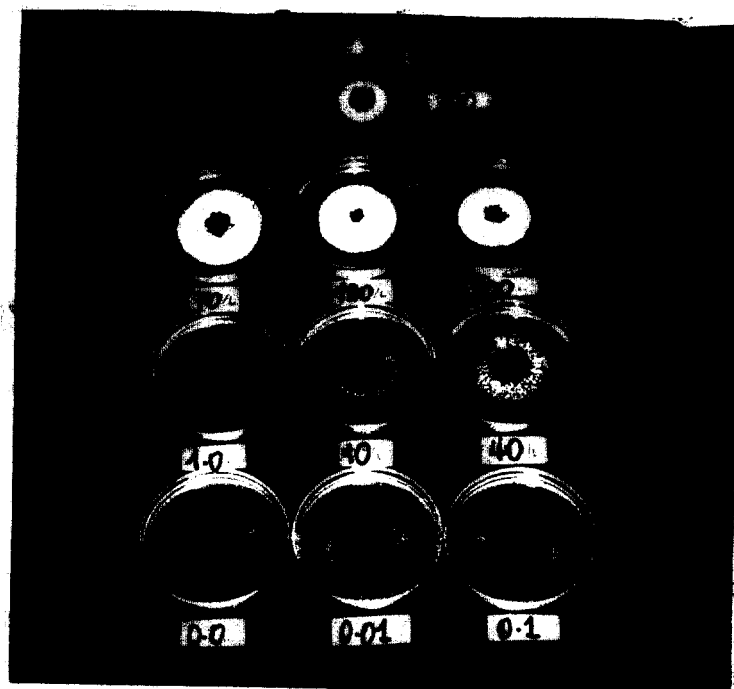


Figura VI.1.1. Colonias de *A. niger* a las 96 horas, a varias concentraciones iniciales de glucosa (0, 0.01, 0.1, 1, 10, 40, 70, 120, 200 y 300 g/L).

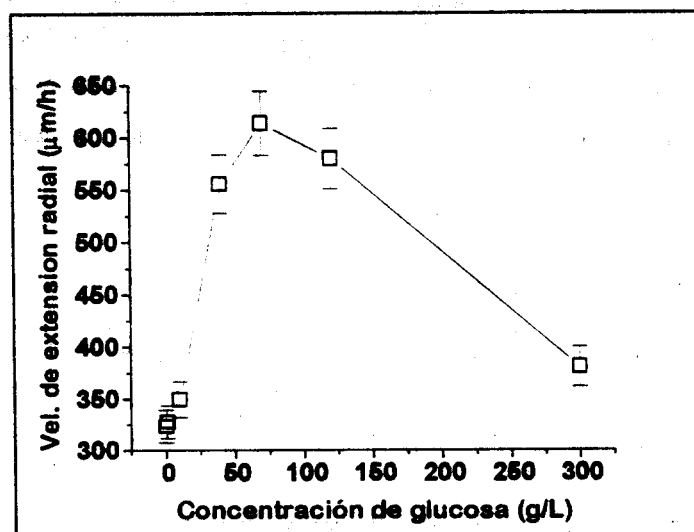


Figura VI.1.2. Efecto de la concentración inicial de glucosa en la velocidad de extensión radial de *A. niger* (valores promedio de 3 experimentos).

Se encontró que la u_r era prácticamente la misma para los niveles mas bajos de glucosa ($S_0=0.1$, 1 y 10 g/L), aún y cuando existía una diferencia de dos órdenes de magnitud en la concentración. Este resultado indicó que, si bien la densidad de biomasa (hifas por cm^2) era diferente a estos 3 valores de glucosa (Fig.VI.1.1), la tasa de elongación de la colonia era la misma, por lo que, aunque sintetizando menos biomasa, la invasividad de la colonia (en cuanto a distancia cubierta) se mantiene. Este es un mecanismo de adaptación de los mohos bien conocido, en el cual, para un rango dado de concentración de la glucosa, se mantiene la u_r aproximadamente igual, pero varían el grado de ramificación del micelio (Trinci, 1971; Koch, 1975).

La u_r presentó un incremento a concentraciones de glucosa mayores de 10 g/L, observándose una región de velocidad máxima en el rango de glucosa de 40 a 120 g/L. Para concentraciones de glucosa más altas, la u_r disminuyó. Sin embargo, la densidad de micelio de las colonias era mayor, como pudo ser corroborado mediante la cuantificación de la concentración de biomasa.

Con el propósito de verificar si el efecto observado sobre u_r se debía, efectivamente, a la concentración de glucosa, o a la relación C/N del medio, se realizaron experimentos (Tabla VI.1.1) en los que, a una concentración inicial de glucosa de 1 g/L en todos los casos, se varió el valor de la relación C/N (0.12, 1.2, 12 y 120) modificando la concentración de los compuestos nitrogenados. Los valores de u_r se compararon con los obtenidos al dejar fija la concentración de compuestos nitrogenados en 1 g/L, y variar la concentración de glucosa (0.1, 1, 10 y 100 g/L), para obtener los mismos valores de C/N que el caso anterior.

Tabla VI.1.1. Variación de la velocidad de extensión radial (u_r) de *A. niger* con la relación C/N y la concentración de compuestos nitrogenados (urea y sulfato de amonio).

C/N	Glucosa = 1 g/L		Nitrogenados = 1 g/L	
	Nitrog.(g/L)	u_r ($\mu m/h$)	Glucosa	u_r ($\mu m/h$)
0.12	10	332 ± 13	0.1	285 ± 12
1.2	1	313 ± 12	1	322 ± 13
12	0.1	298 ± 7	10	355 ± 12
120	0.01	314 ± 9	100	673 ± 11

(Presentado en Larralde *et al.*, 1993).

Lo que se observa en la Tabla VI.1.1 es que, la velocidad de extensión radial es muy similar en todos los casos en los que se tiene un mismo nivel de glucosa, independientemente del valor de C/N, aún y cuando éste se varió en 3 órdenes de magnitud. Cuando se tenía una concentración fija de glucosa (1 g/L), el variar la relación C/N (moviendo la concentración de nitrogenados) no tuvo un

efecto apreciable sobre la u_r , la cual tomó un valor promedio de $314 \pm 14 \mu\text{m/h}$. Sin embargo, cuando se fijó la concentración de compuestos nitrogenados (1 g/L), variándose la glucosa, se pudo notar que, primeramente, el valor de u_r obtenido a 1 g/L de glucosa ($322 \mu\text{m/h}$) corresponde efectivamente al valor promedio anterior; también se observa que el valor de u_r obtenido a 100 g/L de glucosa es prácticamente el doble ($673 \mu\text{m/h}$) que los obtenidos a las concentraciones de glucosa más bajas, aún y cuando están nutricionalmente más balanceados (menor C/N).

Se decidió de ésta manera que era adecuado trabajar en el rango de concentración de glucosa de 10 a 300 g/L (C/N=12), porque en ésta zona era donde se observaba un efecto mayor la velocidad de extensión radial, y sobre la concentración de biomasa (como se verá posteriormente), además de ser una región de interés práctico, dada la habilidad de este organismo de crecer en condiciones de estrés osmótico, como son las que imponen altas concentraciones de glucosa. A éste respecto podemos mencionar las observaciones de Gervais *et al.* (1988), los cuales, utilizando polietilenglicol para disminuir la a_w del medio, encontraron que existe una región óptima, fuera de la cual u_r disminuye. En nuestro caso, la alta concentración de glucosa va a estar efectivamente deprimiendo la a_w del medio, siendo el valor mínimo utilizado de aproximadamente 0.93 a 300 g/L de glucosa (Oriol, 1987).

VI.1.2. Longitud distal promedio (L_{av}) y longitud distal máxima (L_{max}).

En el borde de las colonias de *A. niger* se realizó la medición de las hifas distales, desde la punta hasta la intersección con la primera ramificación visible. Generalmente ésto no representó ningún problema, pues en todos los niveles de glucosa era posible observar hasta 3 ramificaciones, antes de que el micelio fuera una masa compacta. La longitud máxima se consideró como aquel valor experimental más grande de la distribución de longitudes distales, el cual resultó ser, aproximadamente, la media más dos veces la desviación estándar (Tabla VI.1.2).

Tabla VI.1.2. Parámetros morfométricos de las colonias de *A. niger*, a las diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

Glucosa (g/L)	u_r ($\mu\text{m/h}$)	L_{av} (μm)	L_{max} (μm)
10	346 ± 18	218 ± 94	542
40	556 ± 28	542 ± 272	1219
70	614 ± 31	461 ± 254	1200
120	580 ± 29	452 ± 228	874
300	381 ± 19	642 ± 291	1166

Como se puede observar en la Tabla VI.1.2, la longitud distal (L_{av}), obtenida a la concentración de glucosa de 10 g/L, es la menor, y la obtenida a 300 g/L es la mayor. Para el rango de concentración de 40 a 120 g/L, la L_{av} tiene un valor prácticamente constante, considerando la desviación estándar de los valores. Al comparar los valores de la velocidad de extensión radial de la colonia (u_r) con la longitud promedio de las hifas (L_{av}), se puede notar que éstos parámetros no varían de la misma manera con la concentración de glucosa, como pudiera esperarse. Esto ha sido atribuido (Molin *et al.*, 1992) a la distribución de ángulos de ramificación del micelio, los cuales no fueron medidos en este trabajo.

VI.1.3. Elongación del túbulo germinal: longitud crítica promedio (L_c) y tasa específica de elongación (k_1).

El proceso de germinación tuvo lugar dentro de las primeras veinte horas, después de la inoculación de las esporas. Se siguió la elongación de los túbulos germinales, encontrándose que éste proceso, hasta la aparición de la primera ramificación, sigue una cinética sigmoidal (Fig. VI.1.3). Se puede notar que, en el nivel de glucosa de 300 g/L, el proceso de germinación presentó un retraso de aproximadamente 6 horas, con respecto al resto de las concentraciones de glucosa. Esto indicó que las esporas tenían inhibido el proceso de emergimiento del túbulo. Este comportamiento de retraso de la germinación, en medios con alta concentración de glucosa ha sido observado, para la misma cepa de *A. niger*, por Oriol (1987) quien lo atribuye a la baja actividad de agua que provoca el azúcar en el medio (aprox. 0.93 a 300 g/L de glucosa), que es un valor bastante bajo, considerando que, en general, para los mohos el valor óptimo se encuentra alrededor de 0.98 (Gervais *et al.*, 1988), que corresponde a una concentración de glucosa de 86 g/L (Oriol, 1987).

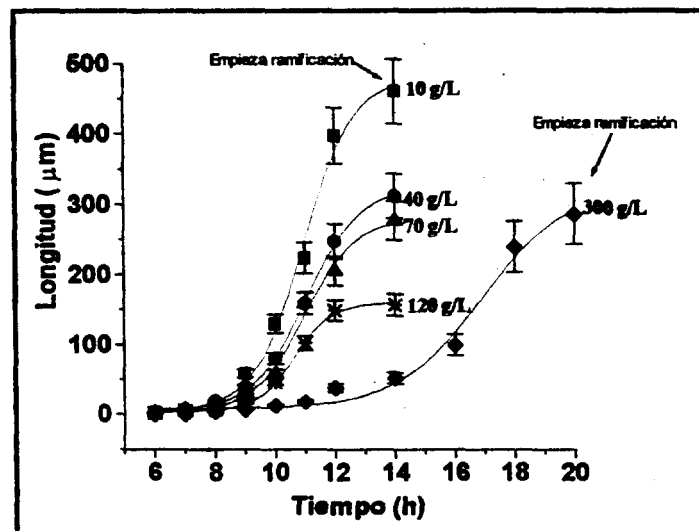


Figura VI.1.3. Curvas de elongación del túbulo germinal de *A. niger*, en agar. Se indican las concentraciones iniciales de glucosa y el tiempo en que aparece la primera ramificación, a la longitud crítica L_c .

La longitud máxima alcanzada por el túbulo germinal, al momento de presentarse la primera ramificación, se denominó longitud crítica (L_c). Como se puede ver en la Fig.VI.1.3 (y numéricamente en la Tabla VI.1.3), en el rango de concentración de glucosa de 10 a 120 g/L, a menor glucosa, mayor fue el valor de L_c . Para 300 g/L de glucosa, el valor de L_c obtenido se incrementó, con lo que salió del patrón mostrado por las concentraciones anteriores. Así, tenemos que el túbulo presenta un mecanismo de elongación, dependiente de la concentración exterior de sustrato, y el cual determina que, al haber un bajo nivel de éstos, la hifa principal (túbulo germinal) debe alcanzar una mayor longitud, para garantizar de esta manera, una invasividad máxima del sustrato.

Una vez concluido el proceso de germinación, el proceso de elongación continuó, después de un breve período de reposo, con el aumento exponencial de la longitud total del micelio, debido a la aparición de ramificaciones, lo cual puede considerarse un patrón común, pues ha sido observado para otros mohos (Trinci, 1974; Koch, 1975; Carlsen *et al.*, 1996). Este aumento exponencial de la longitud concuerda con el aumento exponencial de la biomasa observado en el período vegetativo, ya que cada nueva ramificación creada es una nueva punta en crecimiento. Sin embargo, cabe aclarar que la elongación de la hifa principal, una vez que comienza el proceso de ramificación, para algunos mohos es lineal (Trinci, 1969).

Dada la forma de las curvas fue posible calcular una tasa específica de elongación (k_1), que resultó ser, en promedio, 3.5 veces el valor correspondiente de μ_{obs} (Tabla VI.1.3). Es de hacerse notar que, según ha sido reportado por Carlsen *et al.* (1996), la tasa específica de elongación corresponde, en valor, a la tasa específica de crecimiento de la biomasa, siempre y cuando se mida la longitud total del micelio en la fase vegetativa. Entonces tenemos que, la fase de germinación, con su característica de contar con una sola hifa en crecimiento (túbulo germinativo), presenta una velocidad específica mayor que la que se establece posteriormente, durante el crecimiento vegetativo. Esta observación contradice lo observado al respecto por Gooday (1995), en cuanto a que las hifas juveniles, de muchas especies de mohos, crecen más lentamente, y son más delgadas, que las hifas maduras de sus colonias.

El producto $k_1 L_c$ (Tabla VI.1.3) indica la máxima velocidad de elongación, siendo éste producto decreciente con el aumento de la concentración de glucosa. Cabe señalar que el producto $k_1 L_c$ se comporta de una forma muy distinta que u_r , indicando que la extensión apical promedio de una colonia (u_r) no es igual que la velocidad máxima de una hifa aislada y recién germinada.

Con los datos de elongación, a cada concentración de glucosa, se calcularon los valores de la longitud de saturación (K_{sl}), los cuales fueron similares para todas las concentraciones, excepto para el medio con 10 g/L, siendo sus valores del orden de la longitud máxima (L_{max}) alcanzada por las hifas distales (Tabla VI.1.2), para cada nivel de glucosa; los valores obtenidos fueron 526, 924, 1047, 1085 y

965 μm , para 10, 40, 70 120 y 300 g/L de glucosa, respectivamente. Este parámetro difiere de la constante de saturación de Monod (Monod, 1949), puesto que es una función de la concentración de glucosa.

VI.1.4. Diámetro hifal (D_h).

Los niveles de glucosa utilizados hicieron variar, de manera significativa, el diámetro promedio de las hifas, tanto de las distales como de los túbulos germinales, presentándose el mismo diámetro para ambos tipos de hifas. La variación observada fue del tipo de decaimiento exponencial, obteniéndose el mayor diámetro a 10 g/L de glucosa.

Mecanicamente, el modo en que el diámetro de la hifa va a quedar establecido no está completamente elucidado, sin embargo, parece ser que el papel de la presión de turgor del citoplasma es vital en este proceso (Money, 1990), así como la velocidad de rigidización de la pared recién creada en la punta (Farkaš, 1990), y la velocidad de desplazamiento de la estructura citológica (cuerpo apical) encargado de acumular a las vesículas (Bartnicki-García *et al.*, 1989), por lo que las condiciones del medio que alteren estos parámetros van a estar determinando el diámetro promedio de las hifas.

Tabla VI.1.3. Parámetros morfométricos del túbulo germinal.

Glucosa (g/L)	L_c ¹ (μm)	D_h ¹ (μm)	k_1 ² (h^{-1})	$k_1 L_c$ ($\mu\text{m}/h$)	$\pi D_h k_1$ ($\mu\text{m}^2/h$)
10	461 \pm 240	6.32 \pm 0.69	0.71	327	14.1
40	312 \pm 150	5.44 \pm 0.90	0.68	212	11.6
70	277 \pm 155	4.95 \pm 0.64	0.67	185	10.4
120	157 \pm 70	4.85 \pm 0.84	0.63	99	9.6
300	286 \pm 160	3.37 \pm 0.36	0.39	111	4.1

1. \pm Desviación estándar (n=60).

2. Constante de pseudo primer orden ($dL/dt=k_1L$)

La variación del diámetro de las hifas, debida a la fuente de carbono (Wiebe y Trinci, 1991) y al tipo de medio de cultivo (Fiddy y Trinci, 1975) es un fenómeno que ha sido observado en diversas especies de hongos. Algunos autores han observado una relación positiva entre el diámetro hifal (D_h) y la tasa de extensión (k_1) de las hifas individuales, ciertas especies de mohos (Prosser, 1991). Si se utiliza un sencillo modelo de balance de material, se puede demostrar que, la velocidad de área formada en la punta de las hifas es $Q_a = \pi D_h k_1$. Esta función disminuyó al aumentar la concentración de glucosa (Tabla VI.1.3). La formación de pared se atribuye al depósito de vesículas precursoras (Bartnicki-García, 1973). Esta observación sugiere que ese proceso se inhibe por el aumento de glucosa ($S_0 > 10$ g/L).

VI.1.5. Evolución de la biomasa: tasa específica de crecimiento (μ_{obs}).

La evolución de la concentración de biomasa presentó un comportamiento sigmoideal, en todos los niveles de glucosa, por lo cual fue posible calcular la tasa específica de crecimiento (μ_{obs}), utilizándose para ello la expresión logística (Ec. V.1). Los valores obtenidos se muestran junto a las correspondientes curvas (Fig.VI.1.4).

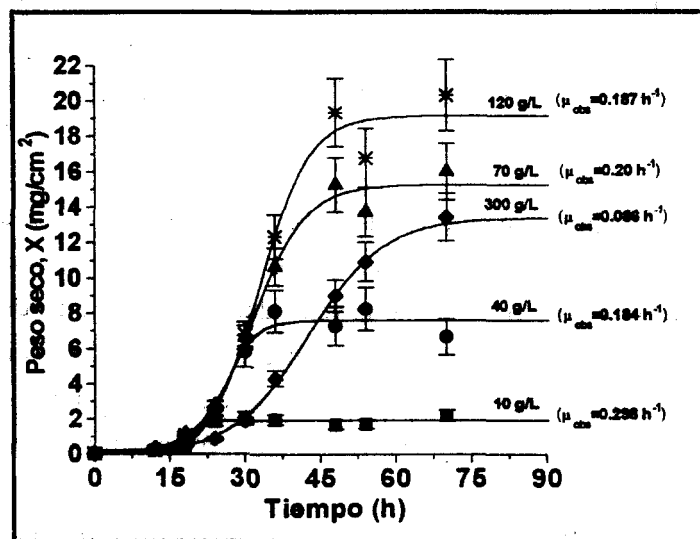


Figura VI.1.4. Evolución de la biomasa de colonias de *A.niger* a diferentes concentraciones de glucosa, y los valores de μ_{obs} obtenidos.

La tasa específica de crecimiento (μ_{obs}), mostró un comportamiento inverso (del tipo decaimiento exponencial) con la concentración de glucosa. La μ_{obs} obtuvo su valor más alto ($0.3 h^{-1}$) a la menor concentración de glucosa (10 g/L), mientras que la menor μ_{obs} ($0.09 h^{-1}$) se observó a la mayor concentración de glucosa (300 g/L). Entonces, el presentar una alta tasa específica de crecimiento, constituye otro mecanismo de utilización de los sustratos, ya que, en el caso de haber pocas posibilidades nutricionales en el medio, se llega más rápidamente a la concentración final de biomasa, alcanzándose la fase estacionaria (donde cambia el metabolismo) más temprano.

VI.1.6. Predicción de la tasa esp. de crecimiento de la colonia (μ_{calc}).

Dado que el objetivo principal de este trabajo, era el de lograr estimar la tasa específica de crecimiento, en función de los parámetros morfométricos (μ_{calc}) del moho, se procedió a realizar los cálculos utilizando la expresión propuesta (Ec.V.11), para comparar sus resultados con los valores de μ_{obs} (obtenidos del ajuste de los datos de peso seco).

De los datos experimentales obtenidos se observó que, para describir el crecimiento superficial colonial de *A. niger*, los parámetros medidos fueron los adecuados, es decir: u_r , L_c , L_{av} y D_h (en el lugar de L_0), siendo la constante α de 0.94. Con esto, la expresión utilizada fue la siguiente

$$\mu_{calc} = \frac{u_r}{0.94 L_{av}} \left(\frac{\ln 2}{\ln(L_c/D_h)} \right)$$

La bondad de ajuste del modelo propuesto se muestra, más claramente, en una gráfica tipo observado vs. predicho (Fig. VI.1.5).

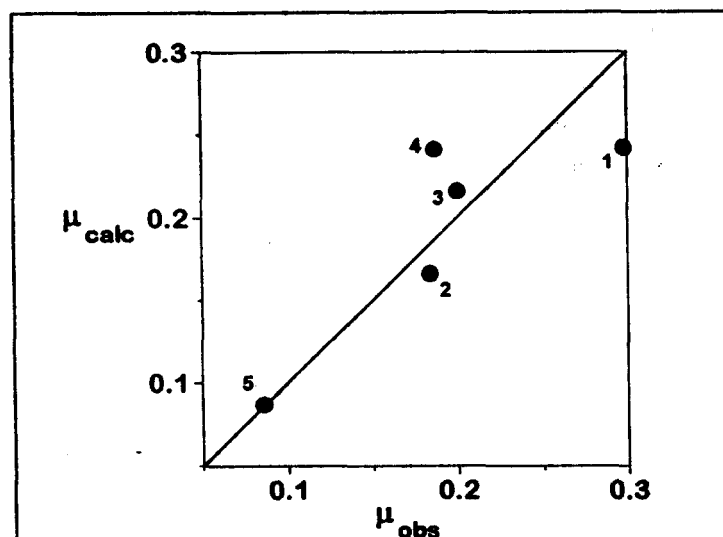


Figura VI.1.5. Comparación tipo observado-predicho para la tasa específica de crecimiento de *A. niger* en caja Petri. Las concentraciones iniciales de glucosa son: 1) 10 g/L, 2) 40 g/L, 3) 70 g/L, 4) 120 g/L y 5) 300 g/L.

La pendiente calculada del ajuste fue de 0.98, por lo que se puede afirmar que la expresión propuesta predice los valores de la tasa específica de crecimiento de la colonia de *Aspergillus niger* de manera aceptable.

VI.1.7. Conclusiones del crecimiento fúngico superficial de *A. niger*.

Los parámetros morfométricos cuantificados, tanto a nivel de germinación como en el borde de la colonia, en términos de longitudes características promedio, fueron comparados para ver si existía una relación directa entre ellos.

Las hifas que crecían en el borde de la colonia (distales) alcanzaron una mayor longitud promedio (L_{av}) que la de los túbulos germinativos (L_c). Esto parece indicar el efecto de la masa miceliar de la colonia, que aporta o canaliza nutrientes hacia las puntas, aumentando así su potencial de crecimiento. Ésta es una observación común para distintas cepas de hongos filamentosos, tales como *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* (Trinci, 1974; Steele y Trinci, 1975). La importancia de la masa miceliar, en el establecimiento de la velocidad de crecimiento, fue comprobada al corroborar que, si se utilizaba la L_{av} , en lugar de L_c en la expresión de μ_{calc} , se obtenía una mejor predicción de los valores de μ_{obs} .

El diámetro hifal, en cambio, fue el mismo en las hifas distales y en los túbulos germinativos, por lo cual se puede afirmar que éste parámetro establece su valor final desde la germinación, y corresponde al diámetro de las hifas principales.

En conclusión, para el crecimiento superficial de *A. niger*, la medición en las colonias de los parámetros u_r , L_c , L_{av} y D_h permite estimar la tasa específica de crecimiento del micelio denso (colonia). Es decir, para la forma de crecimiento superficial, se validó la relación funcional de los parámetros morfológicos de la colonia con su cinética de producción de biomasa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

SEGUNDA PARTE:

CRECIMIENTO FÚNGICO EN FORMA DISPERSA DE *GIBBERELLA FUJIKUROI*

VI.2. Crecimiento fúngico disperso en medio líquido.

El moho *Gibberella fujikuroi* fue utilizado como modelo para el crecimiento, con morfología dispersa, en medio líquido. Cabe señalar que éste moho es de menor velocidad de crecimiento, en medio sólido, que *A. niger*, motivo por el cual, según lo observado por Royer y Rouleau (1985) es que, en cultivo líquido no forma agregados, sino crece únicamente en forma filamentosa dispersa. Se utilizaron medios con diferente composición en cuanto a las relaciones de glucosa-almidón, pero conservándose la cantidad de carbohidratos (80 g/L).

Los experimentos fueron realizados, para cuantificar los parámetros morfométricos (u_r , D_h , L_{av} y L_{av}) y la biomasa (X y μ_{obs}) en un fermentador de 3 litros.

Primeramente se muestran los resultados para el crecimiento en caja Petri. Luego, los resultados de producción de biomasa en el fermentador, expresados como la tasa específica de crecimiento (μ_{obs}), la cual es comparada con el valor predicho (μ_{calc}) por la expresión propuesta (Ec.V.11).

VI.2.1. Velocidad de extensión radial (u_r).

De cajas inoculadas por piquete se cuantificó el cambio del radio de la colonia en el tiempo. Los diferentes niveles de glucosa en el medio, no afectaron significativamente el valor de u_r (Tabla VI.2.1), la cual tuvo un valor promedio de $101 \pm 5.07 \mu\text{m/h}$.

VI.2.2. Diámetro hifal (D_h) y longitud distal (L_{av}).

En las cajas donde se midió la u_r , también fue cuantificada la longitud promedio de las hifas distales (L_{av}) y su diámetro (D_h). Los valores se presentan a continuación (Tabla VI.2.1).

Tabla VI.2.1. Parámetros morfométricos de las colonias de *G. fujikuroi*, a diferentes mezclas de glucosa-almidón (gluc/(gluc.+almidón).

% C de glucosa	u_r ($\mu\text{m}/\text{h}$)	D_h (μm)	L_{av} (μm)
0.0	100 \pm 11	2.38 \pm 0.20 ^a	250 \pm 128
25.0	104 \pm 12	ND	215 \pm 100
37.5	93 \pm 10	ND	136 \pm 48
50.0	103 \pm 9	ND	106 \pm 35
62.5	102 \pm 8	2.63 \pm 0.23 ^{bc}	103 \pm 55
75.0	109 \pm 12	ND	172 \pm 73
87.5	102 \pm 10	ND	145 \pm 51
100	95 \pm 8	2.87 \pm 0.20 ^c	151 \pm 43

\pm Desviación estándar

a, b, c grupos significativamente diferentes, a un nivel de 0.05.

ND. No determinado, pero se utilizó el diámetro promedio de 2.6 mm.

Como se puede observar, excepto por el primer caso (%glucosa=0), los parámetros morfométricos tuvieron poca variación. Sin embargo, éste pequeño cambio fue suficiente para determinar diferentes valores de las tasas específicas calculadas, reflejando adecuadamente lo observado con la tasa específica de crecimiento de la biomasa.

VI.2.3. Longitud crítica (L_c) en sólido y líquido.

Se midió la longitud crítica de ramificación, ya dentro de la etapa vegetativa, tanto en los cultivos en caja Petri, como en matraces agitados, para establecer el efecto de la composición del medio, y su estado físico, sobre ésta variable.

Los resultados muestran (Tabla VI.2.2), como tendencia general, que a mayor proporción de glucosa, menor L_c , para ambos tipos de medio. Éste resultado es similar al obtenido para *A. niger*, y parece indicar que, a mayor disponibilidad del sustrato de fácil asimilación (glucosa), la creación de ramificaciones se favorece sobre la elongación de la hifa principal. La longitud crítica fue ligeramente mayor para medio sólido que para el líquido.

A diferencia de lo observado en el caso de *A. niger*, la longitud crítica para ambos tipos de medio fue similar. El parámetro predominante en el establecimiento del distanciamiento de las ramas de *G. fujikuroi* fue también la concentración de glucosa, y no el estado físico del medio. Esta diferencia entre mohos pudiera deberse a las velocidades relativas de crecimiento de ambos, lo cual podría

significar que, en un caso (*A. niger*) el paso limitante del crecimiento fuera el transporte del sustrato del medio al interior de las hifas; mientras que en el otro caso (*G. fujikuroi*) fuera la velocidad de utilización de éste sustrato, ya dentro de las hifas.

Tabla VI.2.2. Longitud crítica de las hifas de *G. fujikuroi*, en diferentes tipos de medio (sólido y líquido).

% de Glucosa	L_c	
	Medio sólido	Medio líquido
0	383 ± 87 ^a	308 ± 65 ^b
60	265 ± 67 ^{bcd}	240 ± 53 ^{cd}
100	280 ± 49 ^{bc}	226 ± 51 ^d

± Desviación estándar

a, b, c, d grupos significativamente diferentes, a un nivel de 0.05.

VI.2.4. Predicción de la tasa específica de crecimiento (μ_{obs}).

El crecimiento de *G. fujikuroi* en cultivo líquido presentó, efectivamente, morfología filamentosa. De cultivos en el fermentador fue cuantificada la biomasa, presentando tasa específicas de crecimiento más bajas que *A. niger*. La μ_{obs} presentó un comportamiento parabólico, con un máximo en la relación de 62.5% de glucosa.

Al realizarse los cálculos con la expresión propuesta (Ec.V.11), se observó que los parámetros que dieron la mejor predicción fueron: u_r , L_{av} , L_c , D_h (como L_0) y $\alpha=1/2$. Esto parece indicar que, la morfometría característica (relaciones dimensionales) para cada especie es diferente. Sin embargo, fue posible predecir satisfactoriamente (Fig.VI.2.1) la tasa específica de crecimiento, en cultivo líquido, para *G. fujikuroi*, utilizando la misma expresión básica, por lo que se puede afirmar que, efectivamente, se están tomando en cuenta los fenómenos cinéticos adecuados. La expresión propuesta quedó de la siguiente manera:

$$\mu_{calc} = \frac{u_r}{\frac{1}{2} L_{av}} \left(\frac{\ln 2}{\ln \left(\frac{L_c}{D_h} \right)} \right)$$

Si bien los parámetros necesarios para predecir la μ son los mismos que en el caso de *A. niger*, vemos que la constante α es de la mitad. Dado que el parámetro α es una relación de constantes cinéticas, en las etapas de germinación y crecimiento colonial, se puede proponer que, en el caso de *G. fujikuroi*, la velocidad específica de elongación que se establece en cada una de éstas etapas es diferente.

La comparación de los valores calculados, de las tasas específicas de crecimiento, con los obtenidos gravimétricamente, muestran que la línea de ajuste lineal para los datos tiene una pendiente de 0.98, cercana a la recta ideal de 45°. Esto permite afirmar que la predicción, al igual que con *A. niger*, es buena.

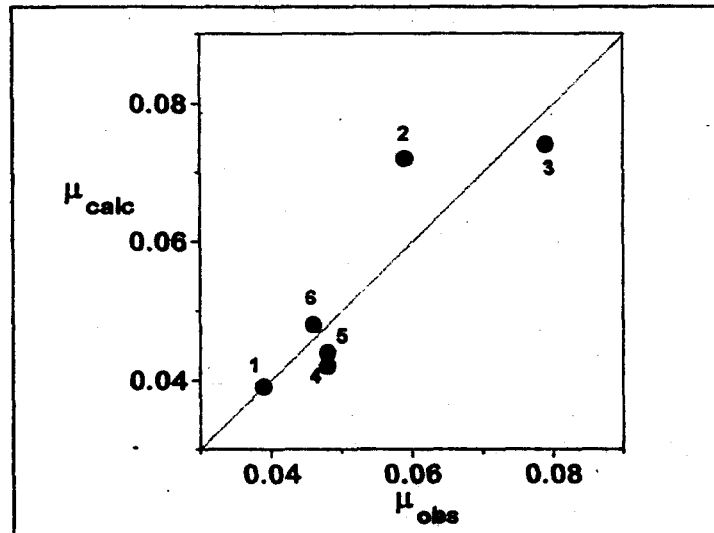


Figura VI.2.1. Comparación tipo observado-predicho para la tasa específica de crecimiento de *G. fujikuroi* en cultivo líquido. Las proporciones de glucosa son: 1) 25%, 2) 50%, 3) 62.5%, 4) 75%, 5) 87.5% y 6) 100%.

VI.2.5. Conclusiones del crecimiento fúngico disperso de *G. fujikuroi*.

Los parámetros morfométricos de las colonias (crecimiento en medio sólido) de éste moho fueron adecuadas para describir el comportamiento de la biomasa en cultivo sumergido. Este enfoque es similar al utilizado por Trinci (1971). Sin embargo, la expresión por él propuesta no toma en cuenta el diámetro de las hifas, y por lo que se observado, este es un parámetro fundamental en la descripción de la biomasa de los mohos. En algunas especies incluso se puede ver que existe una relación entre el diámetro y la tasa de elongación de las hifas (Gooday, 1995).

En conclusión, para el crecimiento de *Gibberella fujikuroi*, la medición de los parámetros u_r , L_v , L_c y D_h , permitió estimar la tasa específica de crecimiento de los cultivos sumergidos, con morfología dispersa. Esto quiere decir que la colonia de *G. fujikuroi* también contiene la información morfométrica necesaria para describir el crecimiento disperso del micelio. Esta conclusión es muy importante, ya que justifica al sistema de caja Petri, como una forma confiable de realizar estudios básicos de fisiología, y a la expresión propuesta como una herramienta adecuada para la descripción del crecimiento de las hifas de dos mohos, de diferentes longitudes y tiempos característicos de crecimiento, especialmente cuando los cultivos por analizar son relativamente lentos y dispersos, como es el caso de *Gibberella fujikuroi*.

CONCLUSIÓN GENERAL

En el capítulo V se presentaron los antecedentes teóricos, utilizados para proponer una expresión que tomara en cuenta, tanto a los fenómenos macroscópicos, del aumento del diámetro de la colonia y la producción exponencial de biomasa, como al fenómeno microscópico de elongación del túbulo germinal, así como la consideración de que existe un tiempo específico de duplicación.

Si bien todos éstos factores ya han sido estudiados de manera independiente para diferentes microorganismos, la novedad de éste trabajo es que logra integrar, y utilizar, éstos parámetros, para describir la tasa específica de crecimiento de la biomasa (μ) de dos casos particulares: *Aspergillus niger*, creciendo superficialmente en una placa de agar, sujeto a diferentes concentraciones iniciales de glucosa; y *Gibberella fujikuroi*, creciendo en forma filamentosa dispersa, en cultivo líquido, a diferentes relaciones de mezclas glucosa-almidón.

Al proponer la expresión para la μ , se observó que se expresaba en función de dos longitudes diferentes: la longitud crítica (L_c), obtenida de hifas individuales, en la etapa de germinación, y de la longitud distal promedio (L_{av}) obtenida en el borde las colonias, durante el crecimiento vegetativo. Es conocido (Trinci, 1974) que existen dos niveles de maduración del micelio, por lo que las longitudes características para cada uno de éstos niveles son distintas. En micelios jóvenes aplica la unidad de crecimiento hifal (HGU), que es la longitud promedio de la hifa que contribuyen con protoplasma a la extensión de la punta; mientras que en colonias maduras debe referirse a el ancho de la zona de expansión (w), que es la longitud de las hifas que contribuyen, con protoplasma, a la extensión de las puntas distales.

La expresión derivada contempla una relación (α) entre las velocidades específicas de elongación de las etapas de germinación y crecimiento colonial. Para cada uno de los mohos utilizados, se encontró que esta relación era diferente, siendo de 1 para *A.niger* y de 0.5 para *G. fujikuroi*. Sería necesario medir este parámetro en diferentes especies, para dilucidar los factores que determinan el valor de α . A priori, se propone que la diferencia encontrada en este trabajo es debida a las cinéticas relativas de crecimiento de cada moho.

En este trabajo se observó que la expresión propuesta describió satisfactoriamente la tasa específica de crecimiento de la biomasa, para ambos microorganismos; sin embargo, en el caso de *A. niger*, la longitud promedio de las hifas distales (L_{av}) resultó dar un mejor ajuste al utilizarla en lugar de

Lc. Esto indica que esta longitud puede ser considerada característica, y descriptiva del crecimiento vegetativo de este mohó en caja Petri.

En el caso de *G. fujikuroi*, el utilizar ambas longitudes resultó en el mejor ajuste, para describir el crecimiento sumergido filamentoso. Al parecer, este tipo de crecimiento es análogo al que presenta el borde de la colonia (creciendo sobre agar), ya que los parámetros medidos en este sistema predijeron adecuadamente el crecimiento sumergido. Una explicación que se tiene para esto es la siguiente: las hifas distales, a diferencia de las partes centrales de la colonia, siempre están en condiciones de máxima concentración de sustratos, por lo que su velocidad de crecimiento es limitada internamente, por la velocidad de transformación del sustrato en precursores, y la utilización de éstos. Este hecho es, de alguna manera, análogo a lo que sucede en medio líquido, en donde, por su naturaleza de continuo mezclado y homogenización del medio, las hifas están siempre a las condiciones de concentración de sustrato máxima posible, de ahí que las limitaciones del crecimiento sean, igualmente, internas.

El poder contar con una expresión que relacione la morfometría del micelio con la tasa específica de crecimiento de la biomasa, permite tener una herramienta más para el estudio de los mohos, y constituye un nuevo acercamiento para plantear modelos de crecimiento estructurados.

La importancia de este trabajo es que propone una nueva manera de evaluar la tasa específica de crecimiento de los organismos filamentosos, y que tiene que ver únicamente con la geometría de sus hifas y la velocidad de extensión de sus colonias. La expresión propuesta demostró ser de validez para dos tipos de crecimiento: superficial y filamentoso disperso, evaluados en dos mohos de diferente especie y género.

El uso del análisis de imágenes resulta promisorio, dados los avances y mejoras que se dan día a día en el campo, y resulta realista suponer que, en un futuro, ésta técnica sea la base de instrumentos de monitoreo (con fines de control), de sistemas de fermentación con mohos crecidos en superficie o como micelio disperso.

RECOMENDACIONES

A continuación, quisiera proponer algunas líneas que pudieran ser interesantes de seguir, para redondear y sacarle más provecho a éste trabajo.

Sería muy interesante verificar si la L_{av} es, efectivamente, un parámetro válido en la descripción del crecimiento, en medios sólido y líquido, para un mayor número de mohos.

Se tendrían que buscar condiciones que hicieran variar esta longitud, para corroborar la predictibilidad de la expresión propuesta. Una de las condiciones que podrían probarse es la temperatura, la cual se sabe causa alteración de la morfología en muchos mohos; ésto, además, permitiría corroborar si la expresión es útil en cualquier circunstancia, independientemente de la variable manipulada para alterar la morfología.

En este trabajo se propone un patrón de ramificación binario (simétrico). Sería conveniente, en base a estudios con otros mohos, establecer las expresiones que describan otros esquemas de ramificación.

El establecimiento de morfologías mixtas, en cultivo líquido, pudiera ser un tema interesante de abordar, aunque tal vez debieran definirse una expresión para cada morfología. Esta necesidad se encuentra documentada para el caso de morfología tipo *pellet*.

Es conveniente el automatizar, al menos parcialmente, el análisis de imágenes, pues el tiempo consumido en ésta técnica impide, en su estado actual, considerarlo como una herramienta que pueda operar en línea.



BIBLIOGRAFÍA.

- Auria R., Morales M., Villegas E., Revah S. (1993). Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentors. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 41, 1007-1013.
 - Auria, R., Ortiz, I., Villegas, E., Revah, S. (1995). Influence of growth and high mould concentrations on the pressure drop in solid state fermentations. *PROCESS BIOCHEMISTRY* 30(8): 751-756.
 - Aynsley M.; Ward A.C., Wright A.R. (1990). A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 35, 820-830.
 - Bartricki-García S. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. pp 245-267. In *MICROBIAL DIFFERENTIATION*, J.M. Ashworths and J.E. Smith (eds), Cambridge University Press. Cambridge, U.K. (1973).
 - Bartricki-García S., Hergert F., Gierz G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *PROTOPLASMA* 153, 46-57.
 - Boyle C.D., Kropp B.R. (1992). Development and comparison of methods for measuring growth of filamentous fungi on wood. *CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY* 38(10): 1053-1060.
 - Breton A. Identification des moisissures. En *MOISSURES UTILES ET NUISIBLES: IMPORTANCE INDUSTRIELLE*. B. Botton, A. Breton, M. Fevre, Ph. Guy, J.P. Larpent, P. Veau (eds). Ed. Masson, Paris France (1985).
 - Caldwell, D.E., Korber D.R., Lawrence J.R. Confocal laser microscopy and computer image analysis in microbial ecology. En *ADVANCES IN MICROBIAL ECOLOGY. VOL.12*, 1-67. Ed. K.C. Marshall. Plenum Press, N.Y. and London. 1992.
 - Carlsen M., Spohr A.B., Nielsen J., Villadsen J. (1996). Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 49(3): 266-276.
 - Carter L.A., Bull A.T. (1971). The effect of oxygen tension in the medium on the morphology and growth kinetics of *Aspergillus nidulans*. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 65, 265-273.
 - Derikx P.J.L., Op den Camp H.J.M., Van der Drift C., Van Griensven L.J.L.D., Vogels G.D. (1990). Biomass and biological activity during the production of compost used as a substrate in mushroom cultivation. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 56(10): 3029-3034.
 - Durant G, Cox P.W, Formisyn P., Thomas C.R. (1994). Improved image analysis algorithm for the characterisation of mycelial aggregates after staining. *BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES* 8(11): 759-764.
 - Edelstein L. (1982). The propagation of fungal colonies_ A model for tissue growth. *JOURNAL OF THEORETICAL BIOLOGY* 98, 679-701.
 - Edelstein L., Hadar Y., Chet I., Henis Y., Segel L.A. (1983). A model for fungal colony growth applied to *Sclerotium rolfsii*. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 129, 1873-1881.
 - Farkaš V. (1990). Fungal cell walls: Their structure, biosynthesis and biotechnological aspects. *ACTA BIOTECHNOL.* 10(3): 225-238.
 - Fiddy, C., Trinci, A.P.J. (1975). Kinetics and morphology of glucose limited cultures of moulds grown in a chemostat and on solid media. *ARCH. MICROBIOL.* 103, 191-197.
 - Frankland J.C., Lindley D.K., Swift M.J. (1978). A comparison of two methods for the estimation of mycelial biomass in leaf litter. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY* 10, 323-333.
 - Georgiou, G., Shuler, M.L. (1986). A computer model for the growth and differentiation of fungal colony on solid substrate. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 28, 405-416
-

-
- Gervais P., Molin P., Grajek W., Bensoussan M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 31(4): 457-463.
- González-Blanco P.C., Larralde-Corona C.P., Viniestra-González G. (1993). Image processing technique for measuring specific growth rates of *Gibberella fujikuroi*. *BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES*, 7(1): 57-62.
- Gooday G.W. (1971). An autoradiographic study of hyphal growth of some fungi. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 67, 125-133.
- Gooday G.W. (1995). The dynamics of hyphal growth. *MYCOLOGICAL RESEARCH* 99(4): 385-394.
- Grove S., Bracker C. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: Vesicles and spitzkörper. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 104(2): 989-1009.
- Gutiérrez-Rojas M., Auria R., Benet J.C., Revah, S. (1995a). A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. *THE BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL* 60, 189-198.
- Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S., Favela-Torres, E. (1995b). Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *BIOTECHNOL. LETTERS* 17(2): 219-224.
- Hepper C.M. (1977). A colorimetric method for estimating vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY* 9, 15-18.
- Herrera T., Ulloa M. Hongos verdaderos división eumycota. En *EL REINO DE LOS HONGOS*. UNAM y Fondo de Cultura Económica S.A de C.V., México. (1990).
- Hesseltine C.W. (1972). Solid state fermentations. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 14, 517-532.
- Inbar J., Chet I. (1991). Detection of chitinolytic activity in the rhizosphere using image analysis. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY* 23(3): 239-242.
- Inch J.M.M., Trinci A.P.J. (1987). Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 133, 247-252.
- Jüsten P., Paul C.G., Thomas C.R. (1994). Fixation technique to preserve the vacuolation of *P. chrysogenum* hyphae. *BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES* 8(12): 853-858.
- Katz D., Goldstein D., Rosenberger R.F. (1972). Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 109, 1097-1100.
- Koch A.L. (1975). The kinetics of mycelial growth. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 89, 209-216.
- Larralde Corona C.P. (1992). Acoplamiento energético en la germinación de *Aspergillus niger* CH4. Tesis de Maestría en Ingeniería Química. Univ. Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, México D.F.
- Larralde Corona C.P., López Isunza F., Viniestra González G. (1993). Variación de la velocidad de extensión de *A. niger* con la concentración inicial de glucosa y la relación C/N. *BIOTECNOLOGÍA* 3(1 y 2): FB28-FB33
- Larralde-Corona C.P., González-Blanco P.C., Viniestra-González G. (1994). Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth rate of *Gibberella fujikuroi* by image analysis techniques. *BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES* 8(4): 261-266.
- Laskin A., Lechevalier H. Organismic Microbiology. In *HANDBOOK OF MICROBIOLOGY*, VOL.1. CRC Press, USA. (1973).
- Lee K.J., Rho Y.T. (1994). Quantitative analysis of mycelium morphological characteristics and rifamycin B production using *Nocardia mediterranei*. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 36, 239-245.
- Markham P., Robson G. D., Bainbridge B. W., Trinci A. P. J. (1993). Choline: Its role in the growth of filamentous fungi and the regulation of mycelial morphology. *FEMS MICROBIOLOGY REVIEWS* 104(3-4): 287-300.
-

-
- Matsuoka H., Il Y., Takekawa Y., Teraoka T. (1990). Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 56(12): 3779-3784.
 - McGillivray A., Gow R. (1986). Applied electrical fields polarize the growth of mycelial fungi. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 132, 2515-2525.
 - Meyerhoff, J., Bellgardt, K.H. (1995). A morphology-based model for fed-batch cultivations of *Penicillium chrysogenum* growing in pellet form. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 38, 201-217.
 - Meyerhoff J., Tiller V., Bellgardt K.H. (1995a). Two mathematical models for the development of a single microbial pellet. Part I: Detailed morphological model based on the description of individual hyphae. *BIOPROCESS ENGINEERING* 12, 305-313.
 - Meyerhoff, J., Bellgardt, K.H. (1995b). Two mathematical models for the development of a single microbial pellet. Part II: Simulation of the pellet growth of *Penicillium chrysogenum* by a fast method equivalent to a morphological detailed description. *BIOPROCESS ENGINEERING* 12, 315-322.
 - Mitchell D.A., Do D.D., Greenfield P.F., Doelle H.W. (1991). A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state system. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 38, 353-362.
 - Molin P., Gervais P., Lemiére J.P., Davet T. (1992). Direction of hyphal growth: a relevant parameter in the development of filamentous fungi. *RES. MICROBIOLOGY* 143, 777-784.
 - Money N. (1990). Measurement of hyphal turgor. *EXPERIMENTAL MYCOLOGY* 14, 416-425.
 - Monod J. (1949). The growth of bacterial cultures. *ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY*, 371-394.
 - Nielsen J. Modelling the growth of filamentous fungi. In *ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING /BIOTECHNOLOGY*, 46, 187-223. Springer-Verlag, Berlin, Alemania. (1992).
 - Nielsen J. (1993). A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 41, 715-727.
 - Nienow A. W. (1990). Agitators for mycelial fermentations. *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY* 8, 224-233.
 - Okazaki N., Sugama S., Tanaka T. (1980). Mathematical model for surface culture of koji mould. *JOURNAL OF FERMENTATION TECHNOLOGY* 58(5): 471-476.
 - Olsvik E.S, Kristiansen B. (1992). Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 40(11): 1293-1299.
 - Olsson S. (1994). Uptake of glucose and phosphorus by growing colonies of *Fusarium oxysporum* as quantified by image analysis. *EXPERIMENTAL MYCOLOGY* 18, 33-47.
 - Oriol E. (1987). Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activite de l'eau. These de Doctorat Microbiologie, Inst. Nat. Sci. Appl. de Toulouse, France.
 - Oriol E., Raimbault M., Roussos S., Viniestra-González G. (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* 27, 498-503.
 - Facker H.L., Thomas C.R. (1990). Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 35, 870-881.
 - Facker H.L.; Thomas C.R.; Kerhavarz-Moore E., Lilly M.D. (1992). Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 39, 384-391.
 - Fatankar D.B., Liu T., Oolman T. (1993). A fractal model for the characterization of mycelial morphology. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 42(5): 571-578.
 - Paul G.C., Kent C.A., Thomas C.R. (1993). Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 42(1): 11-23.
-

-
- Paul G.C., Kent C.A., Thomas C.R. (1994). Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 44(5): 655-660.
 - Peberdy J.F. Vegetative growth of filamentous fungi. In DEVELOPMENTAL MICROBIOLOGY. Blackie & Sons Limited, Glasgow, Escocia U.K. (1980).
 - Peberdy J.F. (1994). Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. TRENDS IN BIOTECHNOLOGY 12(2): 50-57.
 - Pirt S.J. (1966). A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B166, 369-373.
 - Pirt S.J. (1967). A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY 47, 181-197.
 - Pirt S.J. PRINCIPLES OF MICROBE AND CELL CULTIVATION. 1a. edición. Ed. Blackweel Scientific Publications, USA. 1975.
 - Prosser J. Mathematical modeling of vegetative growth of filamentous fungi. In HANDBOOK OF APPLIED MYCOLOGY, VOL I: SOIL AND PLANTS. Eds: D. Arora, B. Rai, KG Mukerji, GR Knudsen. Marcel Dekker, Inc. N.Y, EEUU. (1991).
 - Prosser J., Trinci A.P.J. (1979). A model for hyphal growth and branching. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY 111, 153-164.
 - Ramana Murthy M.V., Thakur M.S., Karanth N.G. (1993). Monitoring of biomass in solid state fermentation using lighth reflectance. BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS 8, 59-63.
 - Reichl U., Buschulte K., Gilles E. D. (1990). Study of the early growth and branching of *Streptomyces tendae* by means of an image processing system. JOURNAL OF MICROSCOPY 158(1): 55-62.
 - Reichl U., King R., Gilles E.D. (1992). Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 39, 164-170.
 - Robson G D, Bell S D, Kuhn P J, Trinci A P J. (1987). Glucose and penicillin concentrations in agar medium below fungal colonies. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY 133, 361-367.
 - Samson R.A., Hoekstra E.S., Van Oorschot C.A.N. Identification of Deuteromycetes. In INTRODUCTION TO FOOD-BORNE FUNGI. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands (1981).
 - Saunders P T, Trinci A P J. (1979). Determination of tip shape in fungal hyphae. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY 110, 469-473.
 - Schmid J., Harold F.M. (1988). Dual roles for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa*. JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY 134, 2623-2631.
 - Schnürer, J. (1993). Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 59(2): 552-555.
 - Smith, D. Maintenance of filamentous fungi, In MAINTENANCE OF MICROORGANISMS AND CULTURED CELLS, Eds. B.E. Kirsop y A. Doyle, Academic Press Limited, 2nd Edition, U.K. (1991).
 - Smith J.E. The structure and development of filamentous fungi. In THE FILAMENTOUS FUNGI VOL. 1: INDUSTRIAL MYCOLOGY. Eds. Smith J.E. y Berry D.R., Edward Arnold Publishers LTD, Londres, U.K. (1975).
 - Söderström B.E. (1977). Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 9, 59-63.
 - Söderström B.E. (1979). Some problems in assessing the fluorescein diacetate-active fungal biomass in the soil. SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY 11, 147-148.
 - Steele G.C, Trinci A P J. (1975). The extension zone of mycelial hyphae. NEW PHYTOL. 75, 583-587.
-

-
- Suberkropp K., Gessner M. O., Chauvet E. (1993). Comparison of ATP and ergosterol as indicators of fungal biomass associated with decomposing leaves in streams. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 59(10): 3367-3372.
 - Sundman V., Sivelä S. (1978). A comment on the membrane filter technique for estimation of length of fungal hyphae in soil. *SOIL BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY* 10, 399-401.
 - Surh H., Wehnert G., Schneider K., Bittner C., Scholz T., Geissler P., Jähne B., Scheper T. (1995). In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 47(1): 106-116.
 - Thomas C.R. (1992). Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *TRENDS IN BIOTECHNOLOGY* 10(105): 343-348.
 - Trinci A.P.J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 57, 11-24.
 - Trinci A.P.J. (1971). Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 67, 325-344.
 - Trinci A.P.J. (1974). A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 81, 225-236.
 - Trinci A.P.J., Saunders P. (1977). Tip growth of fungal hyphae. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 103, 243-248.
 - Van Suijdam J.C., Hols H., Kossen N.W.F. (1982). Unstructured model for growth of mycelial pellets in submerged cultures. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 24, 177-191.
 - Vecht-Lifshitz S.E., Magdassi S., Braun S. (1990). Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 35, 890-896.
 - Viniestra-González G., Saucedo-Castañeda G., López-Isunza F., Favela-Torres E. (1993). Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 42(1): 1-10.
 - Viniestra-González G., Larralde-Corona C.P., López-Isunza F. A new approach for modelling the kinetics of mycelial cultures. In *ADVANCES IN BIOPROCESS ENGINEERING*, 183-189. Eds. E. Galindo & O.T. Ramirez. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. (1994).
 - Wainwright M. INTRODUCCIÓN A LA BIOTECNOLOGÍA DE LOS HONGOS. Ed. Acribia S.A., España. (1992).
 - Wiebe M.G., Robson G.D., Trinci A.P.J. (1990). Ediphenfos (Hinosan) reduces hyphal extension, hyphal growth unit length and phosphatidylcholine content of *Fusarium graminearum* A3/5, but has no effect on specific growth rate. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 136, 979-984.
 - Wiebe M.G., Trinci A.P.J. (1991). Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 38(1): 75-81.
 - Willaert, R., Baron, G. (1993). Growth kinetics of gel-immobilized yeast cells studied by on-line microscopy. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* 39(3): 347-352.
 - Wittler R, Baumgartl H., Lübbers D.W., Schügerl K. (1986). Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 28, 1024-1036.
 - Wösten H.A.B., Moukha S.M., Sietsma J.H., Wessels J.G.H. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY* 137, 2017-2023.
 - Yang H., Reichl U., King R., Gilles E.D. (1992a). Measurement and simulation of morphological development of filamentous microorganisms. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 39(1): 44-48.
 - Yang H., King R., Reichl U., Gilles E.D. (1992b). Mathematical model for apical growth, septation, and branching of mycelial microorganisms. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 39(1): 49-58.
-



APÉNDICE

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Los resultados de este trabajo fueron publicados en diferentes revistas, tanto nacionales como internacionales. A continuación se presenta la lista, y posteriormente una copia de ellos. Se incluye además la copia de un trabajo que actualmente se encuentra en revisión.

-González Blanco, P.C., Larralde Corona C.P., Viniegra González G. (1993). Image processing technique for measuring specific growth rates of *Gibberella fujikuroi*. BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES 7(1):57-62.

-Larralde Corona C.P., López Isunza F., Viniegra González G. (1993). Variación de la velocidad de extensión de *A. niger* con la concentración inicial de glucosa y la relación C/N. BIOTECNOLOGÍA 3(1 Y 2) FB 28- FB 32.

-Larralde Corona C.P., González Blanco P.C., Viniegra González G. (1994). Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth rate of *Gibberella fujikuroi* by image analysis techniques. BIOTECHNOLOGY TECHNIQUES 8(4): 261-266.

-Viniegra González G., Larralde Corona C.P., López Isunza F. A new approach for modelling the kinetics of mycelial cultures. In ADVANCES IN BIOPROCESS ENGINEERING, E.Galindo & O.T. Ramírez (eds), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. págs.183-189. (1994).

-Larralde Corona C.P., López Isunza F., Viniegra González G. Morphometric evaluation of the influence of high glucose levels on the specific growth rate of *Aspergillus niger*. (En revisión en la revista BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING).



"IMAGE PROCESSING TECHNIQUE FOR MEASURING SPECIFIC GROWTH RATES OF *Gibberella fujikuroi*".

P.C. González-Blanco¹, C.P. Larralde-Corona and G. Viniegra-González*.

Depto. de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, D.F., CP 09340. Fax: (5)612 8083. MEXICO. 1. Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. La Habana, CUBA.

SUMMARY

Two methods were compared for estimating μ of *Gibberella fujikuroi* grown with different proportions of glucose and starch. They were, $\mu_1 = \ln 2 (V_r / L_e)$ on Petri dish (V_r = rate of tip extension and L_e = mean hyphal length) and, $\mu_2 = d(\ln X) / dt$ in stirred fermenter. Values of μ_1 and μ_2 were in close agreement with each other.

INTRODUCTION.

Evaluation of the specific growth rate, μ , for slow growing mycelia is a painstaking task because of the time involved in each fermentation and also because of the risks of contamination and experimental errors during long periods of mycelial cultivation. Nevertheless, it is sometimes necessary to measure μ in order to know more about the physiology of some slow organisms used for industrial fermentations, such as *Gibberella fujikuroi*. An alternative way to evaluate μ is to use morphometric data from vegetative mycelia (Steele and Trinci, 1975), for example, to measure the average rate of tip extension, estimated as the radial extension velocity, V_r , of circular colonies plated on Petri dishes divided by an appropriate estimate of the so called "hyphal growth unit" (G) previously defined by Trinci (1969, 1971). Unfortunately, the value of G has been found to change during the time course of mycelial

fermentation (Ainsely et al., 1991). Viniegra-González, et al., (1992) have proposed, a new way to evaluate μ as proportional to the branching frequency $\phi = V_r/L_e$, in terms of the following equation

$$\mu_1 = \text{Ln}2(V_r/L_e) \quad (1)$$

This is derived from the relation, $e^{\mu t} = 2^{\phi t}$, which amounts to say that ϕ , defined above, corresponds to the inverse of the doubling time t_d , i.e., $\phi = 1/t_d$, because growing tips double in number due to branching out of mycelia. Here, a simple technique is proposed to estimate μ by using image processing techniques of colonies of *Gibberella fujikuroi* grown on Petri dishes. The estimate of μ , called μ_1 (Eq. 1) was compared to $\mu_2 = d(\text{Ln}X)/dt$, obtained from the slope value of conventional semilog plots of biomass concentration, X , vs. time, t , measured in stirred aerated fermenters.

MATERIALS METHODS.

Microorganism: *Gibberella fujikuroi* IMI 58289 from the Commonwealth Mycological Institute, U.K., supplied as a gift by Dr. E. Cerdá Olmedo, Universidad de Sevilla, Spain. Cultures were stored on agar Czapek slants at 4° C.

Culture techniques: Old cultures were reactivated on new agar-Czapek slants and grown for seven days at 28° C. Microconidia were washed out from these slants using sterile water as inocula for liquid Czapek medium in proportion 1/10 (v/v) and cultured in shake flasks with 250 rpm for 48 h at 28° C. In turn, this later suspension of mycelia was used as inoculum for fermenters or Petri dishes.

Liquid media composition: Seven culture media were used with the following basal salt composition in g/L: NH_4NO_3 , 0.96; KH_2PO_4 , 5.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0; solution with traces of Fe, Cu, Zn, Mn and Mo, 2 mL/L. Initial pH value was adjusted to 5.0. Percentages of (glucose)/(starch + glucose) varied: $\beta = 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5$ and 100 %, with fixed value of total carbohydrates (80 g/L).

Agar plates: Circular agar plates having 10 cm diameter and 0.5 cm depth were prepared with previous liquid media mixed with 1.5% agar. A small (0.5 cm diameter) round filter was placed in the center in order to absorb 10 μL of inocula from the shake flasks. Solid cultures were grown by triplicates for 7 days at 28° C.

Specific growth rate measurement in solid cultures (μ_1): Each colony diameter was measured in five different directions every 24 hours. Daily average diameter was plotted vs. time and linear slopes were estimated by statistical regression ($R = 0.99$). This parameter was called V_r and expressed in microns/h. After seven days the colonies were observed with a Zeiss microscope (40x) provided with a video camera linked to an image processing system. This consisted in a digitizing Matrox card and a Biocom (France) software called Imagenia 2000, running in an HP Vectra QS/20, AT, computer. Peripheral mycelial images were stored in the hard disk memory to be retrieved and processed later on. Retrieved images were cleaned up and improved by segmentation techniques. Distal hyphal lengths were measured on a VGH monitor using a "mouse" (electronic pantograph) previously calibrated with the grid of a red blood cell counting (Neubauer) chamber. Histograms for $n = 30$ measurements were recorded in order to evaluate the means and standard deviations. The mean hyphal length was called L_e (microns). Specific growth rate was estimated as μ_1 in Eq. 1.

Submerged cultures: Liquid inocula (250 mL) of *G. fujikuroi* were added to stirred and aerated 3 L fermenters. Working volume was 2.5 L. Rushton turbines worked at 500 rpm and air flow was 1.5 L/min. Temperature was maintained at 28° C for 10 days. 30 mL samples were made every 5 h during the first 2 days. After the second day, sampling period was 24 h.

Specific growth measurement in submerged cultures (μ_2): Triplicate measurements of suspended biomass in fermenters were made as follows, 30 mL broth samples were filtered through previously tared Whatman No.40 paper. Mycelial residues were oven dried at 60° C for 24 h. Biomass concentration X was expressed as g/L. A semilog plot was made of average X values and the slope was estimated in the linear part by a conventional regression program taking into account only the line segments with $R > 0.9$. This slope was called μ_2 .

RESULTS AND DISCUSSION.

Effect of β on V_r and L_e .

As shown in Fig. 1, the values of V_r changed very little with β ($R = -0.0417$, slope $m = 0.00082$ and mean $V_r = 10.01 \pm 0.49 \mu\text{mh}^{-1}$). Apparently, *G. fujikuroi* has an adaptation mechanism to conserve V_r when growing in media with various proportions of glucose and starch, β . The distribution of L_e in each sample had a large statistical error (ca. 50%). But given the sample size ($n = 30$) the

confidence range of average values was less than 15%. Again, in Fig. 1, it is shown that L_e was a concave parabolic

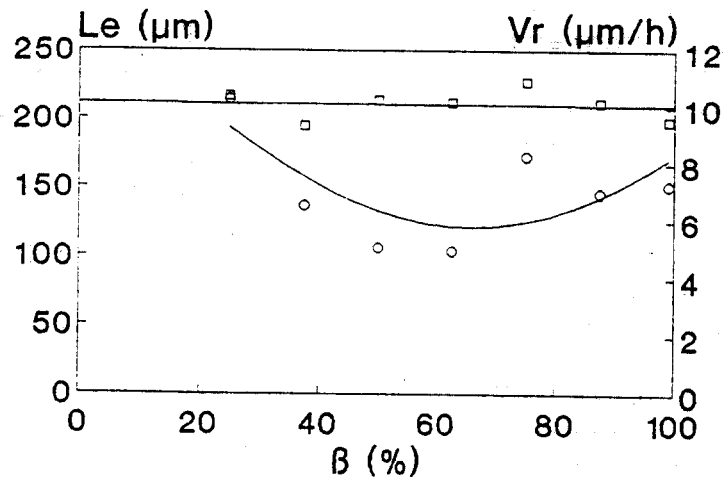


Figure 1. Effect of glucose proportion β (%) on L_e (circles) and V_r (squares) in cultures of *G. fujikuroi* grown on agar plates. Smooth curve for L_e is a quadratic function of β .

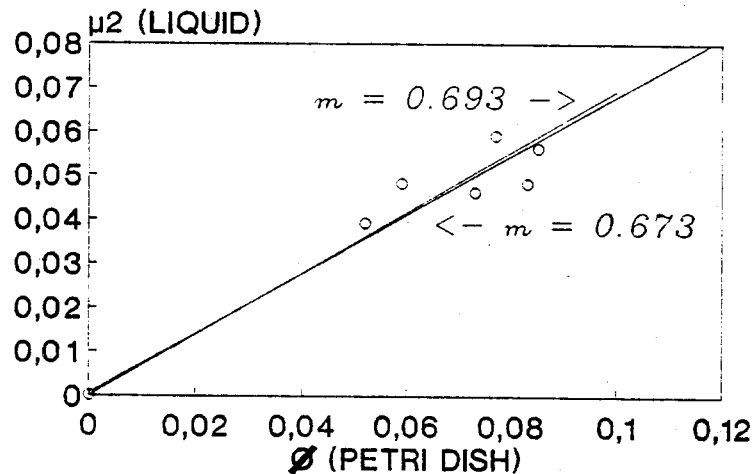


Figure 2. Linear regression between μ_2 and ϕ for *G. fujikuroi* grown in liquid (μ_2) and solid media (ϕ) with different proportions of glucose and starch (β).

function of β where, $L_{\text{emin}} = 103.2 \mu\text{m}$ for $\beta = 65.9\%$. This corresponds to a maximum $\phi_{\text{max}} = 0.0831/\text{h}$ for $\beta = 65.5\%$. Hence, this organism grows in mixtures of glucose and starch changing ϕ with fixed V_r , that is, adjusting L_e .

Correlation between μ_2 and ϕ .

Figure 2 shows a linear correlation between μ_2 and ϕ ($R=0.986$) calculated under the assumption that $\mu_2 = 0$ when $\phi = 0$, that is, growth ceases when the hyphal tips stop growing (Bartnicki-García, 1973). The slope of such correlation was found to be, $m = 0.673$ and very close to $\ln 2 = 0.693$. Therefore, the present data support the use of Eq. 1 as a good estimate of μ .

Effect of β on the estimated values μ_1 and μ_2 .

In Fig. 3 it is shown that μ_1 was found to have a maximum value, $\mu_{1\max} = 0.058/h$ for $\beta = 65.45\%$, which corresponds to L_{\min} described above. Also, in Fig. 3, the

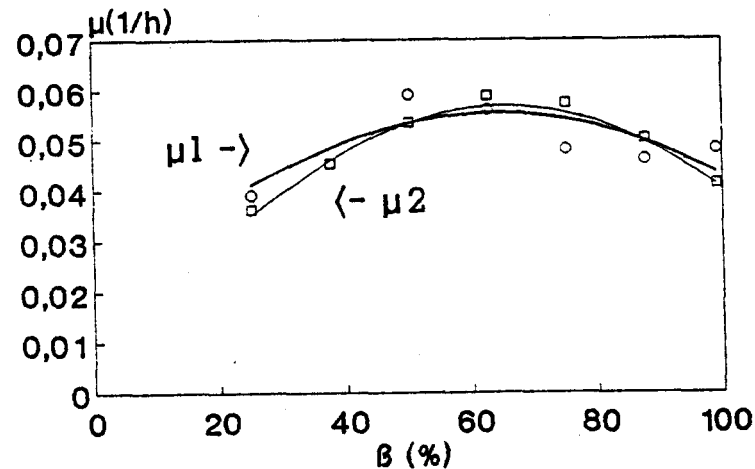


Figure 3. Comparison between μ_1 (circles) and μ_2 (squares) of *G. fujikuroi* grown on different glucose proportions β . Smooth curves for μ were quadratic regressions on β .

values of μ_2 , measured in submerged culture, show a very similar behavior with respect to β as compared to μ_1 , with $\mu_{2\max} = 0.056 h^{-1}$, for $\beta = 64.10\%$. Thus, evaluation of μ for *Gibberella fujikuroi* by image analysis in Petri dishes yielded very similar results to the growth rates observed in submerged culture.

CONCLUSIONS

Present data supports the use of image processing of mycelia grown on agar plates, together with Eq. 1, in order

to estimate the specific growth rate, μ , of *Gibberella fujikuroi*, because, the values of μ obtained by submerged and solid culture techniques were very close to each other. It is suggested to extend this technique for measuring μ with different cultures in order to validate it as a useful way to study growth physiology mycelial cultures.

REFERENCES

- Ainsely, M., Ward, A.C., and Wright, A.R. (1991) *Biotech. Bioeng.* **35**: 820-830.
- Bartnicki-García, S. (1973) In *Microbial differentiation*. (Eds. J.M. Ashworths, and J.E. Smith), Cambridge Univ. Press (U.K.) pp. 245-267
- Viniegra-González, G., Saucedo-Castañeda, G., López-Isunza F., and Favela-Torres, E. (1992) In 9th Internat. Biotech. Symposium, **Abstract No.339**. Crystal City, Va. (USA) sponsored by Amer. Chem. Soc.
- Steele, G.C., and Trinci, A.P.J. (1975) *J. Gen. Microbiol* **91**: 362-368.
- Trinci, A.P.J. (1969) *J. Gen. Microbiol.* **57**: 11-24.
- Trinci, A.P.J. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **67**: 325-344.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa), and Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Cooperation (ORSTOM). Mr. P.G. González-Blanco had a leave of absence from ICIDCA (Cuba) and Ms. P.C. Larralde-Corona a graduate fellowship from CONACYT (México). The authors thank useful criticism from Professors E. Favela-Torres, M. Gutiérrez-Rojas, and F. López-Isunza (UAMI).

GLOSSARY

Latin symbols:

- G = hyphal growth unit length, (μm /growing tip).
- L_e = mean length of distal hyphae, (μm).
- $\text{Ln}2$ = 0.6932
- t_d = mycelial doubling time, (h).
- V_r = rate of hyphal extension, ($\mu\text{m}/\text{h}$).
- X = biomass concentration in fermenter, (1/h).

Greek symbols:

- β = 100(glucose)/(glucose + starch), (w/w).
- μ = specific growth rate of micelia, (1/h)
- μ_1 = estimated value $\mu_1 = \text{Ln}2(\emptyset)$, on Petri dish, (1/h).
- μ_2 = estimated value $\mu_2 = d(\text{Ln}X)/dt$, in fermenter, (1/h)
- μm = micrometer, (10^{-6} m)
- \emptyset = mycelial branching frequency = V_r/L_e , (1/h)

MEXICO

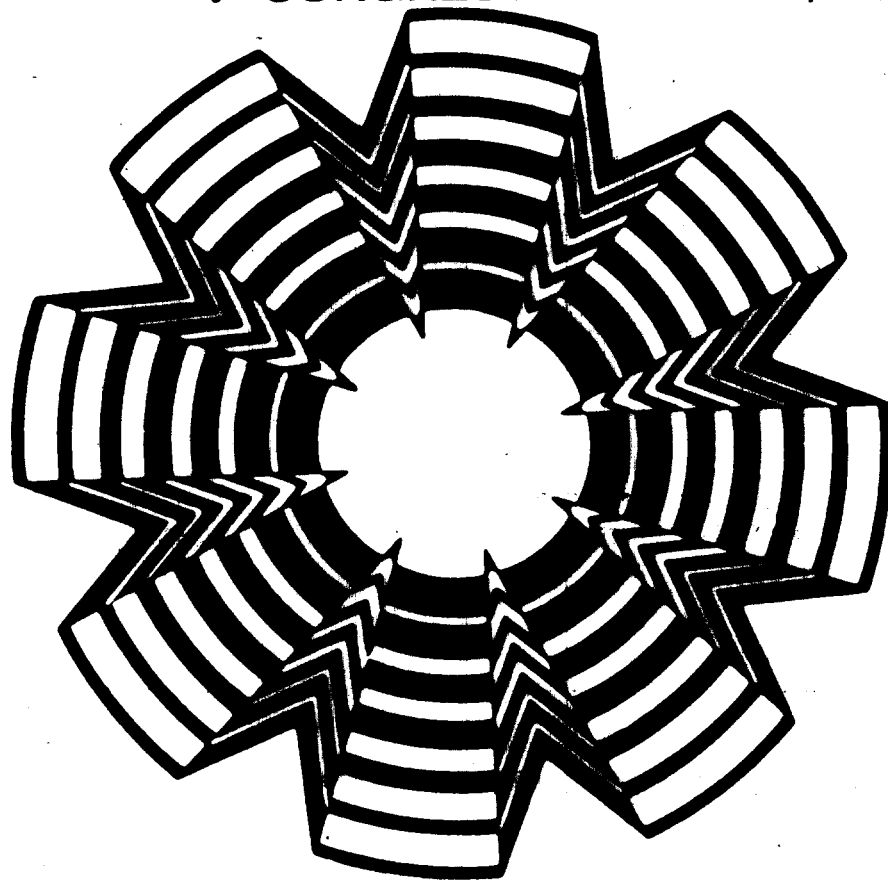
ISSN 0188-4786

BIOTECNOLOGIA

V CONGRESO NACIONAL/ 1993

VOLUMEN 3

NUMEROS 1 y 2



REVISTA DE LA SOCIEDAD MEXICANA
DE BIOTECNOLOGIA Y BIOINGENIERIA. A.C.

1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

VARIACION DE LA VELOCIDAD DE EXTENSION DE *A. niger* CON LA CONCENTRACION INICIAL DE GLUCOSA Y LA RELACION C/N

LARRALDE CORONA, C.P.¹, LOPEZ ISUNZA, F.² Y VINIEGRA-GONZALEZ, G.¹

1. DEP. DE BIOTECNOLOGIA Y 2. AREA DE INGENIERIA QUIMICA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

FAX 612 80 83, TEL: 724 49 16, A.P. 55-535 C.P. 09340. MEXICO, D.F.

RESUMEN

Se midió la velocidad de extensión radial (u_r) de colonias de *Aspergillus niger* # 10, variando la concentración inicial de glucosa (C/N = 12, fijo) y la relación C/N, fijando la concentración de glucosa en un caso y la de nitrógeno en otro. Se concluye que es la concentración de glucosa lo que va a determinar la u_r , independientemente de la relación C/N, en el rango de 0.1 a 10 g/L, C/N de 0.12 a 12.

ABSTRACT

Radial colony extension rate of *Aspergillus niger* # 10 was measured at different initial glucose concentrations (C/N = 12) and at distinct C/N ratios, fixing glucose or nitrogen concentrations. We conclude that glucose concentration is the determinant factor in the extension rate value, for 0.1 to 10 g/L, C/N ratio from 0.12 to 12.

Palabras clave: Crecimiento radial, relación C/N, *Aspergillus niger*.

Key words: Radial growth, C/N ratio, *Aspergillus niger*.

INTRODUCCION

El moho *Aspergillus niger* es muy utilizado para producir enzimas y ácidos orgánicos para la industria alimentaria, pero todavía se tiene un conocimiento incompleto de las relaciones fisiológicas entre la composición del medio y los mecanismos básicos del crecimiento de las hifas y de la colonia, por lo que los estudios tendientes a esclarecer éstas relaciones son de gran utilidad para la comprensión del crecimiento de este microorganismo en un sistema de fermentación sólida. Como objetivo principal de este trabajo se propuso el de cuantificar el efecto de la concentración inicial de glucosa y la relación C/N sobre la velocidad de extensión radial de *Aspergillus niger* # 10 medida a escala macroscópica en colonias cultivadas en placas de agar.



MATERIALES Y METODOS

El microorganismo utilizado fue *Aspergillus niger* # 10 (colección de ORSTOM), conservado en viales de agar papa-dextrosa. Para obtener esporas se inoculó un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contiene 50 mL de agar papa-dextrosa con las esporas del vial, incubándose por 72 horas a 35° C, obteniéndose una abundante esporulación de la colonia en este tiempo. Las esporas fueron cosechadas vaciando agua estéril con 0.1% de Tween 80 en el matraz, desprendiéndose las esporas con un agitador magnético. Una muestra de la suspensión de esporas obtenida fue diluida convenientemente para ser utilizada en la cámara de Neubauer, y conocer de esta manera la concentración de esporas de la suspensión.

Los experimentos se llevaron a cabo en cajas Petri, con un medio de la siguiente composición (g/L): Glucosa (10), sulfato de amonio (1), urea (0.25), fosfato monobásico de potasio (0.5), extracto de levadura (0.1), solución de oligoelementos (1 mL) y agar bacteriológico (15). La composición de la solución (g/L) fue la siguiente (Clutterbuck, 1974): $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (22), H_3BO_3 (11), $MnSO_4$ (4.3), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (5), $CoCl_2 \cdot 5H_2O$ (1.6), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1.6), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (1.1) y Na_2EDTA (50). El grosor del medio en la caja fue de 6 mm.

Se utilizaron, en la primera parte, medios con relación C/N = 12 (fija), moviendo la concentración inicial de glucosa a valores de $S_0 = 0.1, 1, 10$ y 100 g/L. Para la segunda parte del estudio se decidió variar la relación C/N a valores de 0.12, 1.2, 12 y 120, lo cual se hizo de manera que $S_0 = 0.1, 1, 10$ y 100 g/L, dejando fijo el nivel de N.

Se realizó la inoculación en el centro de la caja, depositándose 10 mL de la suspensión de esporas con un pipeteador electrónico adaptado con una punta para manejar ese volumen. El incremento en el diámetro de la colonia fue medido cada 12 horas, marcándose el borde. El diámetro equivalente de las colonias fue medido con un procesador de imágenes (IMAGENIA 2000 de Biocom).

RESULTADOS Y DISCUSION

La variación del radio de la colonia contra el tiempo, resultó ser, en todos los casos, una función con un alto coeficiente de correlación (mayor o igual a 0.99 en todos los casos) y muy baja desviación standard (menor al 5%); el comportamiento lineal se tomó como un indicio de que el micelio no estaba limitado por difusión, como es mencionado por Gervais (1988) y Trinci (1969), por lo que la pendiente de ésta función se consideró como la velocidad de extensión radial media de la colonia (u_r). La relación entre u_r y S_0 se muestra en la Tabla 1.



Tabla 1. Variación de u_r con respecto a S_0

S_0 (g/L)	0.10	1.0	10	100
u_r (m/h)	324	328	355	570

Como se puede apreciar, la velocidad de extensión radial es similar para las concentraciones de 0.1, 1 y 10 g/L, es decir, aunque el rango de concentración inicial de glucosa es muy amplio (2 ordenes de magnitud), la velocidad no se ve afectada de manera importante. Sin embargo si se observó un efecto muy claro de S_0 sobre la morfología del micelio, presentándose una pobre densidad de micelio entre más baja era la concentración de glucosa, es decir, aparentemente había disminuído la frecuencia de ramificación. También, un bajo nivel de S_0 se asoció con una esporulación disminuída, la cual se vio casi totalmente inhibida cuando $S_0 = 0.1$ g/L. En contraste, cuando $S_0 = 100$ g/L, la velocidad de extensión radial se incrementó en mas de un 50% con respecto al promedio de los valores anteriores, además de presentar un micelio más denso y con abundante esporulación.

Para la segunda parte se movió la relación C/N, dejándose fija la concentración de las fuentes de nitrógeno en 1 g/L. Como se puede notar en la Tabla 2, a mayor relación C/N la velocidad de extensión radial se incrementó, ligeramente para las 3 primeras relaciones C/N (0.12, 1.2 y 12) en incrementos de aproximadamente un 12%, pero, para la relación C/N de 120 ($S_0 = 100$ g/L) el valor de u_r fue mayor (673), siendo en este caso un poco mas del doble que el valor promedio de las otras relaciones probadas (320 29 m/h).

Tabla 2. Variación de u_r con la relación C/N (N = 1 g/L)

C/N (g/g)	0.12	1.2	12	120
u_r (m/h)	285	322	355	673

Es de notarse que desde la concentración más baja estudiada (0.1 g/L) hasta la concentración 2 ordenes de magnitud mas alta (10 g/L) se tiene la misma velocidad de extensión. Esto sugiere que, aparentemente, existen dos procesos regulatorios de u_r en función de S_0 . El primero, que opera para $S_0 < 10$ g/L, y para el cual la constante de saturación es de alrededor de 0.005 g/L, según experimentos realizados por Larralde (1992). El segundo proceso, para $S_0 \gg 10$ g/L, aparentemente se asocia con un fuerte incremento de la velocidad de extensión ($u_r > 600$ m/h).

Otros autores, sin embargo, han insistido en la importancia del cociente C/N en la esporulación de los mohos (Gervais et al, 1988), lo cual sugiere la importancia



de distinguir el efecto de la C/N sobre el crecimiento vegetativo (sobre u_r) o sobre la etapa de esporulación, la cual no fue medida en este trabajo.

Para corroborar si el efecto observado se debía a la concentración de glucosa o a la de las fuentes de nitrógeno, o su balance, se volvieron a probar las mismas relaciones C/N (0.12, 1.2, 12 y 120), pero esta vez fijando la concentración de glucosa en 1 g/L en todos los casos, y moviendo la concentración de el sulfato de amonio y la urea. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 3.

Tabla 3. Variación de u_r con C/N ($S_0 = 1$ g/L)

C/N (g/g)	0.12	1.2	12	120
u_r (m/h)	332	313	298	314

En este caso se tiene que las velocidades obtenidas son muy semejantes para los cuatro niveles de C/N, es decir, aunque la concentración del nitrógeno varió en 3 ordenes de magnitud, se vio que S_0 fue el parámetro que determinó el valor de la velocidad de extensión radial de la colonia, pues se observa que los valores de u_r de la tabla 3 son comparables al valor obtenido en el caso de C/N = 1.2 de la tabla 2, que es la que corresponde a la concentración de glucosa de 1 g/L. En este caso nuevamente se presentó una menor densidad de micelio en las cajas con la relación C/N mas baja.

La medición del diámetro de las hifas distales de las colonias mostró una correlación lineal de D vs. S_0 que fue estadísticamente significativa según la prueba de Duncan (alfa = 0.05%) en el intervalo de $3.0 < D < 3.7$ m para 0.01 g/L $< S_0 < 10$ g/L. Esto sugiere que este mohó puede mantener constante la velocidad u_r pero aumentar la síntesis de biomasa por incremento en el diámetro, que se refleja en el volumen. Otros experimentos no mostrados aquí han indicado que para 0.01 g/L $< S_0 < 10$ g/L la longitud máxima (L_{max}) de las hifas también se aumenta con S_0 , por lo tanto deben tomarse con cautela los resultados visuales que comparan el crecimiento de colonias en función exclusiva de su diámetro.

CONCLUSIONES

De los resultados anteriores se concluye que el micelio de *Aspergillus niger* #10 tiene mecanismos compensatorios para mantener relativamente fija la velocidad de extensión de las puntas ante cambios en los niveles de glucosa en el intervalo de 0.1 a 10 g/L y que en ese intervalo, el nivel de N > 1 g/L no es limitante sobre dicha velocidad.



Las observaciones preliminares sugieren que en el rango de $S_0 = 0.1$ a 10 g/L (C/N = 12) si bien, la velocidad de extensión radial es prácticamente la misma, se podría modificar marcadamente la densidad del micelio. Es decir que en esas condiciones, el micelio podría ajustar la cantidad de biomasa mediante cambios en la frecuencia de ramificación cambiando la longitud media de las hifas. Esto ha sido observado por Trinci (1971). El aumento lineal del diámetro D con S_0 resulta en un aumento cuadrático en el área de sección de las hifas. Como el producto $u_r D$ es proporcional a la velocidad de síntesis de pared (Barnicki-García et al., 1989) es posible que este moho aumente este proceso, manteniendo constante la u_r .

Resultaría muy interesante medir en el futuro la frecuencia de ramificación (ϕ), ya que podría ser el proceso más sensible a cambios en S_0 (Aynsley et al., 1990). Como la velocidad de crecimiento de la biomasa μ es proporcional a ϕ (Nielsen, 1991) se puede pensar que la constancia de u_r puede estar acompañada de cambios importantes en μ . Por lo tanto se sugiere que no se tome a u_r como el principal indicador del crecimiento de este tipo de organismos, porque aparentemente estos tienen mecanismos compensatorios que pudieran mantener u_r , variando μ .

Este enfoque analítico permite relacionar entre sí a distintos modelos cinéticos del crecimiento miceliar (Aynsley et al., 1990) y puede ser útil para mejorar la comprensión de la fisiología de los organismos miceliales.

En estudios futuros se tratará de relacionar la velocidad de extensión de las hifas con la velocidad de crecimiento para entender mejor la fisiología de *Aspergillus niger*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, así como al Instituto Francés para el Desarrollo en Cooperación ORSTOM (Francia) por el apoyo económico que otorgan para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Aynsley, M., Ward, A.C. and Wright, A.R., 1990. A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 820-830.
- Barnicki-García, S., Hergert, F. and Gierz, G., 1989. A novel computer model for generating cell shape: Application to fungal morphogenesis. En *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Ed. Kuhn et al. Springer-Verlag.
- Clutterbuck, A.J., 1974. *Handbook of genetics*. Plenum Publishers, N.Y. USA. pp 447-510.



-Gervais, P., Molin, P., Grajek, W. and Bensoussan, M., 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 457-463.

-Larralde Corona, C.P. Acoplamiento energético en la germinación de *Aspergillus niger* CH4. Tesis de Maestría en Ing. Química. UAM-I. 1992.

Nielsen, J., 1993. A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 715-727.

-Trinci, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology*, 57, 11-24

-Trinci, A.P.J., 1971. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *Journal of General Microbiology*, 67, 325-344.



COMPARISON OF ALTERNATIVE KINETIC MODELS FOR ESTIMATING
THE SPECIFIC GROWTH RATE OF *Gibberella fujikuroi* BY IMAGE
ANALYSIS TECHNIQUES.

C.P. Larralde-Corona, P.C. González-Blanco⁺ and G. Viniegra-González*

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A. postal 55-535, C.P. 09340, México, D.F. MEXICO. +Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, La Habana, CUBA.

SUMMARY

A new equation is proposed in order to obtain a consistent and accurate correlation between morphometric data of growing mycelia of *Gibberella fujikuroi* in solid media and its observed specific growth rates (μ_{obs}) in stirred fermenters. A critical analysis is made of previous data and models.

INTRODUCTION

There is growing interest to use the analysis of microscopic images of mycelial cultures for estimating the kinetic parameters of industrial fermentations (Packer and Thomas, 1990). The specific growth rate (μ) has been found to be proportional to the specific rate of increase of the number of tips (ϕ) resulting from the binary branching process (Trinci, 1974; Fiddy and Trinci, 1976). In other words, if X is the amount of biomass at time, t , and $X=X_0$ when $t=0$, then the growth process can be followed up by the exponential equation (1)

$$X/X_0 = e^{\mu t} = 2^{\phi t} \quad \dots(1)$$

The practical problem is then how to estimate ϕ , using morphometric data obtained from mycelial cultures on agar plates or sparse liquid suspensions. Trinci (1974) and Steele and Trinci (1975) suggested the following phenomenological equation,

$$\mu_1 = u_r / L_{hgu} \quad \dots(2)$$

where, u_r is the maximal rate of extension of leading hyphae and, according to Steele and Trinci (1975), $L_{hgu} = L_t/N_t$, is the length of the growth unit, being L_t , the total length and N_t , the number of tips. This model assumes that most of the hyphae grow at steady state velocity u_r . Hence, the steady state branching frequency ϕ_s is given by

$$\phi_s = u_r / L_{hgu} \quad \dots(3)$$

Viniegra-González *et al.*, (1993) have suggested that $L_{\text{hgu}} = (2N_t - 1)L_c/N_t$, being L_c a critical length after which all leading hyphae branch out, thus, for $2N_t \gg 1$, $L_{\text{hgu}} = 2L_c$. The value of L_c is not always available for measurement in fully grown (dense) colonies, instead, L_{av} can be obtained as the average length of leading hyphae in the periphery of such colonies (Fig. 1). Here it is assumed that L_{hgu} is proportional to L_{av} (Eq. 4) and this hypothesis is tested by the comparison of observed values of the specific growth rate of *G. fujikuroi* (μ_{obs}) measured in fermenters to the calculated values using Eq. 2 or other alternative models as the model proposed by González-Blanco *et al.*, (1993) (Eq. 5) and the model proposed in this paper (Eq. 6).

$$L_{\text{hgu}} = a_1 L_{\text{av}} \quad \dots(4)$$

$$\mu_2 = \frac{u_r \ln(2)}{a_2 L_{\text{av}}} \quad \dots(5)$$

Previous models proposed that a_1 and $a_2 = 1$, but, recent work (Alvarez and Rodríguez, 1993) showed that in fact $a_2 = 10$. In order to account for this discrepancy, we propose a third model (Eq. 6) to be compared with previous ones.

$$\mu_3 = \frac{(u_r/L_c) \ln(2)}{\ln(L_c/L_0)} \quad \dots(6)$$

Where, L_0 , is the initial length of a new branch with length $L < L_c$ which is growing exponentially with kinetic constant $\alpha = (u_r/L_c)$, according to Trinci (1974) and Prosser (1991). This model gives more weight to the branching of small segments in a mycelium having the branching rate ϕ_e (Eq. 7) and neglects the contribution of ϕ_s (Eq. 3) to the overall branching mycelial process.

$$\phi_e = \frac{(u_r/L_c)}{\ln(L_c/L_0)} \quad \dots(7)$$

In order to use Eq. 6, together with morphometric data of mycelia, it is necessary to make two assumptions (Eqs. 8 and 9)

$$L_c = a_3 L_{\text{av}} \quad \dots(8)$$

Where, a_3 is a positive empirical constant. Also, according to Prosser (1991), L_0 , is of the size of a germinating spore which is close to twice the hyphal diameter D_h .

$$L_0 = 2D_h \quad \dots(9)$$

In this work, we use the data published by González-Blanco *et al.*, (1993) but corrected as shown in Table 1 in order to evaluate the validity of Eqs. 2, 5 and 6. Such validation was made by the estimation of L_c using each one of those models to fit experimental data (μ_{obs}) in Table 1, thereafter comparing the estimated with the experimental values of L_c (Table 3). The later ones observed directly from dispersed small mycelia grown on agar plates (Fig. 2).

MATERIALS AND METHODS.

Microorganism: *Gibberella fujikuroi* IMI 58289 from the Commonwealth Mycological Institute, U.K., supplied as a gift by Dr. E. Cerdá Olmedo, Universidad de Sevilla, Spain. Cultures were stored on agar Czapek slants at 4° C.

Culture techniques: Old cultures were reactivated on new agar Czapek slants and grown for seven days at 28° C. Microconidia were washed out from these slants using sterile water as inocula for liquid Czapek medium in proportion 1/10 (v/v) and cultured in shake flasks with 250 rpm for 48 h at 28° C. In turn, this later suspension of mycelia was used as inoculum for fermenters or Petri dishes.

Media composition: Seven culture media were used with the following basal salt composition in g/L: NH_4NO_3 , 0.96; KH_2PO_4 , 5.0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0; solution with traces of Fe, Cu, Zn, Mn and Mo, 2 mL/L. Initial pH value was adjusted to 5.0. Mixtures of glucose and starch having 80 g/L of total carbohydrates were used, having the following percentages of C from glucose: 25, 37.5, 50, 62.5, 75, 87.5 and 100 %.

Agar cultures: Agar plates (10 cm diameter and 0.5 cm depth) were prepared with previous liquid media and 1.5% agar. Small inocula (10 μ L) were placed at the centre of the plates from the shake flasks. Solid cultures were grown by triplicates for 7 days at 28° C. Some agar plates were inoculated only for measuring L_c and D_h in solid. These experiments were incubated at 30° C.

Submerged cultures: Liquid inocula (250 mL) of *G. fujikuroi* were added to a stirred and aerated 3 L fermenter. Working volume was 2.5 L. Rushton turbines worked at 500 rpm and air flow was 1.5 L/min. Temperature was maintained at 28° C for 10 days. 30 mL samples were made every 5 h during the first 2 days. After the second day, sampling period was 24 h. Additional 250 mL shake flasks were incubated with 100 mL of medium and stirred at 250 rpm for measuring L_c and D_h in liquid.

Growth measurements in submerged cultures (μ_{obs}): Triplicate measurements of suspended biomass in fermenters were made as follows, 30 mL broth samples were filtered through previously tared Whatman No.40 paper. Mycelial residues were oven dried at 60° C for 24 h. Biomass concentration X was expressed as g/L. A semilog plot was made of average X values and the slope was estimated in the linear part. This slope was called μ_{obs} .

Growth measurements in solid cultures : Daily colony diameter was plotted vs. time and linear slopes were estimated by statistical regression ($R = 0.99$). This parameter was called u_r and expressed in μ m/h. After seven days the colonies were observed with a Zeiss microscope (40x) provided with a video camera linked to an image processing system with a digitizing Matrox card and a Biocom (France) software called Imagenia 2000, running in an HP Vectra QS/20, AT, computer. Distal hyphal lengths were measured on a VGH monitor using a previously calibrated "mouse" (electronic pantograph). Histograms for $n = 30$ measurements were recorded in order to evaluate the means and standard deviations. The mean hyphal length was called L_{av} . The values of L_c were measured from recently grown mycelia having less than 20 tips. Longest branches were measured using 3.2x magnification. Their average value ($n = 20$) was called L_c . Hyphal diameters were measured on same preparations but using

higher magnification (10x). Specific growth rates were estimated as μ_i ($i = 1,2,3$) according to Eqs. 2, 5 and 6, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows that the values of the extension rate u_r of colonies of *Gibberella fujikuroi* grown on agar plates with media having the same carbohydrate level (80 g/L) but with different percentages of carbon as glucose did not affect the u_r which was close to the average (corrected) value $u_r = 101 \pm 4.86 \mu\text{m/h}$. This value is very similar to that obtained independently by Alvarez and Rodríguez (1993) $u_r = 100.3 \pm 7.1 \mu\text{m/h}$.

In Table 2 the results of estimating μ using equations 2, 5, and 6 are labeled as μ_1 , μ_2 and μ_3 , respectively. The values of the corresponding parameters a_1 , a_2 and a_3 were estimated by minimizing the sum of squared residuals between the μ_{obs} and each μ_i ($i = 1, 2, 3$).

TABLE 1.
EXPERIMENTAL VALUES OF GROWTH PARAMETERS OF *Gibberella fujikuroi* CULTURED WITH DIFFERENT % OF CARBON FROM GLUCOSE IN MIXTURES WITH STARCH

%C from Glucose	u_r ($\mu\text{m/h}$)	L_{av} (μm)	μ_{obs} (1/h)
25.0	103.8	215.3	0.039
37.5	93.3	136.3	N.D.
50.0	102.4	105.5	0.059
62.5	101.7	103.1	0.079
75.0	109.0	172.3	0.048
87.5	101.6	145.4	0.046
100.0	95.1	150.9	0.048
MEAN VALUES	101 ± 5	147 ± 36	0.053 ± 0.013

For Eq. 6, the value $L_o = 5.20 \mu\text{m}$ was used from data shown in Table 3 (average $D_h = 2.60 \mu\text{m}$). Table 2 shows that $a_1 = 12.41$ and $a_2 = 9.64$. The fit to experimental data was better for models 2 and 3 as compared to model 1. Direct microscopic observations shown in Table 3 indicated that the length of L_c was much better estimated by model 3 as compared to models 1 and 2.

The best fit of μ_i ($i=1,2,3$) showed that their maximal values were observed when the % C as glucose was 62.5%, which was similar for μ_{obs} , indicating that the morphometric technique could help to obtain estimates of growth conditions for this kind of organism. Also, it can be shown that according to equations 5 and 6 the value of a_2 can be estimated by Eq. 10.

TABLE 2
FITTING OBSERVED GROWTH RATES (μ_{obs}) OF *Gibberella fujikuroi* WITH VARIOUS
MODELS (μ_1, μ_2, μ_3) OF MYCELIAL KINETICS

%C from Glucose	μ_{obs}	μ_1	μ_2 (μ_i values in 1/h)	μ_3
25.0	0.039	0.034	0.034	0.039
37.5	N.D.	0.049	0.049	0.048
50.0	0.059	0.069	0.069	0.072
62.5	0.079	0.070	0.070	0.074
75.0	0.048	0.045	0.045	0.042
87.5	0.046	0.050	0.050	0.048
100.0	0.048	0.045	0.045	0.044
PARAMETERS:		$a_1=12.41$	$a_2=9.64$	$a_3=2.45$
SUMS OF SQ. RESIDUALS:		0.000798	0.000233	0.000341

$$a_2 = a_3 \ln \left[\frac{a_3 L_{\text{av}}}{L_0} \right] \quad \dots(10)$$

Using the values of Table 1 for those parameters the following result is obtained

$$a_2 = 2.45 * \ln(2.45 * 147 / 5.2) = 10.38$$

This value is very close to $a_2 = 9.64$, which in turn, explains why previous estimates of μ_2 reported by González-Blanco *et al.*, (1993) fit the experimental values of μ_{obs} even though they underestimated u_r by a factor of 10.

TABLE 3
CALCULATED AND OBSERVED VALUES OF L_c (CRITICAL BRANCHING LENGTH) OF *G. fujikuroi* GROWN IN LIQUID AND AGAR PLATES TOGETHER WITH CHANGES IN HYPHAL DIAMETER (D_h). All measurements in this table are given in micrometers.

%C from Glucose	L_c (observed)		L_1	L_2 (calculated)	L_3
	agar	liquid			
0.0	383 ± 87	308 ± 65	2,143	1,665	423
60.0	265 ± 67	240 ± 53	1,570	1,219	310
100.0	280 ± 49	226 ± 51	1,570	1,219	310
%C from Glucose	D_h (observed)		agar	liquid	
0.0			2.38 ± 0.20	2.44 ± 0.17	
60.0			2.63 ± 0.23	2.65 ± 0.40	
100.0			2.87 ± 0.20	2.62 ± 0.23	

Therefore, Eq. 6 is a useful model for estimating μ_{obs} using morphometric data from agar plate cultures to predict growth in stirred fermenters (laboratory scale) and apparently, is consistent with the present knowledge of mycelial

physiology. This approach could also be tried using sparse liquid suspensions of mycelia to estimate L_c and D_h as shown in Table 3, if the value of u_r is known.

REFERENCES

- Alvarez, M., and Rodríguez, E. (1993) B.Sc. thesis on Chem. Eng. Universidad Iberoamericana, México, D.F.(MEX).
- Fiddy, C., and Trinci, A.P.J. (1976) *J. Gen. Microbiol.* 97:167-184.
- González-Blanco, P.C., Larralde-Corona, C.P. and Viniegra-González, G. (1993) *Biotechnol. Techniques* 7(1): 57-62.
- Packer, H.L., and Thomas, C.R. (1990) *Biotech. Bioeng.* 35: 870-881.
- Prosser, J.I. (1991). Mathematical modeling of vegetative growth of filamentous fungi. *In Handbook of Applied Mycology*, D.K. Arora, B. Rai, K.G. Mukerji & G.R. Knudsen (eds.) vol.1, pp.591-623, N.Y. Marcel Dekker, Inc.
- Steele G.C., and Trinci, A.P.J. (1975) *J. Gen. Microbiol.* 91:362-368.
- Trinci, A.P.J. (1974) *J. Gen. Microbiol.* 81: 225-236.
- Viniegra-González, G., Saucedo-Castañeda, G., López-Isunza, F., and Favela-Torres, E. (1993) *Biotech. Bioeng.* 42: 1-10

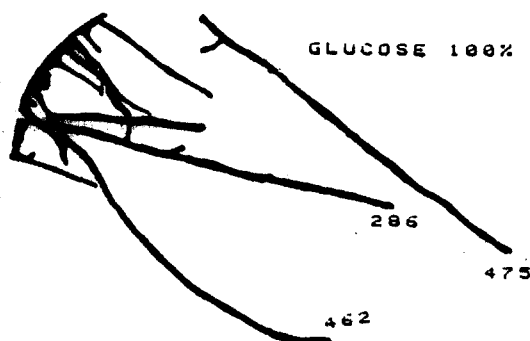


Fig. 1 Leading hyphae of *G. fujikuroi* grown on agar plate having 80 g/L of glucose and mineral salts. Numbers indicate lengths of segments measured in μm .

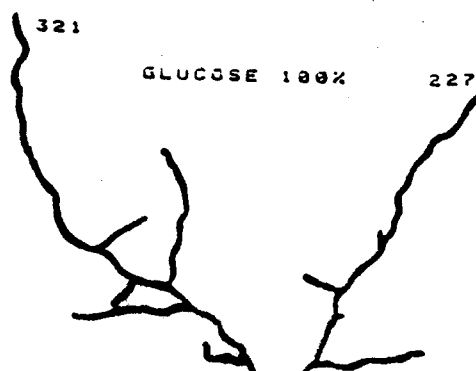


Fig. 2 Longest segments of a mycelium *G. fujikuroi* grown on agar plates with basal medium and 80 g/L of glucose. Numbers indicate lengths of segments measured in μm .

A New Approach for Modelling the Kinetics of Mycelial Cultures

G. Viniestra-González, C.P. Larralde-Corona, and F. López-Isunza

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa, Apartado Postal 55-535, C.P. 09340,
México, D.F., MEXICO

A new approach for modelling the kinetics of mycelial cultures is presented. It involves the estimation of the microscopic branching frequency in terms of the rate of mycelial tip elongation and the critical length of mycelial leading segments. Branching frequency was then related to the macroscopic specific growth rate. Two models for estimating the branching frequency (zero and first order) as a function of segment length, were considered. Simultaneous predictions of the observed values of specific growth rates and critical branching lengths were made in order to compare those models. Also, a macroscopic kinetic expression for the evolution of a mycelial culture was developed, based in terms of a self inhibiting power function of biomass density. Such an expression was used to test the zero and first order models for predicting mycelial growth. Results indicated that the first order model was the more adequate one.

Mycelial cultures have become of great importance for industrial production of antibiotics, enzymes, organic acids and food protein. But unlike single cell cultures, their kinetics are much less understood because of the complex nature of the growth of hyphae having a set of rules for tip extension and branching that have been the subject of basic research for more than 25 years [1 to 6].

Until very recently, the approach often used to model the kinetics of mycelial cultures was based in the estimation of the specific growth rate, μ , a phenomenological coefficient with no specific reference to the fundamental mechanisms of mycelial growth. Due to the advent of computerized image analysis of mycelial cultures [7,8] there is the possibility of developing mechanistic models of mycelial growth which may correlate structural features such as hyphal lengths and diameters to the fundamental aspects of the branching mycelial mechanisms [9 to 13].

In this work, a new approach based on previous work [13, 15, 17] is presented for modelling the kinetics of mycelial growth in terms of the fundamental mechanisms already established for vegetative mycelia.

THE SPECIFIC GROWTH RATE μ IS RELATED TO THE BRANCHING FREQUENCY ϕ .

Mycelial tips are the only parts of the mycelia that grow [1,14]. Their number, N_c , increases in time with a binary branching frequency, ϕ

$$N_c = 2^{\phi t} \quad (1)$$

Mycelial internodal segments can be taken as cylinders with diameter D_h [2,4], critical length, L_c , after which all branch [4,5,14], and average solid content, ρ , which is approximately constant along the hyphae [10]. Hence, in a population of N_0 mycelia, the amount of dry biomass, X_c , for each distal segment of length, L_c , is given by

$$X_c = N_0 \left(\frac{1}{2}\pi D_h^2\right) L_c \rho \quad (2)$$

Assuming that the average number of tips of a single mycelium growing in a broth is N_t , with segment length, L_c , and, recalling that the number of segments N_s , according with [13] is:

$$N_s = 2N_t - 1 \quad (3)$$

Then it follows that:

$$N_s = 2(2^{\phi t}) - 1$$

So

$$N_s = 2^{\phi t + 1} - 1 \quad (3a)$$

The total amount of mycelial biomass will be

$$X = N_o (\frac{1}{2} \pi D_h^2) (2^{\phi t + 1} - 1) L_c \rho \quad (4)$$

Considering that in a large population of mycelia, the average biomass increase is given by an increase in N_t , and using Equations 1 and 4, it is possible to calculate the biomass growth rate as a function of time if it is assumed that the overall average branching frequency ϕ is constant and also by noticing that

$$d(2^{\phi t} - 1)/dt = 2Ln2(\phi 2^{\phi t})$$

then

$$dX/dt = N_o (\frac{1}{2} \pi D_h^2) 2Ln2(\phi 2^{\phi t}) L_c \rho \quad (5)$$

Therefore, the specific growth rate of the biomass, μ_{obs} , is

$$\begin{aligned} \mu_{obs} &= (1/X) dX/dt \\ &= 2Ln2(\phi 2^{\phi t}) / (2^{\phi t + 1} - 1) \quad (6) \end{aligned}$$

From equation 3a (or from 3) it is clear that, for mycelia having more than eight tips ($N_t > 8$), the ratio between the number of tips and segments (N_t/N_s) becomes close to $\frac{1}{2}$ as shown by

$$N_t/N_s = 2^{\phi t} / (2^{\phi t + 1} - 1) \approx \frac{1}{2} \quad (7)$$

Thus, using, Equations 6 and 7, the value of μ_{obs} , can be given approximately by

$$\mu_{obs} \approx \phi Ln2 \quad (8)$$

This result is equivalent to say that the biomass is growing at a fixed exponential rate μ_{obs} between the range of time $t = 0$ ($X = X_o$) and $t = t$ ($X = X_t$)

$$X_t = X_o e^{(\mu_{obs} t)}$$

Then

$$X_t = X_o 2^{\phi t} \quad (9)$$

which indicates that the kinetic constant μ_{obs} can be estimated if the average branching frequency ϕ of the mycelial population is known or viceversa.

ESTIMATING THE BRANCHING FREQUENCY ϕ , IN TERMS OF TWO MICROSCOPIC MODELS OF MYCELIAL ELONGATION.

Several workers [3, 4, 5, 10, 13, 14] have reported that, in a large population of mycelia, the parameter ϕ is proportional to the rate of tip elongation (u_r). Viniegra-González et al [13] tried to generalize this approach using a simple mechanism of symmetrically branching mycelia, by assuming that all tips elongate at exactly the same rate u_r until they reach a critical length, L_c , after which a new branch is formed. Hence, the estimated value for the branching frequency, ϕ , can be calculated as follows

$$\phi = u_r / L_c \quad (10)$$

The value of u_r can be measured as the rate of radial extension of circular colonies of mycelia grown on solid media (K_r according to Trinci [3]) corresponding to the fastest rate of hyphal elongation and, L_c can be estimated by direct microscopic measurement of mycelia grown either

in liquid suspensions [7], in microcultures [3,4] or by image analysis of the periphery of mycelial cultures grown on agar plates [3,4,15].

In order to justify Equation 10 at a mechanistic level, it is worth noting that Trinci [5] reported that, mycelia grown on cellophane extended over Petri dishes, had leading segments of length L , growing according to the following empirical law

$$dL/dt = u_{\max} L / (K_L + L) \quad (11)$$

where, u_{\max} , is the maximum value of the hyphal rate of elongation and, K_L , is a saturation factor. That is, for $L \gg K_L$, $dL/dt \approx u_{\max}$. Thus after integration of Equation 11, an expression is obtained (Equation 12) for the branching frequency taken as the inverse of the critical time, t_c ($\phi = t_c^{-1}$) necessary for reaching a length $L = L_c$

$$\phi = u_{\max} / [K_L \ln(L_c/L_0) + (L_c - L_0)] \quad (12)$$

where L_0 is the initial branch length which has been found to be close to twice the hyphal diameter, D_h [16,17]

$$L_0 \approx 2D_h \quad (13)$$

Now, noting that $L_c \gg 2D_h$, Equation 10 is justified if $u_r \approx u_{\max}$. For example, according to Trinci [5] *Geotrichum candidum* has $L_c = 330 \mu\text{m}$, $D_h = 2.5 \mu\text{m}$ and $K_L = 12 \mu\text{m}$, therefore

$$\phi_1 = u_r / 1.14 L_c \approx u_r / L_c \quad (14)$$

The model based on Equations 8 and 10, is called here the zero order rate law of elongation, or the zero order model,

For $L_c \ll K_L$ a first order rate law of elongation or first order

model is derived as follows, where α is a first order constant

$$dL/dt \approx \alpha L \quad (15)$$

This in turn yields an exponential rate law for L [5,14]

$$L = L_0 e^{\alpha t} \quad (16)$$

For $L = L_c$, at time, t_c , the branching frequency, ϕ_2 , will be given by

$$\phi_2 = \alpha / [\ln(L_c/L_0)] \quad (17)$$

But at t_c , the value of dL/dt reaches its highest expected value which could be measured as the colony extension rate u_r and can be found from Equations 15 and 16 as follows

$$u_r = \alpha L_c \quad (18)$$

Therefore, the branching frequency ϕ_2 can be estimated by

$$\phi_2 = u_r / [(L_c) \ln(L_c/L_0)] \quad (19)$$

This later model (Equation 19) has been tested using experimental data from cultures (on agar plates) of *Gibberella fujikuroi* [17] and *Aspergillus nidulans* [4] as shown in Table 1. For example, in the case of *G. fujikuroi* it was observed that the critical length was in the range of $226 \mu\text{m} < L_c < 308 \mu\text{m}$, with initial length $L_0 = 6.2 \mu\text{m}$ and $u_r \approx 100 \mu\text{m/h}$, and the calculated values for the critical length, called, L_2 , were found in the range of $310 \mu\text{m} < L_2 < 420 \mu\text{m}$ (Table 1). For the zero order model the necessary values of L_c to fit the experimental values of the specific growth rates measured in a stirred fermenter (μ_{obs}) were $L_2 \approx 1,000 \mu\text{m}$ (results not shown in Table 1) and clearly above the experimental values

Table 1. Comparison of calculated (μ_{calc} and L_2) and measured (μ_{obs} and L_c) specific growth rates and apical lengths in cultures of *Gibberella fujikuroi*¹ and *Aspergillus nidulans*².

Organism and culture conditions.	u_r ($\mu\text{m/h}$)	D_h^a (μm)	μ_{obs} (liquid) (1/h)	$\mu_{calc}^\#$ (1/h)	L_c (solid) (μm)	$L_2^\#$ (μm)
<i>G. fujikuroi</i> ¹						
% of C from glucose in	25.0%	104	3.6	0.039	0.039	308
mixtures with starch having total $\text{CH}_2\text{O}=80\text{g/L}$	37.5%	93	3.6	-----	0.048	
	50.0%	103	3.6	0.058	0.072	
	62.5%	102	3.6	0.079	0.074	240
	75.0%	109	3.6	0.048	0.042	310
	87.5%	102	3.6	0.046	0.045	
	100.0%	95	3.6	0.048	0.044	226
						310
<i>A. nidulans</i> ²						
Incubation temperatures (10 g/L glucose)	20 °C	86	2.5	0.090	0.089	--- 184
	25 °C	146	2.5	0.148	0.148	299 188
	30 °C	215	2.5	0.215	0.215	300 190
	37 °C	297	2.5	0.360	0.359	327 164

1. Data from Larralde-Corona [17]; 2. Data from Trinci [4];
a = estimated average value; # = values calculated according to Equations 8 and 19.

Table 2. Macroscopic model for solid substrate fermentation curve of *Aspergillus niger* No.10 grown on cassava meal granules^a.

<u>Experimental data^a</u>			
u_r ($\mu\text{m/h}$)			276
N_0 (spores $\times 10^9$)			1.9
ρ ($10^{-12}\text{g}/\mu\text{m}^3$)			1.1
D_h (μm)			3.3
<u>Non-linear estimated parameters^b (calculated)</u>			
	<u>Logistic</u>	<u>Zero order</u>	<u>1st order</u>
L_c	850 \pm 23	2,308 \pm 159	274 \pm 2.9
X_m	2.65 \pm 0.12	2.99 \pm 0.22	2.69 \pm 0.038
p	1.00	25.3 \pm 138	3.17 \pm 0.49
<u>Statistical parameters</u>			
SSR	0.4583	0.5947	0.0192

a) Experimental data from Larralde - Corona [16], Oriol [21] and Raimbault [22]. b) Parameters calculated from the models presented above, except for the logistic where, by definition $X_c=0$, $p=1$. Numerical calculations were done using the Marquardt technique with a fourth order Runge-Kutta method.

of L_c although the calculated values, μ_{calc} for the specific growth rates were very close to μ_{obs}

The results with *A. nidulans* [4] shown in Table 1 indicate that the calculated values of the critical length L_c , were smaller ($164 \mu\text{m} < L_c < 190 \mu\text{m}$) than the experimental values ($299 \mu\text{m} < L_c < 327 \mu\text{m}$) required by the first order model (Equations 8 and 12) in order to fit the experimental values of specific growth rates, measured in shake flasks (μ_{obs}). However the calculated values for L_2 using the zero order model, were around $700 \mu\text{m}$ (not shown in Table 1) in order to make Equations 8 and 10 to fit μ_{obs} .

The first order model did not fit exactly the experimental values of L_c which were taken as the apical cell length for *A. nidulans* [4], but, its predictions were good enough and can be considered as a better model for the estimation of μ_{obs} of mycelial cultures.

FITTING MACROSCOPIC FERMENTATION CURVES OF MYCELIAL CULTURES.

A population of living organisms growing in a confined space until they reach a maximum level of biomass density X_m can be modelled by Equation 20, proposed by Bertalanffy [18] and Richards [19] for vegetal populations and lately, applied to microbial populations [13,20]

$$dX/dt = \mu_{max} [1 - (X/X_m)^p] X \quad (20)$$

According to Viniegra-González et al. [13] the term $(X/X_m)^p$ can be considered as an empirical power law which measures the probability density function for organisms that stop growing at the fractional density level (X/X_m) . If $0 < p \leq 1$, it is assumed that such a probability increases very fast for relatively small biomass density levels, therefore, it corresponds to a process of early self inhibition. But for $p > 1$, it is assumed that the

growing population is relatively resistant to self inhibition. In particular when $p=1$ this model becomes the so called logistic equation. Also, Viniegra-González et al. [13] showed that it was possible to generalize Equation 20 in order to agree with Equation 6 by using Equations 1, 3 and 4, yielding the following expression

$$dX/dt = \mu_{max} [\frac{1}{2}(X+X_c)] [1 - (X/X_m)^p] \quad (21)$$

Where, $\mu_{max} = \phi(2 \text{Ln}2)$ and $X_c = N_0 (\frac{1}{2} \Pi D_n^2) L_c p$ (see Equations 2 and 6) are parameters that can be estimated from morphometric analysis of mycelia as indicated above and X_m and p are phenomenological parameters to be estimated from this model. Again, as in the preceding section, two model choices, ϕ_1 (zero order) and ϕ_2 (first order), can be made to estimate the actual branching frequency ϕ (Equations 10 and 19). Equation 21 has the interesting property that two fundamental parameters ϕ and X_c share a common parameter, L_c , reducing the degrees of freedom of this model.

According to the data presented in Table 2, the model with the least SSR (sum of squared residuals) was the first order model (SSR = 0.0192) as compared to the logistic equation (SSR = 0.4583) and the worst case was the zero order model (SSR = 0.5947). The first order model had the smallest value for $L_c = 274 \pm 2.9 \mu\text{m}$ (1% error) as compared to a very large $L_c = 2,308 \pm 159 \mu\text{m}$ (7% error) for the zero order model and an intermediate $L_c = 850 \pm 23$ (3% error) for the logistic model. Thus, the first order model was more consistent with available data ($150 \mu\text{m} < L_c < 350 \mu\text{m}$) measured by Larralde-Corona [16] and with a more accurate description of the fermentation curve.

DISCUSSION

The apparent good agreement between microscopic and macroscopic models of dense mycelial cultures seem to support the idea that the

basic mechanisms for mycelial growth are very similar to those observed in the mycelial sparse cultures. That is, the dominant mechanism for mycelial branching seems to be related to a first order rate law in terms of the segment length increase.

The fact that the zero order model implied by Equation 10, does not seem to fit experimental data suggests that very few branches go to lengths well above the saturation constant K_L . Therefore, the average branching frequency is better represented by first order rate law than by zero order rate law.

Recent work [8] suggests that in a short while there will be fully automated image analyzers which will allow one to obtain quick estimates of average dimensions of mycelial structures. They will make possible the correlation of these measurements with others of mycelial biomass (gravimetric or photometric). Thus, the use of the models presented in this paper could help to analyze and control the evolution and metabolism of mycelial cultures. For example, it will be possible to predict the fermentation curves using early morphometric analysis of sparse mycelial cultures and this, in turn, will help to develop on-line and ahead of time control procedures for mycelial industrial fermentations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially financed by the Universidad Autónoma Metropolitana and the Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM). Ms. C.P. Larralde-Corona was supported by a Graduate Fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México). G. Viniegra-González had a Senior Fellowship (Level 3) as National Investigator.

NOTATION

- α First order kinetic constant (h^{-1}).
- ϕ Average branching frequency (h^{-1}).
- ϕ_1 Average branching frequency of the zero order model (h^{-1}).
- ϕ_2 Average branching frequency of the first order model (h^{-1}).
- μ_{calc} Calculated specific growth rate (h^{-1}).
- μ_{obs} Specific growth rate measured in shake flask or fermenter (h^{-1}).
- μ_{max} Maximum specific growth rate (h^{-1}).
- ρ Average biomass solid content ($g/\mu m^3$).
- D_h Hyphal diameter (μm).
- K_L Saturation factor (μm).
- L Length (μm).
- L_0 Initial branch length (μm).
- L_c Critical length of hyphae (μm).
- N_0 Initial number of mycelia.
- N_s Average number of segments in a mycelium.
- N_t Average number of tips in a mycelium.
- p Biomass self-inhibition exponent.
- t_c Time to reach critical length (h).
- u_{max} Maximum hyphal elongation rate ($\mu m/h$).
- u_r Colony extension rate ($\mu m/h$).
- X_0 Dry biomass at time t_0 (g/mL).
- X_t Dry biomass at time t (g/mL).
- X_m Maximum dry biomass (g/mL).

LITERATURE CITED

1. Bartnicki-García, S., F. Hegert and G. Gierz, Protoplasma, 153, 46(1989).
2. Bartnicki-García, S. In "Tip growth in plant and fungal cells" (I.B. Heath editor). Academic Press, Cal. USA (1990).
3. Trinci, A.P.J., Journal of General Microbiology 57, 11 (1969).
4. Trinci, A.P.J., Journal of General Microbiology 67, 325 (1971).
5. Trinci, A.P.J., Journal of General Microbiology 81, 225 (1974).
6. Prosser, J.I. and A.P.J. Trinci, Journal of General Microbiology 111, 153 (1979).
7. Packer, J.I. and C.R. Thomas, Biotechnol. Bioeng. 35, 870 (1990).
8. Thomas, C.R., J. Chem. Tech 56(2), 204 (1993).
9. Aynsley, M., A.C. Ward and A.R. Wright, Biotechnol. Bioeng. 35, 820 (1990).
10. Nielsen, J., Adv. Biochem. Eng. & Biotech. 46, 187 (1992).
11. Yang, H., U. Reichl, R. King and E.D. Gilles, Biotechnol. Bioeng., 39, 44 (1992a).
12. Yang, H., R. King, U. Reichl, and E.D. Gilles, Biotechnol. Bioeng., 39, 49 (1992b).
13. Viniegra-González, G., G. Saucedo-Castañeda, F. López-Isunza and E. Favela-Torres, Biotechnol. Bioeng. 42, 1 (1993).
14. Katz, D., D. Goldstein and R.F. Rosenberger, J. Bacteriol. 109(3), 1097 (1972).
15. González-Blanco, P.C., C.P. Larralde-Corona and G. Viniegra-González, Biotechnology Techniques 7(1), 57 (1993).
16. Larralde-Corona, C.P., "Acoplamiento energético en la germinación de *Aspergillus niger* CH4", M. Sc. Thesis. on Chem. Eng. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, D.F. México (1992)
17. Larralde-Corona, C.P., P.C. González-Blanco and G. Viniegra-González, Biotechnology Techniques 8(4), 261 (1994).
18. Bertalanffy, L. von, Quart. Rev. Biol. 32, 217 (1957).
19. Richards, F.J., J. Exp. Botany, 10(19): 290 (1959).
20. Mulchandani, A., J.H. Luong and A. Leduy, Biotechnol. Bioeng. 32, 639 (1988).
21. Oriol, E., These de Doctorat. Univ. P. Sabatier, Toulouse, France (1988).
22. Raimbault, M., These de Doctorat d'Etat. Univ. P. Sabatier, Toulouse, France (1980).

Morphometric Evaluation of the Influence of High Glucose Levels on the Specific Growth Rate of *Aspergillus niger*.

C. Patricia Larralde-Corona¹, Felipe López-Isunza², and Gustavo Viniestra-González^{1*}

¹Departamento de Biotecnología and ²Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Ap. Postal 55-535, México 09340 D.F.

MÉXICO. Fax + 52 (5) 724 4712, E-mail: vini@xanum.uam.mx

Corresponding author:

Prof. Gustavo Viniestra-González

Depto. de Biotecnología (S-161)

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Apartado Postal 55-535

Iztapalapa 09340, México D.F

MÉXICO

Telephone: +52 (5) 724 4916

FAX: +52 (5) 724 4712

E-mail: vini@xanum.uam.mx

Running title: Morphometry of *A. niger* in hypertonic glucose media.

SUMMARY

The evolution of superficial cultures of *Aspergillus niger* No. 10 was studied at two experimental levels: a) Following the evolution of the biomass density (X [=] mg cm^{-2}) and fitting the data by the logistic expression, which yielded a macroscopic specific growth rate expressed as $\mu_{\text{obs}} = (dX/Xdt) [1 - (X/X_{\text{max}})]^{-1}$; and b) Measuring morphometric parameters like the specific elongation rate (k) of the germinal tubes and their diameters (D_h), the colony rate of radial extension (u_r) and the mean length of distal hyphæ (L_{av}), in order to use them to estimate the specific growth rate with the following proposed expression: $\mu_{\text{calc}} = u_r \ln 2 [(L_{av} \ln(L_{av}/D_h))]^{-1}$. Increases in the initial glucose concentration (10, 40, 70, 120 and 300 g L^{-1}) caused reductions in the specific growth rates, the elongation kinetics of the germinal tubes and the hyphal diameter, nevertheless, u_r and X_{max} presented a parabolic behaviour, showing a maximum around 120 g L^{-1} . The overall macroscopic effect of the tested concentrations of glucose on superficial cultures of *A. niger* was to produce densely packed and slowly extending colonies, where changes in hyphal lengths and diameters were significant. There was good agreement between μ_{obs} and μ_{calc} values, hence microscopic parameters could be used to predict an important macroscopic feature of the colony (the specific growth rate), as affected by high glucose concentration.

Key words: Specific growth rate; hyphal morphometry; *Aspergillus niger*; growth kinetics; glucose effect.

INTRODUCTION

Moulds such as *Aspergillus niger* are fungal organisms that can thrive on aerated surfaces that have high concentration of sugars and low water activity (Gutiérrez-Rojas et al., 1995; Inch and Trinci, 1987; Oriol et al., 1988; Pitt and Hocking, 1977; Raimbault, 1980). The metabolic stress caused by high strengths of glucose syrups has been used mainly to increase the yield of citric acid obtained from solid substrate cultures of *A. niger* strains (Gutiérrez-Rojas et al., 1995). It has been noted that high levels of sugar affect the filamentous structure of fungal cultures, where changes in hyphal length and diameter can be microscopically observed, hence morphometry could be related to changes in the rate of increase of biomass (Nielsen, 1993; Packer and Thomas, 1990; Trinci, 1974; Viniegra-González et al. 1993). One way to study these effects is to look at superficial cultures grown on agar plates, which are readily accessible to microscopic image analysis (Larralde-Corona et al., 1994), and can be studied using various kinds of analytical techniques applied to *in situ* digitized images (Olsson, 1994). The use of these observations offers an interesting possibility to develop a new modelling approach for understanding fungal physiology using semi-structured models of hyphal growth and metabolism (Aynsley et al. 1990; Bartnicki-García et al. 1989; Durand et al., 1994; Georgiou and Shuler, 1986; Mitchell et al., 1991; Monod, 1949; Prosser and Trinci, 1979). This approach is important when it is necessary, for submerged cultures, to predict the effect of the hyphal morphology on the rheological properties of the broth (Olsvik et al., 1991), on the formation of a pellet (Meyerhoff et al., 1995), on the product formation (Cox and Thomas, 1992; Lee and Rho, 1994) patterns and, for solid state fermentation, to predict the invasive behaviour of the mycelia (Viniegra-González et al., 1993).

The aim of this work is to study the effect of high concentrations of glucose on the

morphology of *Aspergillus niger*, and to investigate if there exists a correlation between changes in the microscopic parameters of hyphal growth, such as length, diameter and the elongation rates of the individual hyphæ, using the expression proposed in a previous work by Larralde-Corona et al. (1994) and those of the whole colony, as the corresponding changes in the macroscopic specific growth rate, estimated in terms of changes in the surface density of biomass.

MATERIALS AND METHODS

Strain

The organism used is an amylolytic mould *Aspergillus niger var. hennebergi* N° 10, isolated by M. Raimbault (1980), and belonging to ORSTOM fungal collection (Centre ORSTOM, Montpellier, France).

The spores were conserved on assay screw tubes with sterile water, and stored at 4° C. New spores were produced in 125 mL Erlenmeyer flasks, inoculating few drops of the conservation water in a PDA medium, and incubating them at 35°C for 5 days. The resulting spores were harvested using 50 mL of a sterile Tween 80 solution (0.1% v/v), gently stirring the solid surface with a magnetic bar. The spore concentration was determined using a Neubauer chamber.

Medium

Liquid basal medium had the following composition (g L⁻¹): Glucose, 10; (NH₄)₂SO₄, 0.98; urea, 0.24; KH₂PO₄, 0.50; MgSO₄·7H₂O, 0.6; yeast extract, 0.1; bacteriological agar, 12; trace minerals

solution, 2 mL. The solution of trace minerals had the following composition (g L^{-1}): $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.15; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11; H_3BO_3 , 5.5; $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.8; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.8; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.55; Na_2EDTA , 25. Fifteen millilitres of medium were poured in each 9-cm diameter petri dish.

Cultivation conditions

Media were prepared with different glucose concentrations, keeping a constant C/N ratio of 12 (g/g) by changing $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and urea levels. The glucose concentrations tested were (g L^{-1}): 10, 40, 70, 120 and 300. Initial pH was adjusted to 5.5, and incubation temperature was 35 °C.

Inoculation Techniques

Inoculation was performed in two ways: a) Spreading the spores over the agar surface (lawn type inoculation), and b) Pointwise deposition of the inoculum in the centre of the plate (puncture inoculation). In both cases the inoculum deposited in each plate was 1×10^5 spores.

The lawn cultures were used to measure the amount of biomass produced (and therefore to estimate μ_{obs}), the germinal tube elongation kinetics (*i.e.* k), the hyphal diameter (D_h), and the mean critical length of the germinal hyphæ before the first ramification appeared (L_c).

The puncture cultures were used to measure the radial extension rate of the colony (u_r), the average distal length (L_{av}) and the maximal length achievable without ramification (L_{max}) of the hyphæ growing at the edge of the colony. It is worth mentioning that, for this strain of *Aspergillus niger*, it has experimentally determined that: $2L_{\text{av}} \approx L_{\text{max}}$ and $L_o \approx D_h$.

Analytical Techniques

Biomass measurements

Dry weighing of the mycelium grown over the plate (lawn cultures) was done by lifting the mycelial aggregate from the agar surface and introducing it into a beaker with 200 mL of acidified water (pH 2), allowing it to boil for 2 minutes in a microwave oven, to dissolve any agar residue. The mycelia was then filtered through a Millipore 0.45 μm tared filter membrane, washed with hot distilled water, dried overnight in a stove at 65° C, stored on a dissicator for 24 hours and then weighed.

Morphometry

The hyphal diameter, lengths and the colony diameter were measured using image analysis software (IMAGENIA 2000, Biocom, France). Video images were digitalized using a Matrox card in a 386 PC with a mathematical 387 co-processor. For tubule measurements at least 30 samples were used, and colony diameter was measured in quintuplicate. Average values and standard errors were calculated using a conventional electronic spreadsheet.

THE GROWTH MODEL

A microbial population growing in a batch system normally presents defined kinetics, which comprises four well known main stages: lag, exponential, stationary and death. Due to its simplicity and adequate adjustment, one of the most useful expressions used to describe the

growth curve is the logistic model (Pearl and Reed, 1991), which can be expressed as follows:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad \dots(1)$$

Where μ is the specific growth rate obtained at the exponential stage. It will be considered in this work as the observed or experimental μ value (μ_{obs}). The parameter μ is known to vary with the limiting substrate concentration, and such dependency could be described by the Monod equation (Monod, 1949) as follows:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad \dots(2)$$

When substrate inhibition exists, a common expression for μ is given as:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S \left(1 + \frac{S}{K_i} \right)} \quad \dots(3)$$

For $S \gg K_s$, Equation 3 can be re-written as:

$$\mu \cong \frac{\mu_{\max}}{1 + (S / K_i)} \quad \dots(4)$$

The preceding models (Eqs. 1-4) have been successfully applied to the description of the change of biomass and to calculate the specific growth rate of microbial populations reproducing by binary division (Pirt, 1967), and are useful in the description of fungal cultures growing at high carbon substrate concentrations (Gutiérrez-Rojas et al., 1995; Oriol, 1987).

At the macroscopic level, a filamentous fungal culture growing over agar plates usually forms a circular colony, where changes in diameter may easily be followed. Hence, the radial extension rate, u_r , may be used as a parameter for the description of fungal growth. It is also known that u_r is related to the branching frequency (Trinci, 1974), Φ , defined as the inverse of the characteristic time (τ) elapsed from the initiation of a small branch with an initial length L_0 , up to a critical hyphal length L_c , which depends on the strain and the medium composition. Furthermore, it is known that the microscopic specific growth rate is also proportional to Φ (Trinci, 1971). Assuming that biomass is growing only at the tips and that new tips are produced by binary branching (Viniestra-González et al., 1993), the empirical exponential growth law of biomass production can be related to the microscopic growth function of the number of tips, as follows:

$$e^{\mu\tau} = 2^{\Phi\tau} \quad \dots(5)$$

From Equation 5 an expression for the specific growth rate, μ , as a function of the characteristic time is obtained as:

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} \quad \dots(6)$$

In order to characterize the fungal growth, τ could be estimated by following the hyphal growth from germination to the first branch formation (Trinci, 1974). It has been discussed elsewhere (Carlsen et al., 1996; Larralde-Corona et al., 1994; Nielsen, 1993; Trinci, 1974; Viniegra-González et al. 1993) that during the germination of a single spore, the tubule length follows approximately first order kinetics given by:

$$\frac{dL}{dt} = kL \quad \dots(7)$$

Integrating this expression, and considering that at time $t = \tau$, $L = L_c$, the mean critical hyphal length (L_c) can be obtained as:

$$L_c = L_o e^{k\tau} \quad \dots(8)$$

These relations have been successfully compared to experimental values from cultures of *Gibberella fujikuroi* (Larralde-Corona et al., 1994). By using Eq. 8 it is possible to calculate a microscopic growth parameter: the specific elongation rate (k), expressing the velocity at which the elongation process takes place. Re-arranging Eq. 8, an expression for τ is obtained as:

$$\tau = \frac{\ln \left[\frac{L_c}{L_o} \right]}{k} \quad \dots(9)$$

On the other hand, the maximum value of the elongation rate, dL/dt (Eq. 7), may also be

estimated following the radius of a circular colony, where the observed rate of hyphal extension corresponds to the “faster runners” since the slower ones will remain within the bulk mycelia. This rate could be defined as u_r , the radial extension rate of the colony, which may be estimated as:

$$u_r = k L_{av} \quad \dots(10)$$

Where L_{av} is the mean length of the hyphæ growing at the edge of the colony (distal hyphæ), from their tip to the first observable branch. Equating Equations 6 and 9, a simpler expression can be obtained to calculate μ as an inverse function of τ . Substituting the expression for k (Eq. 10), an expression for μ as a function of the morphometric parameters u_r , L_{av} and D_h , is obtained:

$$\mu_{calc} = \frac{u_r}{L_{av}} \left(\frac{\ln 2}{\ln \left(\frac{L_{av}}{D_h} \right)} \right) \quad \dots(11)$$

It is worth noting that Equation 11, presented previously by Larralde-Corona et al. (1994), has been modified in the logarithmic ratio parameters by substituting the value of D_h for that of L_o , due to the fact that, when L_o was calculated from Eq. 8, it corresponded to the experimental values of D_h ; also the parameter L_c (individual) was substituted by L_{av} (colony). Since the intention is to predict a colonial property, it seemed reasonable to use a colony parameter. Later, the numerical analysis of the calculated values of μ confirmed that this reasoning was adequate. This expression has been tested to assess its utility in predicting specific growth rates of some

moulds, grown in submerged cultures (Larralde-Corona et al., 1994) and solid state fermentors (Viniestra-González et al., 1993), and in this work Eq. 11 is used to describe the growth kinetics of *Aspergillus niger* on agar plates.

It has also been observed (Nielsen, 1993; Trinci, 1971) that, for the rate of elongation of individual hyphæ, there is a saturation behaviour analogous to that observed for the specific growth rate, which is given by:

$$\frac{dL}{dt} = \frac{u_r L}{K_L + L} \quad \dots(12)$$

Solving this equation for $t = \tau$ when $L = L_c$, the following expression for τ is obtained:

$$\tau = \frac{1}{u_r} \left[K_L \left(\ln \left[\frac{L_c}{L_o} \right] \right) + (L_c - L_o) \right] \quad \dots(13)$$

The parameter K_L in Eq. 13 was estimated from experimental data, using u_r and L_c from micrometric measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental study was divided in two main parts: germination and colony growth. It is known (Trinci, 1974) that each stage has its own growth features; nevertheless, it was assumed that both are connected by a common characteristic that could be quantified, such the specific growth rate of biomass.

Germination stage

Values of k , D_h and L_c were measured from hyphæ growing on petri dishes inoculated by the lawn-type technique, during the stage of germination.

The evolution of hyphal length for each glucose level is shown in Fig.1. These curves present a sigmoidal shape, and at their inflexion point, the maximum specific elongation rate (k) could be calculated. This parameter was maximum at the lowest glucose level (10 g L^{-1}), indicating that the branching process started first at this concentration. Therefore, the rate constant, k , seems to be inhibited by an excess of glucose concentration ($S_o > 10 \text{ g L}^{-1}$) which may be related to lower values of water activity (a_w) commonly associated with high levels of glucose concentration (Auria et al., 1995; Oriol, 1987).

Maximum tubule lengths were measured just before the sprouting of the first branch and were labelled as the critical length (L_c) for each substrate concentration. Such values are marked with arrows in Fig.1 and plotted in Fig. 4, where it may be observed that the global maximum of L_c was found when $S_o = 10 \text{ g L}^{-1}$. In Fig. 4 it is shown that there are two distinct regions for L_c vs. S_o : Region 1 defined by the range $10 \text{ g L}^{-1} < S_o < 120 \text{ g L}^{-1}$ in which L_c has a negative slope; and Region 2 in the range $S_o > 120 \text{ g L}^{-1}$ where L_c has a positive slope (Fig.4).

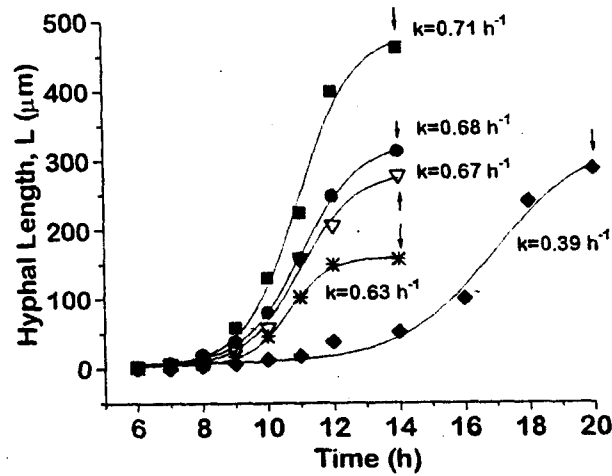


Figure 1. Elongation kinetics of the germinal hyphae at various initial glucose concentrations: (■) 10, (●) 40, (▽) 70, (*) 120, (◆) 300 gL⁻¹.

The values of the branching initiation time (τ) and the K_L were estimated from Equation 13, and are shown in Table I. To calculate the real time of germination, six hours were added to the values of τ reported, because this is the time at which the first germinal tubules appeared. The values of τ (Table I) showed that they increased proportionally to the initial glucose concentration, signifying that there was a delay in the germination process as the glucose concentration increased. This observation is in agreement with the fermentation curves of *A. niger* 10 grown on bagasse impregnated with glucose syrups and mineral salts (Oriol et al., 1988), and also in packed columns using Amberlite as support (Auria et al., 1995), indicating that it is possible to predict fermentation delays, related to an excess of glucose concentrations, by measuring the parameter τ in microcultures.

The predicted parameters K_L were similar for all glucose concentrations except at the lowest value (10 gL^{-1}). This parameter has been used by other authors (Carlsen et al., 1996; Trinci, 1971) to fit experimental data of hyphal elongation. Here it is stressed that this parameter differs from the saturation constant of Monod expression (Monod, 1949) because it is itself a function of glucose concentration.

Hyphal diameter (D_h) values decreased exponentially with increasing glucose levels, as is shown in Table I. The decrease of the hyphal diameter with increasing substrate concentration has been observed previously (Mitchell et al., 1991; Wiebe and Trinci, 1991; Wiebe et al., 1992). To the knowledge of the authors, no mechanistic model describing this phenomena has yet been published, although apparently it is an important adaptation mechanism of mycelial cells to culture media with high osmotic pressure.

Colony stage

The values of the radial extension rate (u_r), the average (L_{av}) and maximum (L_{max}) lengths of the distal hyphæ (Table I) were measured in puncture-type inoculated dishes, and the evolution of the quantities of biomass density (X) and maximum biomass (X_{max}) were measured in plates inoculated using the lawn-type technique.

The elongation velocity of the colony, u_r , (Table I) showed a quadratic trend when plotted vs. S_0 , having a maximal value at 90 gL^{-1} . Hence the elongation kinetics at macroscopic level measured as u_r is different from the microscopic elongation of individual germinating hyphæ, measured as k , presented above.

Table I.-Effect of glucose on morphometric parameters of the colony of *Aspergillus niger*, and predicted parameters (τ and K_L) of Eq. 13.

Glucose (gL ⁻¹)	u_r ($\mu\text{m h}^{-1}$)	D_h^* (μm)	L_{av}^* (μm)	L_{max} (μm)	K_L (μm)	τ (h)
10	346	6.32 \pm 0.69	218 \pm 94	542	526	5.99
40	556	5.44 \pm 0.90	542 \pm 272	1219	924	8.61
70	614	4.95 \pm 0.64	461 \pm 254	1200	1047	8.47
120	580	4.85 \pm 0.84	452 \pm 228	874	1085	9.25
300	381	3.37 \pm 0.36	642 \pm 291	1166	965	15.0

* \pm SD

The glucose concentration where maximum value of u_r was observed, is similar to that obtained for *Aspergillus nidulans* (Trinci, 1969). The decrease of u_r at higher glucose concentrations was attributed to the accumulation of toxic products or changes in the pH of the media. A similar result was observed in cultures of *Penicillium roqueforti* (Gervais et al., 1988), and has been related decreasing values of a_w , lower than 0.97, which correspond, according to Oriol (1987), to a glucose solution of approximately 130 gL⁻¹. Also, Inch and Trinci (1987) have studied the a_w depressing effect of polyethylene glycol on the u_r values of *Paecilomyces farinosus*, indicating an inhibitory effect with $a_w < 0.98$. These authors propose that "colony growth rate is a valid way of assessing the effect of water activity on mould growth".

The parameters L_{av} and L_{max} , as a function of S_0 , have their minimal values at $S_0 = 10 \text{ gL}^{-1}$ (Table I); this behaviour is opposite to that of L_c , indicating again that the bulk mycelia adapts to high levels of S_0 in quite a different way compared to isolated and recently germinated hyphae.

Using data from Table I, it was possible to estimate the critical volume for the distal hyphae in the colonies ($V_{cc} = (\pi/4) L_{max} D_h^2$). Comparing this with the critical volume measured in the germinal tubules ($V_{cg} = (\pi/4) L_c D_h^2$), the diameter, D_h , was found to be the same in both experimental systems. The trend of V_{cc} shows a distinct maximum around 40 gL^{-1} , whereas V_{cg} was found to monotonically decrease with S_0 (Fig. 2).

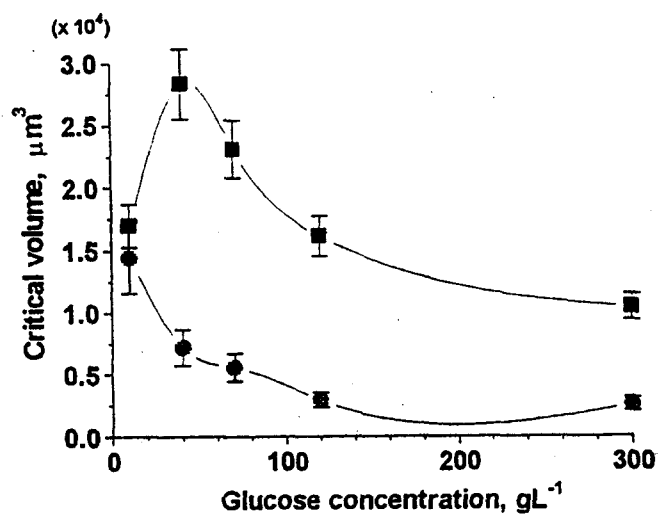


Figure 2. Critical volumes of the germinal hyphae (●) and the largest distal hyphae (■) at different initial glucose concentrations.

These observations corroborate the idea that the effects of the media over the mycelial structure depend on the maturity of the hypha and its aggregation level. Nevertheless, the hyphal

diameter was the same in both stages, suggesting that length and diameter are not regulated at the same physiological level, and that the hyphal diameter is fixed from the beginning of the growth process. The colony biomass could then be determined by changes in the apical extension rate or in the branching frequency, quantities that seem to be regulated independently (Wiebe et al., 1992).

The time evolution of biomass density, X , is shown in Fig. 3 to have a definite sigmoidal shape which could be adjusted by Eq. 1. Parameter X_{\max} , showed a parabolic response to S_0 values (Fig. 4). The negative effect of high levels of S_0 on X_{\max} (Fig. 4) may be related to lower biomass yields and has been attributed to a higher maintenance energy (Oriol et al. 1988), due to production of osmorregulating substances (Gervais et al., 1988) such as erythritol and glycerol (Gutiérrez-Rojas et al., 1995).

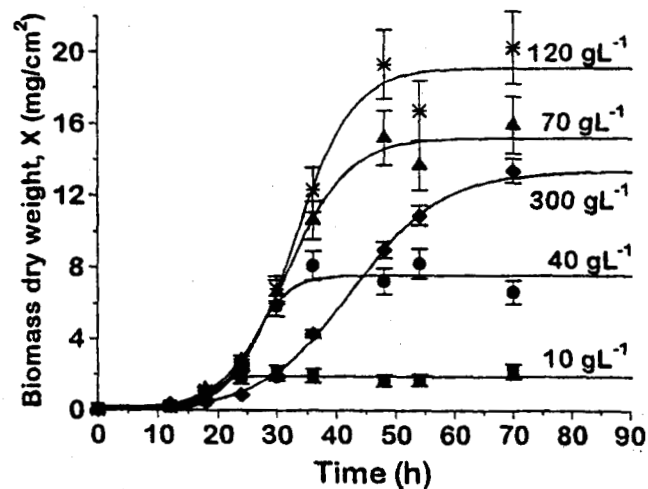


Figure 3. Time evolution of biomass at the different glucose concentrations.

There was a definite glucose inhibition effect ($S_0 > 10 \text{ gL}^{-1}$) on μ_{obs} which could be inferred from the monotonically descending sequence of this rate constant with respect to increasing values of S_0 (Fig. 5). The μ_{obs} values, obtained by the fit of Eq. 1 to growth curves shown in Fig. 3, were introduced into Eq. 4, obtaining the following parameters: $\mu_{\text{max}} = 0.30 \pm 0.035 \text{ h}^{-1}$, and $K_i = 132 \pm 52 \text{ gL}^{-1}$. This value of μ_{max} is very close to the one estimated previously by Oriol (1987) using the same strain of *A. niger*, but calculated on the basis of respiration rates. The decreased value of μ_{obs} at high S_0 was similar to the behaviour observed for D_h , indicating that changes in μ and D_h are part of the adaptation of the mould growth to decreasing values of water activity.

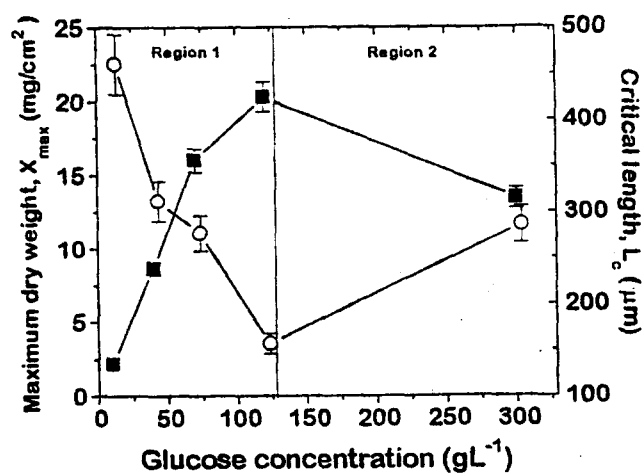


Figure 4. Critical length, L_c , of the germinal hyphae (\circ) and maximum biomass, X_{max} (\blacksquare) measured as dry weight produced at different glucose initial concentrations.

It is interesting to note that the effect of glucose level on X_{\max} and u_r were similar, showing a maximum at around 120 gL^{-1} , and both were like a mirror image of the L_c (Fig.4). This structural inverse correlation seems to indicate that dense mycelial mats grow with short branches. On flat surfaces, the major effect of high sugar levels is to increase mycelial density and the radial extension rate to a maximum value.

Comparison of growth parameters

The calculated values of K_L for the germinating tubules were similar to the observed values of L_{\max} at the edge of the colony (Table I). Although these values were not the same, the average ratio between them was 0.93. Considering that length measurements have an average error of 10%, it may be concluded that the values of K_L , measured at germination stage, correspond physically to the maximum distal length achievable for the hyphae at the edge of the colony, for each glucose concentration. Also, the maximum elongation rate during germination (not shown) was half the value of u_r of the colony, as is predicted from Equation 12.

The mechanistic nature of K_L has not yet been assigned (Nielsen, 1993; Trinci, 1971), but a semi-structured model for hyphal growth was proposed by Aynsley et al. (1990) which considers two Michaelis-Menten type reaction steps: A) the conversion of substrate to wall precursors ($S \rightarrow P$), and B) the conversion of P to wall structural building blocks ($P \rightarrow W$). This mechanism is similar to the one proposed in this work (Eq. 13). However, it does not explain why a saturation effect on the length L exists. The actual data suggest that K_L is dependent on S_0 , and that hyphal tip enlargement is mainly controlled by the coupling of mass transport to growth kinetics inside the hypha (unpublished work), situation that should be taken into account in future models of hyphal growth.

The values of L_{\max} were similar to those reported ($1,137 \pm 313 \mu\text{m}$) for the peripheric growth zone (w) of another strain of *Aspergillus niger* (Trinci, 1971). The parameter w , together with u_r , was used by Trinci in order to estimate the specific growth rate (α) of the periphery of fungal colonies as: $\alpha = u_r/w$, comparing the values calculated with the specific growth rate obtained in submerged cultures. In this way, he apparently found a method to predict the growth in submerged cultures measuring growth parameters at the edge of a superficial culture, which then could be compared to the prediction of μ measured in solid cultures. Nonetheless, this expression was unable to predict the value of μ using the measurements presented in this work.

Prediction of the colony specific growth rate

The specific elongation rate (k) of the germinal hyphae (Fig. 1) presented the same tendency as the specific growth rate (μ_{obs}) indicated in Fig. 5. The k values are of the order of 3.5 times the values of μ_{obs} . However, it has been reported by Carlsen et al.⁴ that, in submerged batch cultures, the specific growth rate, estimated by dry weight, corresponds to the specific elongation rate, measured by following the total hyphal length during the vegetative growth stage. It seems reasonable that this could be the same case in superficial cultures, however, it was not measured in the present work. Instead, the values of the morphometric parameters L_{av} and D_h , and the radial extension rate, u_r , were substituted into Equation 11 to calculate the specific growth rate (μ_{calc}) for each glucose level. Predicted values showed good agreement with observed ones (Figure 5), having a sum of the squared residuals of 0.00104 and $R^2 = 0.98$.

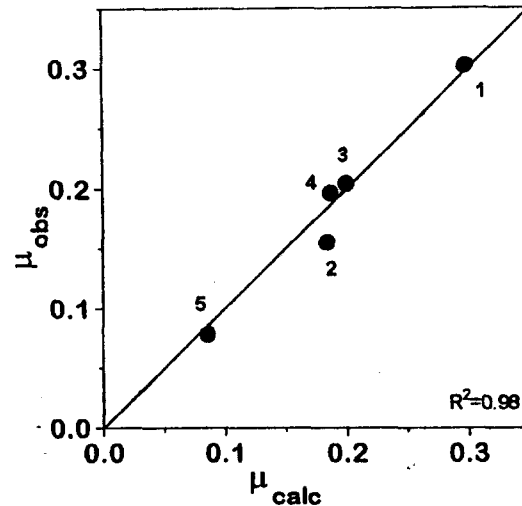


Figure 5. Comparison of the observed and calculated values of μ at: (1) 10, (2) 40, (3) 70, (4) 120 and (5) 300 gL^{-1} of glucose.

The fact that Equation 11 was able to predict the experimental values of μ could support it as a phenomenological equation of fungal growth based on morphometric (microscopic) data. It also indicates that L_{av} is a good estimate of a weighted average of various types of critical lengths since Meyerhoff et al. (1995) have suggested the need to consider at least two different critical lengths (assigned by them as L_1 and L_2) in order to estimate the average branching frequency in a mycelial mat. L_1 would be related to the primary branch and L_2 to secondary branches.

The differences in morphometric data for dispersed and densely packed mycelia, such as, the critical branching lengths and the rates of tip elongation, suggest that caution should be taken when trying to predict the physiology of dense cultures by using measurements on early dispersed mycelia.

CONCLUSIONS

By means of the image analysis technique it was possible to corroborate the idea that, the branching frequency, considered as the inverse of the time, τ , required for the first branch to sprout, can be related to the specific growth rate of the culture. This relationship may be regarded as a microscopic method for measuring the rate of superficial growth and is equivalent to the familiar doubling time used in single cell cultures. The microscopic data necessary to predict the macroscopic specific growth rate of a dense surface culture, appears to be the hyphal diameter, D_h ; the distal average length, L_{av} , and the colony extension rate, u_r . The comparison of the observed and predicted specific growth rates yielded a small value of the sum of squared residuals. Therefore, the use of the proposed model in equation 11, may be considered as an adequate method to estimate specific growth rates of *Aspergillus niger* cultured on agar plates, at different glucose concentrations.

The morphometric analysis of superficial cultures of *Aspergillus niger* showed that high levels of glucose monotonically decrease the specific growth rates, the apical elongation rate of the germinal tubes and the hyphal diameter, but produced a parabolic behaviour of the colony extension rate and the biomass density.

This approach gives an experimental and mathematical basis to use image analysis of surface cultures as a potential (fast and non destructive) way to measure the physiology of such kind of cultures, specially, if image analysis is performed using high speed computing techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for the financial support to Ms. Larralde-Corona, and to the Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) for the mould strain.

NOMENCLATURE

D_h	Hyphal diameter, μm
k	Specific elongation rate, h^{-1}
K_i	Inhibition constant, g L^{-1}
K_L	Saturation length, μm
L	Hyphal length, μm
L_{av}	Mean length of distal hyphæ, μm
L_c	Mean critical length just before branching process begins, μm
L_{max}	Maximum length of distal hyphæ, μm
L_o	Initial hyphal length, μm
S_o	Initial glucose concentration, g L^{-1}
u_r	Colony rate of radial extension, $\mu\text{m h}^{-1}$
V_{cc}	Critical volume of the largest distal hyphae in the colony, μm^3
V_{cg}	Critical volume of the germinal tubules, μm^3
X	Biomass density, $\text{mg}_{\text{dry weight}} \text{cm}^{-2}$
X_{max}	Maximum biomass density, $\text{mg}_{\text{dry weight}} \text{cm}^{-2}$

Greek letters

Φ	Branching frequency, h^{-1}
μ	Specific growth rate, h^{-1}
μ_{calc}	Calculated specific growth rate, h^{-1}
μ_{max}	Maximum specific growth rate, h^{-1}
μ_{obs}	Experimental specific growth rate, h^{-1}
τ	Characteristic time of branching initiation, h

REFERENCES

- Auria, R., Ortiz, I., Villegas, E., Revah, S. 1995. Influence of growth and high mould concentrations on the pressure drop in solid state fermentations. *Process Biochemistry* 30(8): 751-756.
- Aynsley, M., Ward, A.C., Wright, A.R. 1990. A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 820-830.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., Gierz, G. 1989. A novel computer model for generating cell shape: application to fungal morphogenesis. In: Kuhn et al. (eds), *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Springer-Verlag, Berlin.
- Carlsen, M., Spohr, A. B., Nielsen J., Villadsen, J. 1996. Morphology and physiology of an α -amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* 49(3): 266-276.
- Cox, P.W., Thomas, C.R. 1992. Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 39(9): 945-952.
- Durand, G., Cox, P.W., Formisyn, P., Thomas, C.R. 1994. Improved image analysis algorithm for the characterisation of mycelial aggregates after staining. *Biotechnol. Techniques*, 8(11):759-764.
- Georgiou, G., Shuler, M.L. 1986. A computer model for the growth and differentiation of fungal colony on solid substrate. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 405-416.

- Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M. 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* 31(4): 457-463.
- Gutiérrez-Rojas, M., Córdova, J., Auria, R., Revah, S., Favela-Torres, E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnol. Letters* 17(2): 219-224.
- Inch J.M.M., Trinci A.P.J. 1987. Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *Journal of General Microbiology* 133, 247-252.
- Larralde-Corona, C.P., González-Blanco, P.C., Viniegra-González, G. 1994. Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth rate of *Gibberella fujikuroi* by image analysis techniques. *Biotechnology Techniques* 8(4): 261-266.
- Lee, K.J., Rho, Y.T. 1994. Quantitative analysis of mycelium morphological characteristics and rifamycin B production using *Nocardia mediterranei*. *J. Biotechnol.* 36: 239-245.
- Meyerhoff, J., Tiller, V., Bellgardt, K.H. 1995. Two mathematical models for the development of a single microbial pellet. Part I: Detailed morphological model based on the description of individual hyphae. *Bioprocess Engineering* 12, 305-313
- Mitchell, D.A., Do, D.D., Doelle, H.W., Greenfield, P.F. 1991. A semi-mechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 353-362.

- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology* 371-394.
- Nielsen, J. 1993. A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 715-727.
- Olsson, S. 1994. Uptake of glucose and phosphorus by growing colonies of *Fusarium oxysporum* as quantified by image analysis. *Experimental Mycology* 18: 33-47.
- Olsvik, E., Tucker, K.G., Thomas, C.R., Kristiansen, B. 1993. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 1046-1052.
- Oriol E. Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activite de l'eau. These de Doctorat Microbiologie, Inst. Nat. Sci. Appl. de Toulouse, France. 1987.
- Oriol, E., Raimbault, M., Roussos, S., Viniestra-González, G. 1988. Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *App. Microb. Biotechnol.* 27: 498-503.
- Oriol, E., Schettino, B., Viniestra-González, G., Raimbault, M. 1988. Solid-state culture of *Aspergillus* on support. *Journal of Fermentation Technology* 66(1): 57-62.
- Packer, H.L., Thomas, C.R. 1990. Morphological measurements of filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 870-881.

- Pearl, R., Reed, L.J. 1991. On the rate of growth of the population of the United States since 1790 and its mathematical representation. In: Modelling biological populations in space and time. Ed. Eric Renshaw, Cambridge University Press, U.K.
- Pirt, S.J. 1967. A kinetic study of the mode of growth of surface cultures of bacteria and fungi. *Journal of General Microbiology* 47: 181-197.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1977. Influence of solutes and hydrogen ion concentration on the water relation of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology* 101: 35-40.
- Prosser, J., Trinci, A. P. J. 1979. A model for hyphal growth and branching. *Journal of General Microbiology* (111): 153-164.
- Raimbault, M. 1980. Croissance de champignons filamenteux sur substrats amylacés. Thèse de Doctorat d'Etat. Univ. P. Sabatier, Toulouse France.
- Trinci, A. P. J. 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology* 57: 11-24.
- Trinci, A. P. J. 1971. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. *Journal of General Microbiology* 67: 325-344.
- Trinci, A. P. J. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of General Microbiology* 81: 225-236.
- Viniegra-González, G., Saucedo-Castañeda, G., López-Isunza, F., Favela-Torres, E. 1993. Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. *Biotechnol. Bioeng* 42:1-10.

Wiebe, M. G., Trinci, A. P. J. 1991. Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 38(1): 75-81.

Wiebe, M. G., Robson, G. D., Trinci, A. P. J. 1992. Evidence for the independent regulation of hyphal extension and branch initiation in *Fusarium graminearum* A3/5. *FEMS Microbiol. Letters* 90, 179-184.