
129830

// ACOPLAMIENTO ENERGÉTICO EN LA GERMINACIÓN
DE *Aspergillus niger* CH₄ //

TESIS QUE PRESENTA LA
ING. BIOQ. IND. CLAUDIA PATRICIA LARRALDE CORONA

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA QUÍMICA

SEPTIEMBRE DE 1992

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

74060993

129830

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

Acoplamiento Energético en la Germinación
de *Aspergillus niger* CH4

Tesis presentada ante la División de
Ciencias Básicas e Ingeniería como requisito para obtener
el grado de Maestra en Ingeniería Química por

Claudia Patricia Larralde Corona.

Asesores:

Dr. Héctor Felipe López Isunza.

Dr. Gustavo Viniegra González.

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

México D.F. a 28 de Septiembre de 1992.

Agradecimientos

De manera indiscutible, lo mejor de esta tesis fue que me permiti6 trabajar y ser dirigida por 2 de las personas que considero de lo mejor, en todos los aspectos, de la UAM y sus alrededores físicos y académicos: Felipe López Isunza y Gustavo Viniegra González. GRACIAS.

El apoyo moral de nuestros amigos fue, y es, sin duda un factor determinante para no abandonar el objetivo final: terminar, para volver a empezar, siempre. A los compañeros de viaje, gracias.

Agradezco definitivamente al CONACYT el, desgraciadamente, vital apoyo financiero otorgado para poder dedicar tiempo completo a la realización de este trabajo.

A Rafael, por todos estos años.

A mis padres, por supuesto.

INDICE

Resumen.....	I
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes sobre la germinación de mohos.....	7
1.2 Utilización de la fuente de carbono.....	12
Objetivos Generales.....	16
Objetivos Particulares.....	16
Capítulo 2. Métodos experimentales	
2.1 Cepa.....	18
2.2 Medios de propagación y germinación.....	18
2.3 Equipo experimental.....	19
2.4 Análisis realizados.....	20
2.4.1. Porcentaje de germinación.....	20
2.4.2. Consumo de glucosa.....	20
2.4.3. Síntesis de proteína.....	20
2.4.4. Respiración.....	21
2.4.5. pH.....	21
2.4.6. Cambios en la morfometría.....	21
Capítulo 3. Métodos teóricos: Modelos matemáticos y cálculo de parámetros	
3.1 Revisión de modelos matemáticos del crecimiento.....	23
3.2 Procesamiento de imágenes para el seguimiento del crecimiento de los micelios.....	27
3.3 Definiciones básicas: Factor de rendimiento, tasa específica de crecimiento y demanda biológica de O ₂	29
3.3.1. <i>Factor de rendimiento</i>	30
3.3.2. <i>Tasa específica de crecimiento</i>	33
3.3.3. <i>Demanda biológica de oxígeno</i>	33
3.3.4. <i>Descripción del consumo de sustrato y O₂</i>	34
3.4 Elongación de la hifa.....	36

Capítulo 4. Resultados y discusión.	
4.1 Porcentaje de germinación.....	38
4.2 Consumo de glucosa.....	41
4.3 Tasa de respiración.....	43
4.4 Síntesis de proteína.....	45
4.5 Cambio en el pH.....	49
4.6 Procesamiento de imágenes.....	52
Imágenes para 1 g/L.....	56
4.7 Tratamiento de los resultados. Factor de rendimiento.....	60
4.7.1 Tasa específica de crecimiento y de elongación.....	62
4.7.2 Cinéticas de consumo de glucosa y oxígeno.....	67
4.8 Efecto del 2,4-Dinitrofenol en la elongación.....	70
Conclusiones.....	75
Apéndice A.....	78
Bibliografía.....	80

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la germinación en medio líquido de conidiosporas de *Aspergillus niger* CH4 a diferentes concentraciones iniciales de glucosa (0.01, 0.1, 1 y 10 g/L) con una relación C/N de 5, midiéndose los siguientes parámetros: Porcentaje de germinación, pH, consumo de glucosa, síntesis de proteína y tasa de respiración; además se utilizó la técnica de procesamiento de imágenes para hacer el seguimiento de la longitud y diámetro del túbulo germinativo y el diámetro de la espora.

Se observó que en el nivel de glucosa más bajo se presentaba una utilización mas eficiente del sustrato, reflejado en un factor de rendimiento mayor (0.78), esto es, se observó el efecto del acoplamiento energético.

La técnica de procesamiento de imágenes permitió el obtener datos para calcular la tasa específica de elongamiento, como un parámetro de cuantificación y medición del crecimiento de filamentos, así como para verificar el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre la velocidad de elongación, así como la longitud máxima que puede alcanzar una espora germinada antes de presentar la primera ramificación.

Es de hacer notar que la tasa específica de elongación tiene una dependencia con la concentración inicial de glucosa del tipo Monod, es decir, tiene un comportamiento análogo al de la tasa específica de crecimiento, con la ventaja de que resulta metodológicamente más fácil de medir la longitud del túbulo que la concentración de biomasa.

C A P I T U L O 1

I N T R O D U C C I O N

El estudio de la fisiología de los hongos filamentosos es de suma importancia, tanto por el valor científico que representa, como por el hecho de que es información que se requiere cuando se desea operar y controlar de manera eficiente un proceso en el cual se utilicen estos microorganismos. El conocer cómo se modifica la cinética de crecimiento con las condiciones ambientales permite el mejoramiento y optimización de la fermentación, con todos los beneficios que esto implica.

Entre los mohos más utilizados para la fermentación sólida tenemos al *Aspergillus niger*, que se utiliza en la producción de enzimas, tales como amilasas, proteasas y pectinasas, además de ser un gran productor de ácidos orgánicos, principalmente ácido cítrico (Bailey y Ollis, 1986).

Su ciclo de vida comprende las fases de latencia, germinación, crecimiento vegetativo y esporulación. Su reproducción es asexual, mediante la producción mitótica de conidiosporas. A continuación se presenta una breve reseña de lo que sucede en cada una de estas fases:

El estadio de latencia se define como aquel "...período de descanso o interrupción reversible del desarrollo fenotípico de un organismo" (Sussman y Douthit, 1973).

En esta fase el organismo se encuentra en forma de conidiospora, la cual es una estructura rígida semiesférica, de aproximadamente 5 μm de diámetro, en la que no se detecta síntesis de proteínas ni de ácidos nucleicos, además de presentar una respiración mínima o nula y cuyo contenido de agua es bajo (Van Etten, Dahlberg y Russo, 1984). La pared exterior, encargada de la resistencia de la espora, tiene la siguiente composición: Carbohidratos neutros (73-83%), hexosamina (9-13%), lípidos (2-7%), proteínas (0.5-2.5%) y fósforo (<0.1%); además contiene el pigmento característico de este microorganismo, la nigerina, el cual es un

polisacárido, pero que no es utilizado como fuente de carbono (Johnston, 1965).

En general las esporas contienen grandes reservas de material alimenticio, sin embargo, se ha observado que las conidiosporas de *Aspergillus niger* contienen apenas el 4 % de lípidos en peso seco (Gunasekaram y col., 1972 a,b), lo cual nos indica que la mayoría de sus reservas no son de alto contenido energético, teniéndose con esto que su potencial de automantenimiento, una vez roto el período de latencia, es bajo, lo que explica lo publicado en el sentido de que las conidiosporas de este organismo no germinan si se les coloca en agua destilada solamente (Roussos, 1987).

Si bien el desarrollo fenotípico se encuentra detenido, esto no significa que la espora no contenga toda la herramienta enzimática necesaria para la utilización de sustratos complejos, llevando a cabo incluso transformaciones que no se presentan en las siguientes etapas del crecimiento, tal y como son la hidroxilación de esteroides, conversión de triglicéridos y ácidos grasos a metil-cetonas, hidrólisis de penicilina a ácido 6-aminopenicilánico, e hidrólisis de almidón a glucosa (Vezina, Sehgal y Singh, 1968).

La latencia no se encuentra totalmente comprendida en cuanto a los mecanismos internos que permiten su establecimiento y su capacidad mantenerse, proponiéndose los siguientes mecanismos físicos y químicos para explicarla:

1.-Cambios en la permeabilidad: Se sabe que la permeabilidad de la pared de la espora antes y después de la germinación es diferente, dado que difieren en el índice de refracción de la pared, lo cual esta indicando una diferencia en las propiedades de transporte y composición, sin embargo, esto no impide que existan algunas sustancias esenciales, como la glucosa y el agua, que pueden fluir libremente en cualquier momento, por lo que esta teoría no puede, por sí sola, explicar el mantenimiento de la latencia.

2.-Compartimentalización: Se ha publicado la existencia de membranas dentro de la espora que impiden el contacto físico de ciertas enzimas con sus sustratos, barrera que desaparece una vez activada la espora. Sin embargo, han sido pocas las especies de mohos en los que se ha podido observar esta compartimentalización.

3.-Autoinhibidores: Existen sustancias, propias de cada especie, que se encuentran en la pared externa de la conidiospora, que impiden su germinación, aún cuando estén en presencia de sustrato, por un mecanismo que no se encuentra bien establecido, y que tienen mayor efecto entre mas esporas se encuentran presentes. Estas sustancias son generalmente solubles en agua, por lo que pueden ser removidas mediante un simple lavado (Krishnan y col, 1954; Barrios y col., 1989)

La idea mas aceptada es que no es uno sino varios los mecanismos que entran en juego para conservar a la espora en latencia, dado que solamente en condiciones favorables debe de germinar para asegurar su ulterior desarrollo.

La etapa de germinación se presenta cuando, en respuesta al establecimiento de ciertos valores en las variables fisicoquímicas, el estadio de latencia se rompe irreversiblemente. En ese momento empieza una gran actividad metabólica, la cual se manifiesta, de manera visible, con el hinchamiento de la espora, para luego proseguir con la aparición gradual (a través de lo que se denomina poro germinativo) de el túbulo germinativo.

La hifa se elonga, de manera axial, gracias a una estructura (visible con microscopio) denominada *spitzenkörper* (cuerpo apical) que se encuentra cerca del ápice del tubo germinativo, y que es un conglomerado de entidades denominadas vesículas (cúmulos de quitin-sintetasa y moléculas precursoras de pared) que son distribuidas hacia la punta, para la creación de nueva pared (Grove y Bracker, 1970; Gooday, 1971; Bartnicki-García y col., 1990).

El proceso de germinación es complejo, ya que se requiere de 2 o más señales acopladas para que se rompa el período de latencia y comience la actividad que dará lugar al túbulo germinativo (Weber y Hess, 1976). Entre las principales señales que provocan que se establezca la germinación se tienen las siguientes:

1.-Actividad de agua: Una baja concentración de agua disponible retrasa la germinación, dado que ésta es indispensable para que se lleven a cabo las reacciones metabólicas (Oriol, 1987).

2.-Nutrientes: Dada la limitación de las reservas internas de sustratos, la presencia de fuentes utilizables de carbono y nitrógeno aceleran el establecimiento del proceso (Barrios y Anaya, 1987).

3.-Temperatura: Existe un rango óptimo para el proceso, el cual va a depender de la cepa. Esta temperatura no siempre es la misma que la óptima de crecimiento, siendo generalmente un poco mas alta la requerida para la germinación.

4.-Tamaño de inóculo: Dada la existencia de sustancias inhibidoras en la pared de las conidiosporas de *A.niger*, una alta densidad de inóculo (generalmente mayor a $1 \cdot 10^7$) provoca el retraso de la germinación en medio líquido. Esta inhibición puede ser evitada utilizando como fuente de carbono a la glucosa y lavando las esporas (Barrios y col., 1989). En medio sólido no suele observarse este tipo de inhibición.

5.- Oxígeno: Se requiere cierta cantidad de oxígeno disuelto para que se presente la germinación, dado que los hongos filamentosos son microorganismos aerobios.

Así se tiene que deben de presentarse las condiciones óptimas de estas señales para que se rompa la latencia, asegurándose con esto que la mayoría de las esporas alcanzarán a germinar exitosamente.

El crecimiento vegetativo está dado por el elongamiento, ramificación e interacción de las hifas. La hifa no tiene una composición homogénea en toda su estructura, sino que está dividida en 3 zonas principales:

- 1.- *Apical*.- Carece de organelos, encontrándose ahí las vesículas aglomeradas en el *spitzenkörper*, que es la estructura que se encarga de distribuir las hacia la punta.
- 2.- *Subapical*.- Ahí están todos los organelos conocidos, incluyendo al núcleo. En esta zona son sintetizadas las vesículas en el retículo endoplásmico y enviadas al *spitzenkörper*.
- 3.- *De vacuolación*.- En esta zona se encuentran las vacuolas, que van siendo más grandes a medida que se alejan de la punta hifal; también aquí se encuentran las reservas de lípidos. Esta es la zona más vieja de la hifa.

Gracias al elongamiento apical de la hifa se genera un micelio indiferenciado que, con una tasa lineal de crecimiento radial, se orienta hacia la colonización del medio sólido libre (Trinci, 1974). Para explicar este crecimiento direccionado se han propuesto diferentes teorías, entre las cuales destacan:

- El establecimiento de un gradiente de Ca^{2+} a lo largo de las hifas que provoca un crecimiento polarizado (Harold y Harold, 1980).
- La existencia de una corriente bioeléctrica que actúa creando un gradiente electro-osmótico que provoca flujos máscicos y movimiento electroforético de las vesículas (Gooday, 1983).

La conidiogénesis es la respuesta del micelio a diversos factores ambientales, principalmente nutricionales, ya que, mientras se encuentra dentro de un régimen balanceado (esto es Entrada de nutrientes = Biosíntesis), el micelio continúa indiferenciado; pero, al presentarse la limitación de algún

nutriente (principalmente nitrógeno), el crecimiento se desbalancea, desencadenándose respuestas a nivel genético, que resultan en el establecimiento de nuevos patrones metabólicos que provocan la diferenciación de ciertas hifas, las cuales se orientan perpendiculares al plano del micelio y producen, en su ápice, estructuras reproductoras asexuales llamadas conidióforos, en los cuales, por mitosis, se crean las conidiosporas que, una vez maduras, se van a desprender al presentarse algún tipo de esfuerzo mecánico.

De estas 4 etapas las mas estudiadas son las de Crecimiento Vegetativo y Conidiogénesis, debido a que :

-En estas etapas se da la producción de metabolitos de relevancia industrial.

-El crecimiento y consumo de sustratos, principalmente durante el crecimiento vegetativo, son considerables, por lo que el seguimiento del proceso es relativamente sencillo.

La etapa de latencia, al ser un período de inactividad, ha sido estudiada en cuanto a la morfología y composición química de la espora, debiéndose realizar para ésto análisis destructivos.

1.1 Antecedentes sobre la germinación de mohos.

Dentro de la cinética de fermentación, la germinación es la fase de retardo, indicando con esto que no se dan cambios en las concentraciones de sustratos, además de casi no presentarse generación de nueva biomasa, por lo que el seguimiento bioquímico de esta etapa es mas bien complicado y laborioso. Aún con esto es de suma importancia el conocer a fondo esta etapa, ya que es en este momento cuando va a quedar determinado el máximo número de colonias que se van a poder obtener con un inóculo dado, esto es, la biomasa máxima posible.

Sheperd (1957) presentó resultados del análisis bioquímico de esporas de *Aspergillus nidulans* durante la germinación, destacando el concerniente a cómo se modificaba el balance de nitrógeno en esta etapa, ya que el nitrógeno soluble pasaba del 7 al 22 %, y el nitrógeno protéico aumentaba del 26 al 36 %, mientras que el de pared variaba del 21 al 10 %.

En 1958 Yanagita realizó experimentos en medio líquido agitado para conocer el efecto de la composición del medio sobre el porcentaje de germinación en *A. niger*, encontrando que el medio mínimo que permitía el 100 % de germinación estaba compuesto por glucosa (20 g/L), L-alanina ó L-prolina y amortiguador de fosfatos a pH de 6; sin embargo este medio no permitió el desarrollo vegetativo. También estudió el efecto de la temperatura y la presencia de CO₂, estableciendo que este último era indispensable para el proceso. De hecho, este trabajo es uno de los mas completos encontrados, ya que hace el seguimiento del consumo de glucosa, de fosfato y de oxígeno, así como la aparición de proteína, ácidos nucleicos y porcentaje de esporas germinadas.

Ohmori y Gottlieb (1963) demostraron que todas las enzimas de las vías metabólicas EMP, HMP y CAT estaban presentes en las esporas de *Penicillium oxalicum*, así como un sistema de transporte terminal de electrones. El uso de sustancias que interrumpen estas vías (fluoruros, malonatos y cianuros) solamente tuvieron efecto hasta después de seis horas de iniciado el proceso, esto es, hasta que era visible el túbulo germinativo. Estos resultados indican que estas vías empiezan a ser utilizadas de manera considerable hasta que ha surgido el túbulo. También puede estar indicando que la permeabilidad de la espora es diferente a la del micelio vegetativo, lo cual es lógico considerando que la espora es una estructura de resistencia.

Continuando con la misma línea de investigación, Ohmori y Gottlieb (1965) siguieron la germinación de esporas de *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Penicillium atrovenetum* y *Penicillium*

oxalicum, encontrando que, en general, la tendencia era la de una gran actividad enzimática y poca síntesis de proteína estructural, esto es, se daba el aprovisionamiento preferencial de enzimas, lo cual corresponde efectivamente a el fenómeno que se observa durante la fase de retardo del crecimiento microbiano.

Barnes y Parker (1966) utilizaron esporas de *Trichoderma spp* y un contador Coulter para estudiar el efecto de un agente químico (clorocresol) durante la fase de hinchamiento, concluyendo que durante la primera hora el transporte de agua al interior de la espora ocurre libremente, sin ningún papel metabólico aparente. En esta etapa el clorocresol entraba a las esporas, resultando un bajo porcentaje de germinación posterior. Si lo aplicaban a las 3 horas, ya no era transportado al interior, esto es, el transporte de agua pasaba a ser controlado metabólicamente, y la mayoría de las esporas germinaban, lo cual estaba indicando que el inhibidor no había penetrado en la espora. La comparación de estos resultados con los de Ohmori y Gottlieb (1963) parecen indicar que la pared de la espora, si bien es una estructura de resistencia, permite el paso de una mayor cantidad de sustancias que la pared del micelio vegetativo, lo cual pudiera tener la función de un mayor rango de detección de la composición del entorno, al mismo tiempo que, por su baja actividad metabólica, la espora puede tener la posibilidad de ser poco afectada por las sustancias que entran en ella.

Hollomon (1970) estableció que la síntesis de ARN y proteínas debía presentarse antes que la aparición del túbulo germinativo de *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, lo cual concuerda con los resultados de Yanagita (1957), Sheperd (1957) y los de Ohmori y Gottlieb (1965) para otras especies de hongos filamentosos.

Campbell (1971) hizo notar que, durante la germinación de *Aspergillus fumigatus*, la membrana exterior se disolvía, y el túbulo germinativo aparecía como una extensión de la membrana interna. También establece que se presentan los eventos de incremento en el número de mitocondrias y la formación de vacuolas

a partir del retículo endoplasmático, así como la división del núcleo. Sus resultados mostraron que el hinchamiento de las esporas depende directamente de la concentración de la fuente de carbono, encontrando que la germinación en agua destilada no produce hinchamiento. La fuente de nitrógeno externa no tuvo influencia sobre la germinación en un amplio rango de concentración.

Florange y col. (1972) compararon la estructura de conidiosporas de *A. nidulans* en latencia y germinadas, y detectaron que en la espora sin germinar existían 3 paredes pero, al hidratarse (30 minutos) se visualizaban otras 2, emergiendo el túbulo de la capa mas interna. Esto es, si bien parece no haber grandes cambios metabólicos durante la germinación, sí se presentan cambios estructurales importantes en la espora, lo cual viene a ser parte de los procesos de adaptación que se presentan en la fase de retardo.

Bates y Wilson (1974) utilizaron etilenglicol para alterar la germinación de esporas de *Neurospora crassa*, encontrando que se presentaba el crecimiento y síntesis de biomasa, pero no aparecía el túbulo germinativo, esto es, crecían en forma esférica. El índice de refracción de toda la pared era el mismo, lo cual era una alteración, dado que los índices de refracción de la punta y del túbulo son diferentes cuando se tiene el crecimiento filamentoso normal. Propusieron que el efecto podía deberse a que el etilenglicol, por alterar la presión osmótica del medio, interrumpía alguna reacción o gradiente necesarios para el emergimiento del túbulo, pero no afectaba el resto de las rutas del crecimiento.

Brambl (1975) utilizó esporas de *Botryodiplodia theobromae* para estudiar las funciones respiratorias durante la germinación, encontrando que las esporas contenían un sistema respiratorio aeróbico potencial, el cual entraba en acción al colocar las esporas en el medio, poco después de que empezaba a funcionar el sistema ribosomal. Sin embargo, no era necesario que el genoma

mitocondrial fuese funcional durante esta etapa, ya que el uso de drogas que inhiben los sistemas transcripcionales y/o translacionales de la información genética no tuvieron efecto sobre la tasa de germinación en la etapa inicial, la cual duraba aproximadamente 120 minutos. Estos resultados fueron confirmados posteriormente (Brambl y Handschin, 1976).

Roussos (1987) estableció que la cinética de germinación de *Trichoderma harzianum* dependía del tipo de enlace glucosídico de la fuente de carbono, observando un retraso con las uniones β -1,4, efecto que se acentuaba si utilizaba polisacáridos (carboximetil celulosa y celulosa cristalina). Esto confirma que las enzimas degradativas de polisacáridos son sintetizadas antes de la aparición del túbulo germinativo.

Oriol, Contreras y Raimbault (1987) analizaron el uso de la técnica de microcalorimetría para el seguimiento de la germinación y crecimiento vegetativo de *A.niger* en un medio soportado, encontrando que eran capaces de detectar actividad (producción de calor) incluso a una hora de haber inoculado el sistema. Encontraron que, a las concentraciones mas altas de glucosa (82,127 y 216 g/L), se observaban 2 picos de producción de calor, siendo el primero mas pequeño ,y el cual se presentaba en el tiempo que corresponde al fin de la etapa de germinación y comienzo del crecimiento vegetativo; entre mayor era la concentración de glucosa, mas grande era este primer pico, cuya área correlacionaban con la Actividad de agua (A_w) inicial del medio (la cual está dada por la concentración de glucosa) y encontraban que la relación era lineal. Con cantidades crecientes de inóculo, a una concentración de glucosa fija (89 g/L), se observaba el mismo comportamiento que al variar la glucosa, además de que se aceleraba el proceso de crecimiento. Concluyeron que el calor que se desprende al final de la etapa de germinación (y el cual no tiene relación con la tasa de respiración ni con la producción de biomasa según algunos experimentos que ellos realizaron) era dependiente de la A_w inicial

y del tamaño de inóculo, lo cual puede ser el resultado de los siguientes fenómenos:

-Reacomodo del sistema de transporte por permeasas al final de la etapa de germinación.

-Acumulación de polioles dentro de la conidiospora y expulsión de agua para adaptarse a la presión osmótica del medio.

Barrios y Anaya (1987) estudiaron el efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la cinética de germinación de *A. niger* en medio líquido agitado, encontrando que utilizar glucosa y peptona evitaba el retraso del proceso, fenómeno el cual se presentaba especialmente al utilizar un inóculo "viejo" (2 semanas), ó si la composición del medio era a base de almidón y urea. Este retraso bien pudo deberse a que, como lo señala Roussos (1987), los compuestos poliméricos tardan mas en ser utilizados, por lo mismo que deben ser sintetizadas enzimas degradadoras *de novo*.

1.2 Utilización de la fuente de carbono.

Como puede notarse, la germinación depende fuertemente de la composición del medio, lo cual es comprensible dado que, tal como mencionan Harder y Dijkhuizen (1983), los microorganismos poseen poco control sobre su medio, dependiendo así su composición de la de éste, y el cual no es raro encontrar que carezca de uno o varios sustratos esenciales, constituyendo esto una presión natural para la selección de organismos bien adaptados. Esta adaptación está encaminada a maximizar la tasa de transporte y utilización del sustrato limitante, para lo cual pueden darse 3 mecanismos:

a) Creación de un sistema de alta afinidad por el sustrato, o incremento en la concentración del sistema ya existente.

b) Incremento de la tasa de metabolización inicial del sustrato acumulado en el interior mediante una mayor síntesis de las enzimas involucradas en su catabolismo.

c) Reacomodo de la composición química celular debido a un redireccionamiento de los fluxes de metabolitos que contienen al sustrato limitante.

Tenemos que, en condiciones de limitación de carbono, los heterótrofos (a los cuales pertenece el *A.niger*) muestran una alta eficiencia de utilización de la fuente de carbono y una minimización de los productos extracelulares carbonados, lo cual se logra mediante la desrepresión de enzimas catabólicas, y manteniendo el anabolismo acoplado con los fenómenos de crecimiento; además de que cuentan con acarreadores en la membrana de gran afinidad por el compuesto carbonado, esto es, poseen mecanismos como los descritos por los incisos a y b. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que, cuando se trata de células aerobias el medir el rendimiento es complicado, ya que el sustrato carbonado va a tener 3 funciones (Tempest y Neijssel, 1984):

- Fuente de intermediarios.
- Fuente de equivalentes reductores.
- Fuente de energía utilizable (ATP).

Se tiene, además, que si este sustrato se encuentra en cantidad limitada pueden presentarse 2 fenómenos, dependiendo de su nivel de reducción y el estado redox de los otros nutrientes (tal y como el nitrógeno, el cual puede estar como amonio o como nitrato):

-Limitación en carbono: La cantidad de C limita el crecimiento, y se tiene un exceso en la generación de energía, dadas las bajas demandas biosintéticas. El rendimiento del sustrato es máximo.

-Limitación energética: Existe carencia de equivalentes reductores, por lo cual gran parte del sustrato se va como CO₂, provocando que el rendimiento sea bajo.

Se puede concluir que la etapa de germinación presenta diferencias en su fisiología comparada con el crecimiento vegetativo, dado que es una etapa de reconocimiento y adaptación al medio. Dado que la germinación es el período de retardo en la cinética de crecimiento de los hongos filamentosos, realmente no existen muchos trabajos en los que se aborde la cinética de este proceso, encontrándose en mayor cantidad estudios muy puntuales sobre estructura fina de la espora antes y después de haber germinado (Campbell, (1971); Crook y Johnston, (1962); Johnston, (1965); Florance y col., (1972)) y estudios de composición interna muy puntual, como es el caso de los ribosomas y mitocondrias (Brambl y Van Etten, (1970); Brambl, (1975); Brambl y Handschin, (1976); Grove y Bracker, (1970) y Hollomon (1970)).

De los trabajos que existen sobre la cinética de germinación se encuentran el de Yanagita (1957) que es uno de los mas completos dado los aspectos de consumo de sustratos y síntesis de proteína y polinucleótidos, sin embargo, este trabajo es descriptivo y no utiliza la gran cantidad de datos que tiene para abordar aspectos mas generales de energética del proceso. Otro trabajo es el de Barrios González y Anaya (1987) y Barrios y col. (1989) en los que se estudia el cambio en el porcentaje de germinación. Estos trabajos contemplan el variar los niveles y tipos de fuente de carbono y nitrógeno, así como la concentración de inóculo inicial para establecer su efecto sobre el porcentaje de esporas germinadas; dado que ésta es la única variable que miden, su trabajo no aporta mucho al conocimiento de la fisiología de la germinación, estableciendo únicamente algunos niveles nutricionales necesarios y confirmando que el efecto de apiñamiento se debe a una sustancia hidrofílica presente en la pared de la espora.

Dado que se conocen algunos aspectos fundamentales de la bioquímica de la germinación es necesario conocer la influencia del medio sobre la cinética de germinación y cómo es que se ve afectada su morfología, dado que sobre este particular no se tiene un estudio que aporte indicios a este respecto. Esta información puede

ser de gran utilidad dado que los parámetros dimensionales aportan indicios de la eficiencia y velocidad de crecimiento de los mohos, así como su capacidad de adaptación al medio.

OBJETIVOS GENERALES:

- Describir algunos aspectos de la bioquímica y morfometría de la germinación de conidiosporas de *Aspergillus niger* CH4 en medio líquido.
- Poner en marcha la técnica de procesamiento de imágenes para realizar el seguimiento de la germinación.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Establecer la concentración de glucosa mínima que induce la germinación.
- Determinar cómo se ve afectada la cinética de germinación con la concentración inicial de sustrato.
- Desarrollo de un método microscópico para la medición de la cinética de germinación de *Aspergillus niger*.
- Encontrar los parámetros biológicos y energéticos, expresados por la tasa específica de crecimiento y los factores de rendimiento, para con ellos establecer el grado de acoplamiento energético del proceso de germinación.
- Estudiar, de forma preliminar, el efecto de un agente químico desacoplante de la fosforilación oxidativa (2,4-Dinitrofenol) sobre el proceso global de la germinación.

CAPITULO 2

METODOS EXPERIMENTALES

2.1 Cepa.

Se utilizó *Aspergillus niger* CH4, la cual es una cepa proporcionada por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y es utilizada en la detoxificación de pulpa de café y la producción de enzimas pectinolíticas por el grupo de Fermentación Sólida de la UAM-I.

Este moho presenta un rápido crecimiento filamentosos compacto de color blanco, el cual es sustituido por una apariencia casi negra al presentarse la esporulación, la cual se completa en, aproximadamente, 3 días. Las esporas de este hongo son cuasi esféricas, color café oscuro o negras, presentando una superficie rugosa, con estructuras cónicas que le dan una apariencia de piña. Su diámetro es de aproximadamente 4.5 micrómetros.

La cepa era propagada sobre la superficie de Agar Papa-Dextrosa, colocado en matraz Erlenmeyer, y se incubaba por 3 días, tiempo en el cual la superficie se cubre con una capa uniforme de esporas oscuras. De ahí se obtienen las esporas para los experimentos y para volver a sembrar. La recolección se lograba agregando agua estéril con Tween 80 y homogenizando con un agitador magnético, para desprender las esporas y obtenerlas en suspensión, la cual era utilizada de inmediato, desechándose el sobrante.

2.2 Medio de germinación.

El medio utilizado se compone de lo siguiente :

Glucosa.....	10.0	g
Sulfato de amonio.....	.0.98	g
Urea.....	.0.24	g
Fosfato de potasio monobásico...	0.50	g
Sulfato de magnesio.....	.0.60	g
Extracto de levadura.....	.0.10	g
Solución de oligoelementos.....	1.0	ml
Agua destilada.....	1.0	l

Solución de oligoelementos:

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	5.0 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	1.6 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	1.4 g
CaCl ₂	2.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Basándose en él se realizaron diluciones sucesivas, en factores de 10, de la mezcla de las fuentes de carbono y nitrógeno (Glucosa y Sulfato de amonio + Urea, respectivamente), utilizándose como diluyente el resto del medio preparado a la concentración original, para obtener de esta manera concentraciones decrecientes de glucosa, pero manteniendo una relación C/N constante. Se utilizaron las siguientes concentraciones de glucosa: 10, 1, 0.1 y 0.01 g/L.

Para las experiencias con 2,4-dinitrofenol (DNP) se preparó el medio de 1 g/L de glucosa en la solución de DNP de la concentración a probar, las cuales fueron: $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ y $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Después de probar el efecto de la concentración de las esporas en el porcentaje de germinación se decidió utilizar, para todos los experimentos, un inóculo de $1 \cdot 10^6$ esporas/ml, ya que a esta concentración se reducían los agregados de esporas, facilitándose el conteo de las mismas, al tiempo que se evitaba la inhibición por apiñamiento.

2.3 Equipo experimental.

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml, a los cuales se les hicieron 3 indentaciones que funcionaban como mamparas, cuya finalidad era la de permitir un mejor mezclado y rompimiento de los agregados de esporas, además de permitir una aereación mas eficiente del medio, del cual se agregaban 100 ml.

Los matraces se colocaban en un agitador orbital, el cual se encontraba dentro de una incubadora. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 35°C y con una agitación de 150 RPM.

2.4 Análisis realizados.

Para hacer un seguimiento cuantitativo de la germinación se tuvo que elegir que variables medir, según el tipo de información que se deseaba obtener, llegando a la conclusión que las siguientes eran las mas adecuadas: Porcentaje de germinación, Consumo de glucosa, Síntesis de proteína, Respiración, pH y Cambios en la morfología.

2.4.1 Porcentaje de germinación

Se realizó por conteo microscópico directo, utilizando la cámara de Neubauer, en el objetivo 10X. Para conocer el porcentaje se contaba el total de esporas que aparecían en el campo, y se hacía la distinción en el número de esporas que presentaban túbulo germinativo de un largo igual o mayor al diámetro de la espora, lo cual se dividía entre el número total contado, y se multiplicaba por 100.

2.4.2 Consumo de glucosa.

Se utilizó la técnica del TPTZ (2,4,6-Tripiridil-s-triazina) reportada por Avigad (1968) la cual sirve para cuantificar azúcares reductores en el rango de concentración de 2-100 nmoles/ml. Las muestras eran previamente filtradas en membranas Millipore de 0.45 μm , y al filtrado se le realizaba la dilución necesaria para que pudiera leerse en la curva patrón. La técnica y los reactivos se describen en el apéndice A.

2.4.3 Síntesis de proteína.

El método utilizado fue el de Lowry (1951) de doble concentración, para detectar de 0.01 a 0.1 g/L de proteína. Se realizó el pretratamiento de la muestra agregando una solución de NaOH 0.2 N, y ebuliendo durante 10 minutos. La técnica y materiales utilizados se describen en el apéndice A.

2.4.4 Respiración.

La tasa de consumo de oxígeno se midió utilizando un electrodo tipo Clark, en una pequeña cámara con chaqueta para controlar la temperatura del experimento. La lectura de la cantidad de oxígeno disuelto se capturó en un graficador, y en base a las pendientes obtenidas y la velocidad de corrimiento del papel se calculó la tasa de consumo de oxígeno.

2.4.5 pH.

Se siguió el cambio de pH a lo largo del proceso con un potenciómetro marca Corning (pHmeter 125) tomando pequeñas muestras del líquido en cada tiempo.

2.4.6 Cambios en la morfología.

Para conocer el cambio en el largo de el túbulo germinativo y en los diámetros de espora e hifa, se utilizó la técnica de procesamiento de imágenes, mediante el uso de el programa denominado IMAGENIA 2000 de Biocom, el cual fue cargado en una computadora personal 386 HP de 20 MHz y disco duro de 80 Mb. Una descripción mas detallada de la técnica utilizada se encuentra en el apéndice A.

Todos los experimentos se realizaron por los menos 2 veces, y cada concentración se ensayó por triplicado, tomando 30 mediciones por concentración, y haciendo el análisis estadístico de los datos obtenidos.

CAPITULO 3

METODOS TEORICOS:

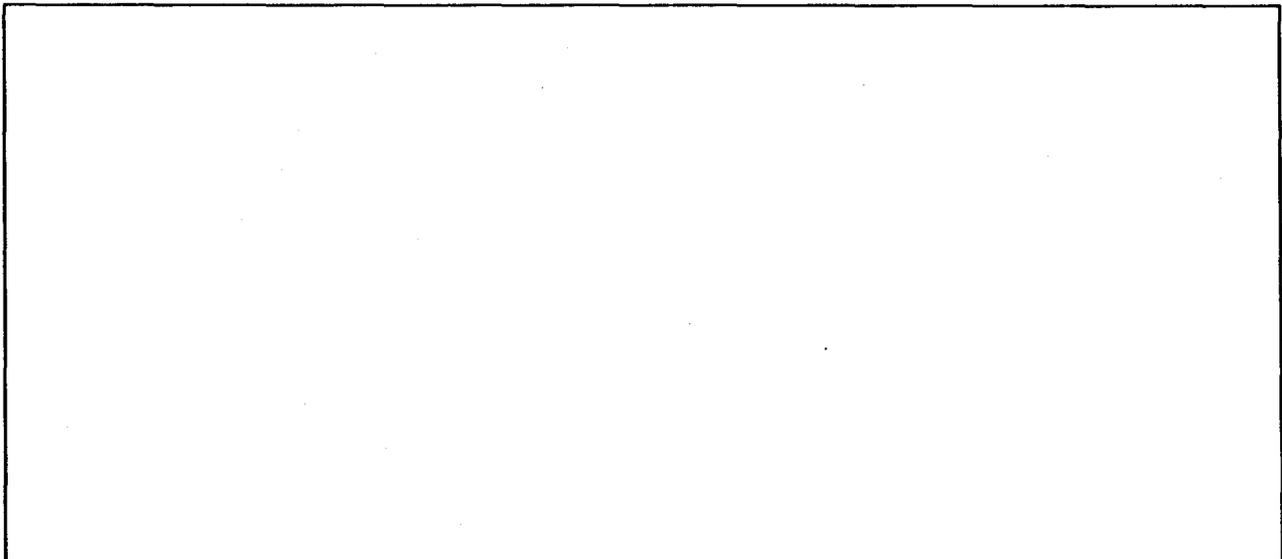
**MODELOS MATEMATICOS
Y
CALCULO DE PARAMETROS**

3.1. Revisión de modelos matemáticos del crecimiento de hongos filamentosos.

Dado que los hongos filamentosos son utilizados a nivel industrial, se requiere conocer a fondo su metabolismo y la forma de controlarlo, y es por ello que se han planteado una variedad de modelos matemáticos que describen, principalmente, el cambio de la biomasa en el tiempo, tanto en medio líquido como en sólido.

Se encuentran publicados varios trabajos, en los que abordan el crecimiento individual de la hifa, tomando todos ellos como evento principal el que ésta crece según el siguiente esquema (Grove y Bracker, 1970):

El material necesario para la creación de nueva pared (polisacáridos y enzimas líticas) se acumulan en estructuras denominadas "vesículas", las cuales son creadas en el retículo endoplásmico y transportadas a lo largo de la hifa gracias a el gradiente de potencial que existe normalmente en la hifa en crecimiento; estas vesículas son acumuladas en una estructura denominada *spitzenkörper* (visible al microscopio), de donde son distribuidas hacia la punta, incorporándose a la pared, y provocando con esto la elongación axial de la hifa. A continuación se explica esquemáticamente el proceso:



Uno de los primeros trabajos de descripción matemática del crecimiento de los hongos filamentosos es el de Trinci (1971), en el cual define que la *tasa radial de crecimiento* (K_r) para una colonia fúngica creciendo sobre una superficie sólida puede expresarse en términos del *parámetro longitud de la zona de crecimiento* (w), la cual es característica de cada especie y depende de la longitud de las hifas distales, que son las primeras que tienen contacto con la zona no colonizada; y de la *tasa específica de crecimiento* (α) alcanzada por éstas hifas, la cual tiene un valor igual al medido en cultivo sumergido. Esta es la primera descripción basada en parámetros microscópicos capaz de explicar la respuesta del micelio a la composición del medio, ya que observó que la zona periférica de crecimiento varía de tamaño según la concentración de fuente de carbono suministrada, esto es, α viene a ser un análogo de la tasa específica de crecimiento tradicional (μ), pero que puede obtenerse a partir de mediciones físicas como lo son la velocidad de crecimiento radial y la longitud de las hifas distales.

En una publicación posterior, Steele y Trinci (1975) propusieron que μ es proporcional al cociente entre K_r y la longitud de la unidad de crecimiento de las hifas, G (ó HGU), tomada ésta como la proporción entre la longitud total de las hifas y el número de puntas del micelio. Es decir:

$$\mu = K_r/G$$

También se han hecho aproximaciones a la morfología que presenta el ápice de la hifa, la cual, por su forma puede ser descrita por un semielipsoide de revolución (Trinci y Saunders, 1977), siendo descrita la tasa específica de expansión de la pared por la cotangente del ángulo de posición, referido a la posición horizontal de elongamiento de la hifa. Mas adelante introducen como variable la rigidez de la pared como factor determinante de la curvatura que adquiere la hifa, derivando una expresión para calcular esta rigidez, la cual es difícil de obtener

experimentalmente (Trinci y Saunders, 1979)

Prosser & Trinci (1979) proponen un modelo que describe la elongación, septación y ramificación de las hifas en su fase exponencial de crecimiento, mediante la descripción de eventos intracelulares de la teoría vesicular para la creación de nueva pared; ésto lo toman en cuenta proponiendo que, cuando se acumula cierta cantidad de vesículas, surge un compartimento (el cual no tiene análogo en la realidad) y mediante él se describen los procesos de germinación, septación controlada por el tiempo de duplicación y ramificación. No toman en cuenta la composición del medio.

Dentro de este mismo esquema vesicular es planteado, algunos años mas tarde, un modelo de simulación morfológica (Bartnicki-García, 1989), el cual es capaz de mostrar en pantalla la germinación y elongación de una espora. Esto se logra utilizando la cotagente de la coordenada en x por la relación de la velocidad de desplazamiento del *spitzenkörper* entre el número de vesículas lanzadas, razón que arroja un número, el cual es la distancia entre el *spitzenkörper* y el ápice de la hifa. Utilizan microfotografías para calcular experimentalmente esta distancia, y a esta función trascendental que derivan la denominan hiploide, diferenciándola así de lo propuesto por Trinci y Saunders (1977).

Un modelo mas reciente que describe el crecimiento de una hifa es el de Aynsley, Ward y Wright (1990). Proponen que la hifa se puede aproximar como un reactor tubular que se autoelonga en uno de sus extremos, gracias a que existe un transporte de nutrientes a través de toda su superficie, los cuales son transformados en precursores en su interior y transportados hacia el ápice, donde mediante una reacción (Michaelis-Menten) son transformados en biomasa. Promediando para el volumen describen el crecimiento en el reactor. Utilizan el procesamiento de imágenes para obtener los parámetros de longitud que requiere su modelo, siendo ésta una descripción mejorada de lo propuesto por Prosser y Trinci (1979).

Existen también autores que tratan de describir el crecimiento de la colonia en medio sólido. Uno de los modelos propuestos es el descrito por Edelstein (1982) en el cual plantea una propiedad promedio, la distribución de densidad de hifas, como su variable principal. Utiliza términos para tomar en cuenta la interacción entre las puntas, muerte y la creación de nuevas puntas. Este modelo puede describir la densidad de biomasa indiferenciada en toda la colonia en el medio de agar, pero no toma en cuenta la influencia de la composición del medio en el crecimiento.

Otro modelo que describe el crecimiento de una colonia en medio sólido es el propuesto por Georgiou & Shuler (1986) en el cual toman en cuenta la composición del medio al plantear balances de materia tanto de nutrientes como de biomasa, además de tomar en cuenta variables tales como muerte, rendimiento del sustrato, coeficiente de mantenimiento y diferenciación, utilizando cinéticas de saturación para las reacciones de consumo. Sin embargo tal y como lo mencionan los autores su modelo es difícil de modificar por lo complicado de medir ciertas variables que proponen tales como la cantidad de biomasa diferenciada (conidióforos, esporas y masa vegetativa) y los gradientes espaciales de los sustratos en la placa de agar. Su modelo permite explicar la diferenciación celular en términos de que se presentan limitaciones de transferencia de sustrato en el entorno de la hifa.

Mitchell y col. (1991) se basan en el modelo de Georgiou y Shuler (1986), modificándolo en cuanto a que simplifican la biomasa, pero introducen términos para tomar en cuenta la excreción de enzima, su difusión y acción dentro de la matriz sólida, la difusión del producto hacia la biomasa, y la transformación de este sustrato en nueva biomasa. Este modelo no toma en cuenta la fase de retardo, es decir la germinación, y empiezan sus simulaciones a las 20 horas de arrancado el proceso, ya que hasta este tiempo es posible detectar actividad enzimática extracelular.

3.2. Procesamiento de Imágenes para el seguimiento del crecimiento de los micelios.

En los últimos años se ha planteado el uso de una nueva herramienta, el Procesamiento de Imágenes y la automatización de la adquisición de datos para la descripción y modelamiento del crecimiento de micelios en cultivo sumergido, principalmente, ya que los datos obtenidos reflejan fielmente los cambios que están ocurriendo en el medio, completándose la información química con la morfológica. Dentro de los trabajos de descripción y puesta a punto de técnicas de análisis se tienen los siguientes:

Packer y Thomas (1990) comparan, dentro del procesamiento de imágenes, el uso de un sistema de adquisición automática de datos contra la técnica manual, encontrando que la primera es más rápida, pero tiene un error mayor. Esto sugiere que es necesario trabajar en los algoritmos de adquisición si se desea que esta técnica pueda ser utilizada en el control en línea de las fermentaciones.

Una de las características de la fermentación sumergida que se ve más afectada por la morfología de los micelios es la reología, por lo que el seguimiento de la forma de crecimiento del micelio en el transcurso de la fermentación sería de gran ayuda para predecir y tratar de controlar la viscosidad. En este sentido el trabajo de Wiebe y Trinci (1991) pone a consideración el que la tasa de dilución, relacionada directamente con la concentración de nutrientes en el medio, provoca, de manera completamente medible con el procesador de imágenes, un cambio en la HGU (unidad de crecimiento de la hifa) la cual es la longitud promedio de la hifa asociada a cada punta dentro del micelio, y la cual va a estar determinando el grado de ramificación. Encuentran que al aumentar la tasa de dilución aumenta el diámetro y la HGU, pero el largo principal permanece constante. Las variaciones en la morfología pueden ser obtenidas en poco tiempo, pudiéndose hacer predicciones para controlar la viscosidad de la fermentación.

Otra aplicación práctica al procesamiento de imágenes de micelios es el propuesto por Packer y col.(1992), los cuales miden el área total del micelio, el área de la región citoplasmática y el diámetro promedio de hifa, para con esto calcular el volumen celular y la biomasa. Con este método es posible calcular confiablemente concentraciones de micelio (biomasa) en el rango de 0.03 a 38 g/L, aún en presencia de sólidos en concentraciones arriba de 30 g/L. Esto tienen una enorme ventaja sobre los métodos tradicionales de medición colorimétrica de biomasa, que generalmente requieren de la transparencia de la muestra.

En cuanto al modelamiento del crecimiento y la morfología de microorganismos filamentosos, el trabajo más recientemente publicado, en medio sumergido, es el de Yang, Reichl y Gilles (1992), el cual es un modelo probabilístico que describe el direccionamiento espacial de la hifa y sus ramificaciones, llegando a describir la morfología a tiempos que ya no es posible seguirla microscópicamente, cuando han formado un "pellet" (aglomerado de micelio de forma esférica). Su modelo fue construido a partir de los datos obtenidos con un procesador de imágenes, con los cuales pudieron basarse en el hecho de que los ángulos de crecimiento de las puntas y de las ramas están normalmente distribuidos. Cabe notar que el volumen de experimentación utilizado es de apenas 2 mililitros, lo cual es otra de las ventajas del sistema que utilizaron. Sin embargo, no toman en cuenta la composición del medio de cultivo.

Recientemente, Viniegra-González et al. (1991, 1992) han propuesto un modelo que relaciona los aspectos microscópicos con los macroscópicos de la siguiente manera. Se considera que la velocidad específica de crecimiento está dada por la relación siguiente

$$\mu_r = \frac{\mu_{\max} (X + X_c)}{2X} \left[1 - \left(\frac{X}{X_m} \right)^N \right]$$

En donde μ_{\max} es $2 \ln 2 (V_r / L_e)$, V_r es la velocidad de extensión

radial (K_r de Trinci), L_0 es la longitud promedio de las hifas de todo el micelio, X_c , cantidad de biomasa cuando las primeras hifas están a punto de dividirse, X_m es la cantidad máxima de biomasa y N es el exponente de la función inhibitoria del crecimiento. Este modelo permite ajustar las curvas de crecimiento de los micelios con mejor precisión y flexibilidad que el modelo logístico usual, y permite evaluar los parámetros macroscópicos en función de otros de tipo microscópico, como el número de esporas germinadas N_0 , el diámetro de las hifas D y los valores de V_r y L_0 antes definidos. Por ejemplo: $X_c = N_0(\pi/4)D^2L_0 \rho$.

Este tipo de modelos permite correlacionar los datos obtenidos por medio del procesamiento de imágenes, para estimar directamente D , V_r y L_0 y, en consecuencia, calcular μ_{max} y X_c , dejando solamente X_m y N como parámetros libres para ajustar las curvas de crecimiento. Si a su vez, el valor de X_m se pudiera medir por algún método óptico o químico, quedaría solo por estimarse el valor de N , en función de las curvas de respiración, como ha sido propuesto por Oriol y col., (1988) o por Saucedo Castañeda y col., (1990).

Por lo tanto, esta metodología de modelamiento permite evaluar en forma microscópica, mediante procesamiento de imágenes, los valores de los parámetros básicos del crecimiento miceliar y determinar sus relaciones con las condiciones ambientales, por ejemplo: temperatura, actividad de agua (a_w), pH, oxigenación, potencial redox, entre otros.

3.3. Definiciones básicas: Factor de rendimiento, tasa específica de crecimiento y demanda biológica de oxígeno.

El crecimiento de los microorganismos, y la utilización que realizan de los componentes del medio pueden ser expresados mediante relaciones entre el consumo de sustrato y la cantidad de biomasa generada. Existen definidos 2 parámetros básicos para la descripción del crecimiento celular: El *factor de rendimiento del sustrato* (Y), el cual indica la eficiencia de utilización de la

estructura carbonada, y la *tasa específica de crecimiento* (μ), que es la razón porcentual de crecimiento por unidad de biomasa, válido para la zona de crecimiento exponencial. Los valores que asuman estas constantes pueden ser utilizados para conocer y comparar el efecto de diferentes sustratos, así como diferentes composiciones del medio sobre el crecimiento.

Todas las expresiones que se presentan fueron establecidas para el crecimiento microbiano, las cuales consideran, de manera medular, que las reacciones que se llevan a cabo siguen una cinética tipo Michaelis-Menten y que el crecimiento se encuentra en su fase exponencial. Dado que en la germinación puede observarse una fase exponencial, se propone que estas expresiones pueden utilizarse para describir esta etapa, modificando ciertas variables para considerar el crecimiento miceliar, como lo es el cambio en la longitud del túbulo germinativo, el cual es muy sencillo monitorear con un sistema de procesamiento de imágenes.

3.3.1 Factor de rendimiento.

Los mohos pertenecen al grupo de organismos que se denominan quimioorganotróficos, lo cual significa que requieren del carbono de los compuestos orgánicos para construir su material celular, además de utilizarlos como donadores de electrones para producir energía (Pirt, 1975).

El carbono consumido se reparte entre 2 funciones principales:

1.-Constituyente estructural de la biomasa.

2.-Combustible para la respiración:

-Energía para la biosíntesis.

-Energía de mantenimiento.

Existen numerosos compuestos orgánicos que pueden ser

utilizados por los mohos, presentándose generalmente preferencias por los azúcares simples, de rápida utilización, dado que éstos no requieren de acciones enzimáticas de rompimiento previas a su consumo.

De manera general se puede conocer, cuantitativamente, el aprovechamiento que se está dando de un sustrato mediante el cálculo del factor de rendimiento de crecimiento (Y), el cual es la razón entre el incremento de biomasa (Δx) y el consumo de sustrato observado (Δs), (Pirt, 1975), siendo expresado, cuando el límite de Δs tiende a cero, por:

$$Y = - \frac{dx}{ds} \quad (3.1)$$

Si se mantienen las condiciones del medio constantes, el coeficiente de rendimiento también es constante y reproducible (Monod, 1942), pudiéndose calcular Y por:

$$x - x_0 = Y(s_0 - s) \quad (3.2)$$

Para condiciones de limitación de sustrato, cuando el cultivo alcanza su concentración de biomasa máxima posible (x_m), el sustrato tiende a cero, y el coeficiente de rendimiento puede calcularse, graficando x_m vs. s_0 , como la pendiente de la ecuación:

$$x_m - x_0 = Ys_0 \quad (3.3)$$

Cuando un mismo compuesto es utilizado tanto para proveer de carbono como de energía (crecimiento y mantenimiento) el balance de sustrato puede ser expresado de la siguiente manera:

$$\Delta S_{total} = \Delta S_{celular} + \Delta S_{energia} \quad (3.4)$$

dividiendo entre la biomasa producida:

$$\frac{\Delta S_{total}}{\Delta x} = \frac{\Delta S_{celular}}{\Delta x} + \frac{\Delta S_{energia}}{\Delta x} \quad (3.5)$$

se obtiene la expresión matemática en término de los coeficientes de rendimiento:

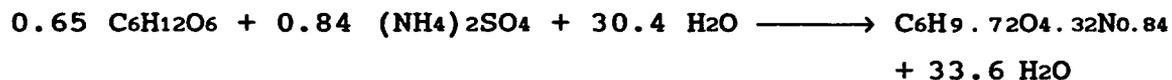
$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{cel}} + \frac{1}{Y_e} \quad (3.6)$$

A su vez se tiene que el sustrato utilizado para producir energía tiene 2 funciones principales: Crecimiento y mantenimiento, lo cual puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{1}{Y_e} = \frac{1}{Y_{crec.}} + \frac{m_e}{\mu} \quad (3.7)$$

Donde Y_e es el rendimiento total del sustrato utilizado en generar energía, $Y_{crec.}$ es la cantidad que se utilizó para generar biomasa, m_e es el sustrato gastado en el mantenimiento celular y μ es la tasa específica de crecimiento. El término de mantenimiento se refiera a la cantidad de sustrato que va a generar energía para funciones diferentes a la síntesis de biomasa, tal y como puede ser la regulación de la presión osmótica y el transporte de material celular (Pirt, 1975).

Para poder utilizar la ecuación 3.6 es necesario conocer las cantidades de sustrato que se utilizó en cada término, para lo cual se puede utilizar la ecuación empírica para *Aspergillus niger* propuesta por Raimbault (1981) para estimar la cantidad de sustrato que fue utilizado en la biomasa, y la cual es la siguiente:



Con esto y la ecuación 3.7 el valor de m_e se calcula como la pendiente de la recta que resulta de graficar $1/Y_e$ vs. $1/\mu$.

3.3.2 Tasa específica de crecimiento.

Cuando las condiciones del medio son tales que permiten el adecuado desarrollo de los microorganismos, éstos crecen de manera proporcional a la cantidad inicial de biomasa presente, de manera que el crecimiento puede ser descrito por:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (3.8)$$

Si μ es constante, la integración resulta:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (3.9)$$

Donde x es la biomasa, x_0 la biomasa inicial y μ en la tasa específica de crecimiento, la cual indica el porcentaje específico (por unidad de biomasa) de aumento de la biomasa en el tiempo (Pirt, 1975).

Con la expresión 3.9 puede ser calculado el valor de μ , el cual va a ser la pendiente de la recta resultante de graficar $\ln x$ vs. t .

Se ha observado experimentalmente que el valor de μ permanece constante para un amplio rango de concentraciones de sustrato (Pirt, 1975), pudiéndose describir su cambio mediante la expresión de Monod (1942), la cual tiene la siguiente forma:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{(K_s + S)} \quad (3.10)$$

Siendo μ_{\max} la tasa específica de crecimiento alcanzada cuando $S \gg K_s$, y K_s es la constante de saturación, la cual está inversamente relacionada con la afinidad del microorganismo por el sustrato.

3.3.3 Demanda biológica de oxígeno.

En los sistemas biológicos aeróbicos el oxígeno actúa como el

aceptor final de los electrones de las moléculas que son utilizadas como combustible. En el caso de la glucosa se conoce la reacción estequiométrica (Lehninger, 1975), la cual es:



De esta ecuación se conocen que se requieren 12 moles de oxígeno para oxidar una mol de glucosa, por lo que se puede hacer la conversión a gramos, para con esto conocer la *demanda biológica de oxígeno (DBO)*, que va a ser, de esta manera, los gramos de O_2 que se requieren para oxidar completamente un gramo de glucosa, y cuyo valor es de $1.067 \frac{mg \ O_2}{mg \ glucosa}$.

3.3.4 Descripción del consumo de sustrato y de oxígeno.

El aumento de biomasa que se observa en un cultivo se debe a la utilización y transformación de los sustratos disponibles, pudiéndose monitorear la cinética de consumo del sustrato carbonado con relativa facilidad en la mayoría de los casos; la biomasa también puede ser cuantificada, directa (peso seco) o indirectamente (proteína).

Durante la fase de crecimiento exponencial se tiene un rápido consumo del sustrato carbonado, el cual puede ser descrito por una curva de la forma de decaimiento exponencial, y que está relacionado con la biomasa, representada por la tasa específica de crecimiento (μ), y con la eficiencia de utilización del sustrato (Y), por lo cual el consumo puede ser descrito por la expresión siguiente:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu}{Y_{cel}} X + m_e X \quad (3.12)$$

Y de 3.9 tenemos que:

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (3.13)$$

La ecuación 3.12 puede ser expresada por:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu x_0}{Y_{ce1}} e^{\mu t} + m_0 x_0 e^{\mu t} \quad (3.14)$$

Integrando con la condición de que en $t = 0$, $S = S_0$, y reacomodando resulta:

$$\frac{S_t}{S_0} = 1 - x_0 \left[e^{\mu t} - 1 \right] \left[\frac{1}{Y_{ce1}} + \frac{m_0}{\mu} \right] \quad (3.15)$$

Con esta expresión pueden ajustarse las curvas obtenidas para el consumo de glucosa y se puede estimar el valor de μ , y compararlo con lo obtenido mediante la ecuación 3.9, pudiéndose establecer con esto, de manera global, el grado de acoplamiento que existe entre consumo de sustrato y síntesis de biomasa.

El consumo de oxígeno (tasa de respiración) depende del sustrato consumido y de su estequiometría de utilización, lo cual puede ser expresado, para la zona exponencial, como:

$$\frac{dO_2}{dt} = - DBO \frac{dS}{dt} \quad (3.16)$$

Utilizando la ecuación 3.14:

$$\frac{dO_2}{dt} = DBO \left[\frac{\mu}{Y_{ce1}} + m_0 \right] x_0 e^{\mu t} \quad (3.17)$$

En $t = 0$, $O_2 = O_{21}$:

$$\frac{O_{2f}}{O_{2i}} = \frac{DBO \times x_0}{O_{2i}} \left[\frac{1}{Y_{cei}} + \frac{m_e}{\mu} \right] e^{\mu t} \quad (3.18)$$

La tasa de respiración va a depender, en la fase exponencial, de la tasa específica de crecimiento y de los factores de utilización del oxígeno (DBO) y de rendimiento de la glucosa (Y_{cei}).

3.4. Elongación de la hifa.

Durante la germinación el crecimiento de la hifa, en términos del incremento axial, puede ser descrito en función de una constante por la longitud, de la siguiente manera:

$$\frac{dL}{dt} = k_L L \quad (3.19)$$

Con $L = L_0$ a $t = t_0$:

$$\ln L = \ln L_0 + k_L t \quad (3.20)$$

Por lo cual la *tasa específica de elongación* (k_L) puede ser estimada de la recta que resulta de graficar $\ln L$ vs t , siendo k_L la pendiente. Este valor va a servir para comparar el efecto del medio sobre el crecimiento, dado que una menor tasa de elongación va a significar que la síntesis de pared se vió disminuída, aunque es claro que también debe ser considerado el diámetro de la hifa para con esto conocer el cambio total de área.

C A P I T U L O 4

R E S U L T A D O S

INTRODUCCION

En este capítulo se presentan y analizan los resultados obtenidos en la germinación de *Aspergillus niger* CH4. Se muestra en primer lugar los resultados experimentales, comparándolos con lo publicado, y estableciendo qué tanto concuerdan con la teoría.

En segundo lugar se utilizan los resultados para establecer qué tanto se ajustan a las ecuaciones de consumo y producción establecidas para el crecimiento microbiano, tales como las expresiones propuestas por Monod (1942) y Pirt (1975), dado que el sistema estudiado es de esa naturaleza. Además, se obtienen los parámetros de crecimiento para facilitar el análisis del efecto de la composición del medio sobre el proceso de germinación, pudiéndose hablar, dentro de los límites metodológicos, de cambios cuantitativos en la respuesta fisiológica del micelio.

Por último, se utiliza la longitud de la hifa en vez de la biomasa, para encontrar el parámetro de tasa específica de crecimiento (elongación), dado que en este sistema es más fácil de medir la geometría del micelio que su composición, y utilizando el hecho de que ésta está relacionada con la cantidad de biomasa.

4.1 Porcentaje de germinación.

Los primeros experimentos realizados fueron los de cuantificar el porcentaje de germinación alcanzado en cada una de las concentraciones de glucosa utilizadas, esto con la finalidad de conocer la concentración inferior de glucosa que permite que el proceso de germinación se lleve a cabo. Cabe aclarar que al hablar de concentración (o nivel) de glucosa se refiere, a menos que se especifique otra cosa, a la mezcla glucosa-urea-sulfato de amonio (C/N=5), pero se toma a la glucosa como referencia. En este experimento se contabilizaron el número de esporas que pudieron romper el período de latencia.

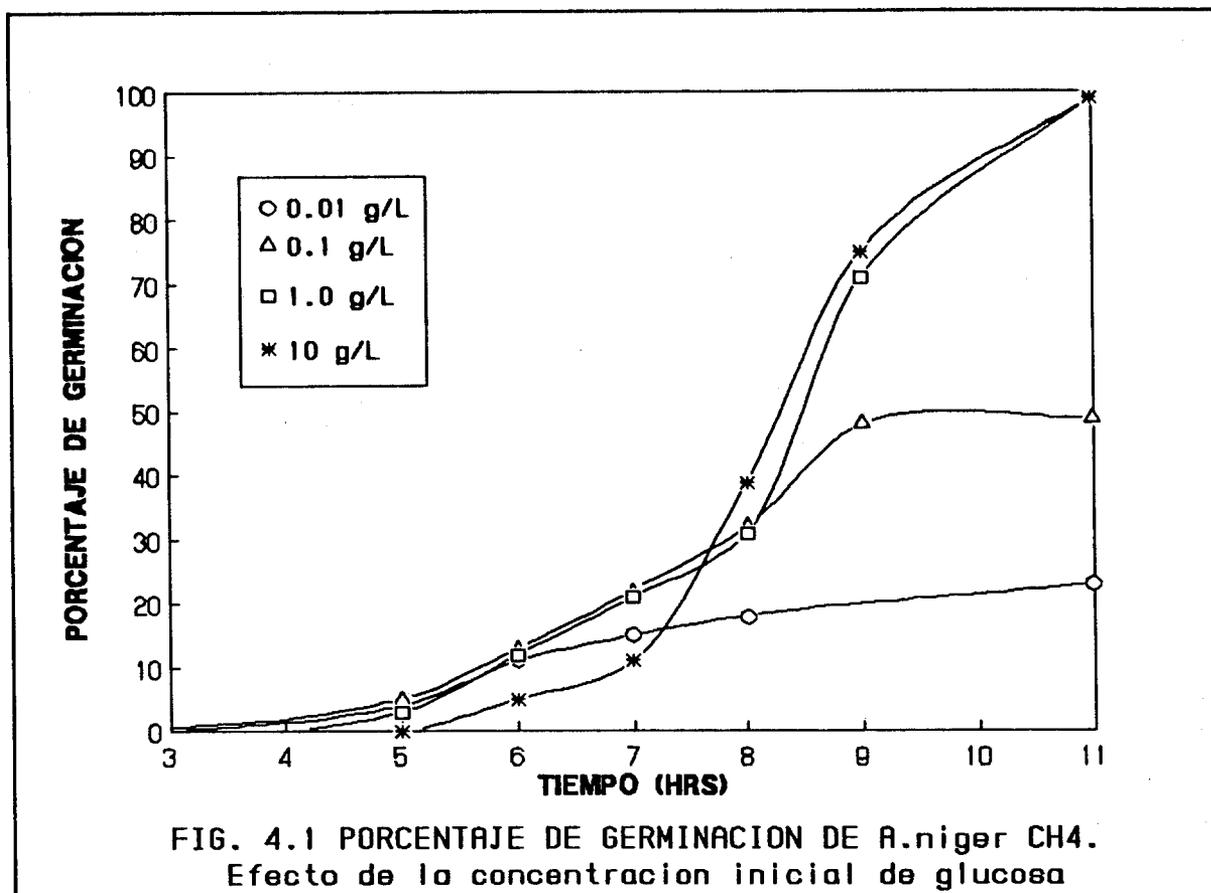
Se utilizó además un medio sin solución de glucosa, pero sí con oligoelementos y extracto de levadura, para conocer la importancia

de los elementos que se estaban limitando. El resultado fue que sí se presentó la germinación, pero en un bajo porcentaje (<5%), por lo que se puede afirmar que el suministro exógeno, en cantidades suficientes, de sustancias que se utilicen como fuente de carbono y de nitrógeno, son indispensables para la germinación de las esporas de esta cepa.

También se utilizó un medio que contenía exclusivamente glucosa (1 g/L) y agua destilada, encontrando que la germinación no procedía, lo cual indica que se requieren de los otros componentes del medio, sin llegar a determinarse, en éste trabajo, cuales de ellos son los mas importantes. No se hicieron experimentos, del tipo diseño factorial, para conocer el nivel de requerimiento de cada uno, sin embargo, se puede tener una buena referencia de cuales son estos compuestos revisando el trabajo de Yanagita (1957), en el cual establece que el medio mínimo que sustenta el 100% de la germinación, está compuesto por glucosa (20 g/L), L-alanina ó L-prolina (200 mg/L) y amortiguador de fosfatos 0.06 M a pH 6. Es decir, fuente de carbono, un aminoácido no sintetizable o que no se encuentran en sus reservas, y fósforo.

Se puede apreciar en la figura 4.1 la variación promedio (3 experimentos) del porcentaje de germinación, en cada uno de los niveles de glucosa inicial utilizados, durante las primeras 11 horas. Se tiene que durante las primeras 5 horas prácticamente no hay diferencia en el porcentaje de todos los niveles, para después notarse que el nivel de 10 g/L se queda atrás hasta las 7 horas, tiempo a partir del cual rebasa a todos los niveles.

La razón de que el nivel mas alto de concentración requiera más tiempo para iniciar el proceso puede ser explicado si se considera que, el haber mas sustrato disponible, es posible sintetizar una mayor cantidad de moléculas precursoras antes de ser lanzado el túbulo germinativo, y es por eso que, una vez que este evento tiene lugar, la cantidad de pared sintetizada es mayor que en cualquiera de los otros niveles.



La concentración de 0.01 g/L es ya muy baja, y solamente permite la germinación de un 20% de la población.

En todos los niveles, excepto en 0.01 g/L, las curvas de germinación presentan un comportamiento sigmoideal, al igual que en los trabajos de Yanagita (1957) y de Ohmori y Gottlieb (1965), con una zona de retardo, una exponencial, y finalmente un desaceleramiento que culmina en meseta. Las curvas indican que el tiempo requerido para la adaptación al medio (detección de la composición del medio y síntesis de precursores esenciales, tales como el ARN (Hollomon, 1970)), es de aproximadamente 5 horas (zona de retardo), para después dar paso, entre las 5 y 6 horas, al comienzo de la fase exponencial de la germinación.

El desaceleramiento comienza a las 6 horas para el nivel de 0.01 g/L, ocasionado por la falta de sustrato, como lo indica el análisis de glucosa residual realizado (fig.4.2), y el hecho de que todavía queda un porcentaje de la población sin germinar. Para el resto de los niveles el desaceleramiento comienza alrededor de las 9 principalmente debido a que, en las concentraciones más altas (1 y 10 g/L) casi el 100% de la población ya ha germinado.

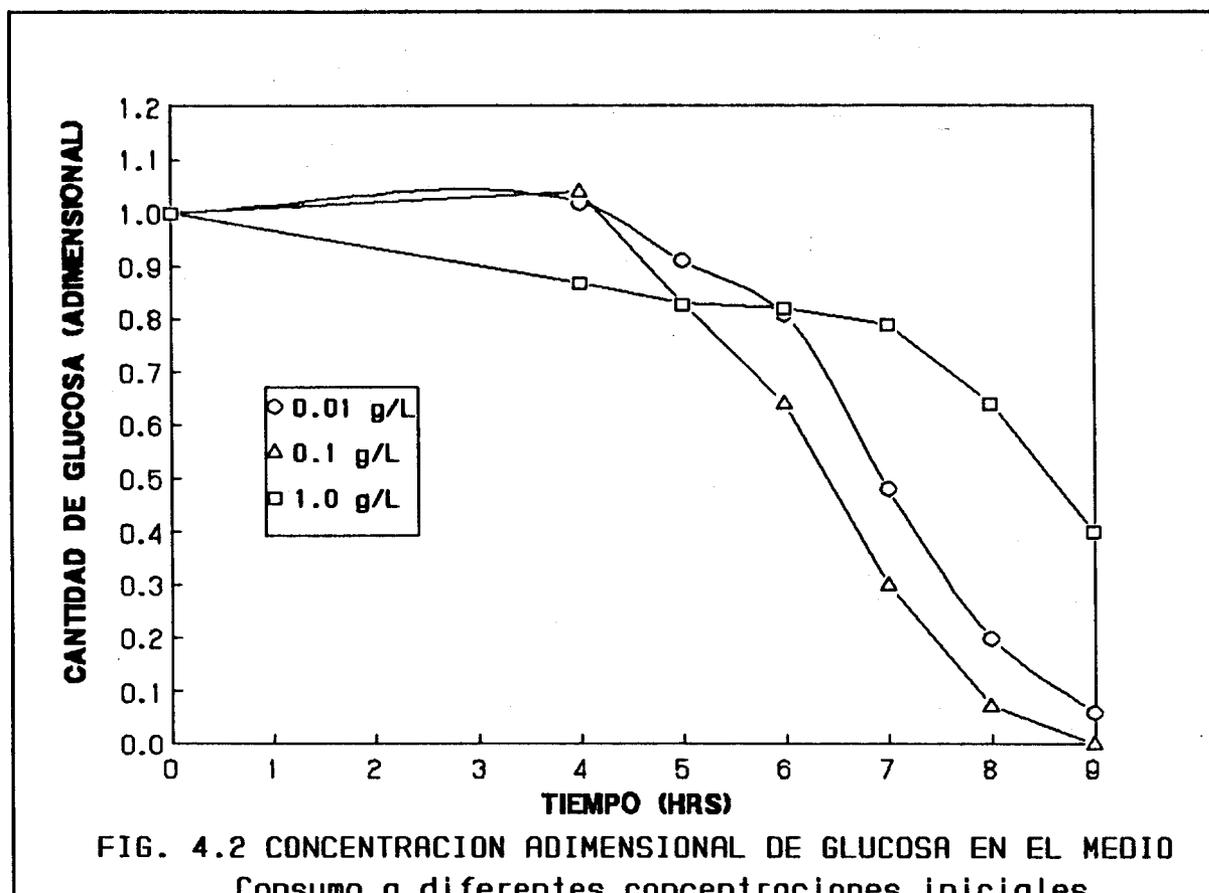
El porcentaje de germinación que se obtiene a las 11 horas es el final, ya que se observa que, a partir de esta hora, comienza a aparecer la primera ramificación en la mayoría de las hifas, empezando con esto la transición hacia la fase de crecimiento vegetativo, observándose lo mismo para todos los niveles.

La germinación no procede si se colocan las esporas en agua destilada, lo cual indica que, efectivamente, las reservas endógenas de sustrato no son suficientes para sostener el proceso de germinación, por lo que la ausencia de fuentes de nutrientes en el medio constituye una señal negativa, conservándose la espora en etapa de latencia.

Por pruebas con diferentes concentraciones iniciales de sustrato se puede establecer que el límite inferior de concentración de glucosa (C/N=5) que permite que un pequeño porcentaje de la población germine (<10 %) es de 0.001 g/L. Abajo de esta concentración ninguna espora presentó, durante 24 horas que fue monitoreado el experimento, ni el hinchamiento ni el túbulo germinativo.

4.2 Consumo de glucosa.

La figura 4.2 muestra, de manera adimensional, el consumo de glucosa para cada uno de los niveles iniciales utilizados.



Se puede apreciar que, durante las primeras 4 horas, no se tiene consumo apreciable de glucosa en ninguno de los dos niveles de concentración inferiores, lo cual coincide, a su vez, con la baja o nula detección de respiración durante este período (fig. 4.3). En este tiempo es probable que se esté dando la utilización de las reservas energéticas de la espora (Ohmori y Gottlieb, 1965), pues se sabe que en esta etapa de la germinación ya ha empezado la actividad metabólica (Hollomon, 1970).

En los 2 niveles menores (0.01 y 0.1 g/L) se observa el agotamiento acelerado de la glucosa a partir de las 4 horas, quedando a las 8 horas menos del 20% de la concentración inicial, mientras que para los 2 niveles mas altos (1 y 10 g/L), aún queda más del 60% (no se presentan datos para 10 g/L dado que el error

inducido por la dilución que se requería para poder utilizar la misma técnica analítica en todos los niveles era demasiado grande).

El consumo de glucosa para el medio de 1 g/L se presenta mas temprano, lo cual puede significar que las reservas endógenas no son utilizadas, sino que se aprovecha la fuente externa desde el principio. Al comparar las factores de rendimiento (tabla 4.8.1) se puede notar que es menor que el de los niveles mas bajos de glucosa.

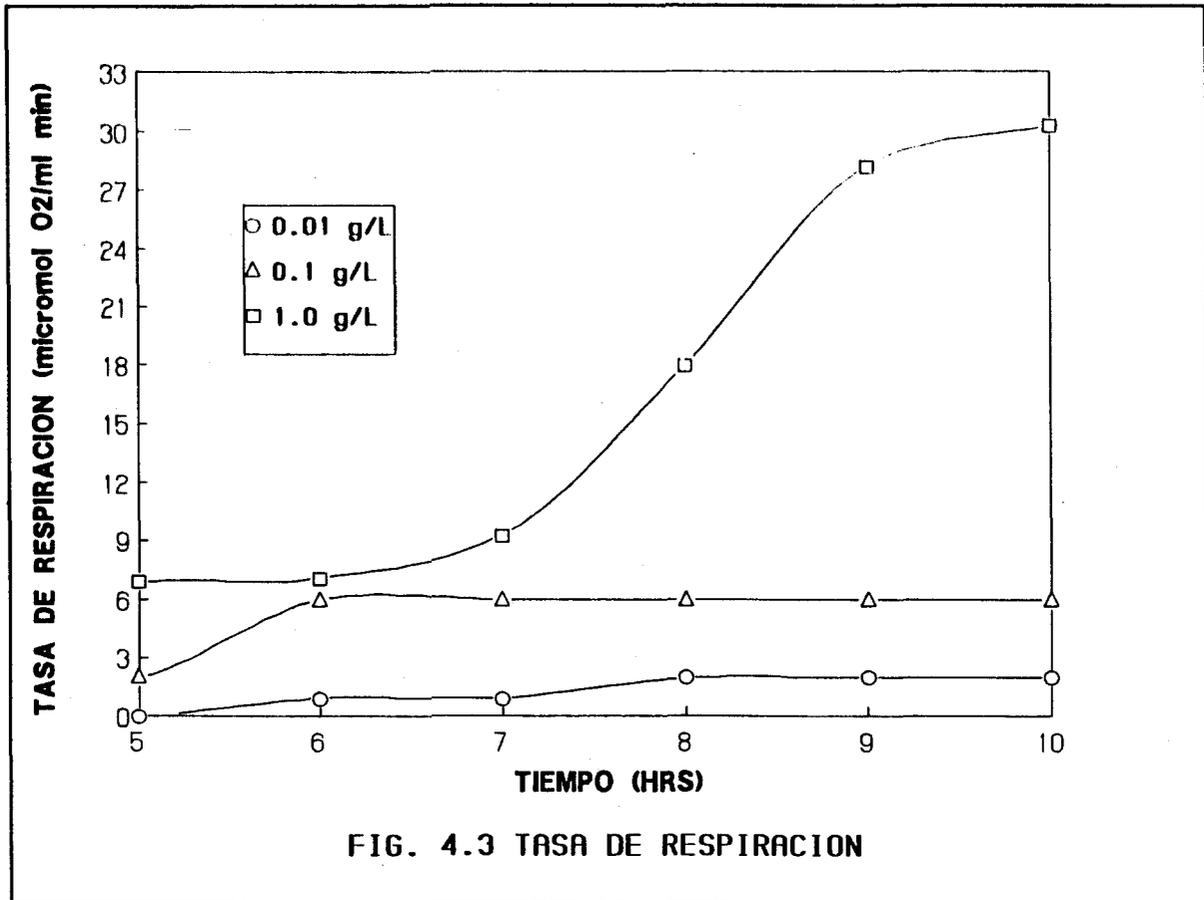
En medio con 10 g/L se presenta un comportamiento similar en cuanto a que el sustrato interno no es utilizado, dándose una importante entrada de material a la espora, estando ésto evidenciado por el mayor hinchamiento inicial de las esporas que son colocadas en este nivel de glucosa.

La forma de las curvas describen un decaimiento exponencial, ajustándose a la ecuación 3.13, lo que concuerda dentro del esquema de que la glucosa consumida es rápidamente utilizada, tanto para el crecimiento como para el mantenimiento de las funciones celulares. Como consecuencia de este consumo de sustrato se presentan los signos de su utilización, los cuales son el aumento en la tasa de respiración y la aparición de productos extracelulares ácidos, tal como se aprecia en las curvas de tasa de respiración (fig 4.3) y la caída del pH (fig.4.5).

4.3 Tasa de respiración.

No obstante que se utilizó la misma concentración inicial de inóculo en todos los medios, se puede apreciar (figura 4.3) que la tasa de respiración depende directamente de la concentración inicial de glucosa, teniéndose que, a baja concentración, la respiración es muy baja y prácticamente constante.

A partir de las 6 horas, la respiración aumenta exponencialmente en la concentración de 1 g/L de glucosa inicial (o más), pero esta tendencia se detiene a las 9 horas, no obstante que todavía queda alrededor del 60% del sustrato inicial.



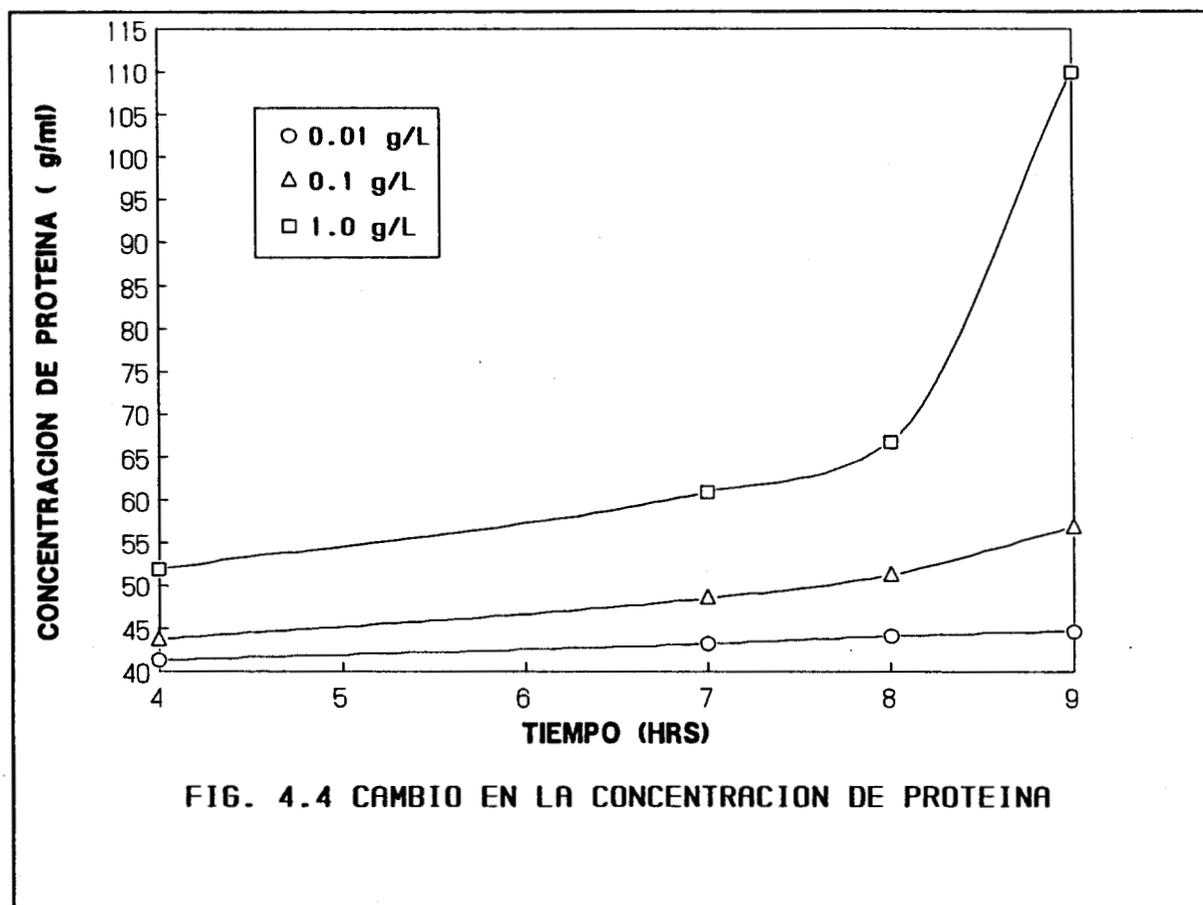
Este desaceleramiento coincide con el fin de la etapa de germinación, ya que aproximadamente a las 11 horas, en todos los niveles de glucosa, empiezan a observarse las primeras ramificaciones. El hecho de que en este rango de concentraciones de glucosa sea el tiempo lo que controla el paso de una etapa (germinación) a otra (crecimiento vegetativo) es muy interesante, dado que pudiera estar indicando que lo que marca el ritmo es un cierto número de duplicaciones realizadas, y no la concentración de glucosa en el medio.

La tasa de respiración observada en los medios de 0.1 y 0.01 g/L casi no presentó cambios, siendo de hecho constante, aún cuando sí había germinación, lo cual se relacionó a que se estaba observando el fenómeno de acoplamiento energético, en el cual se

optimizan las funciones celulares, aprovechándose al máximo el sustrato carbonado, como se puede ver mas adelante en la tabla 4.8.1.

4.4 Síntesis de proteína.

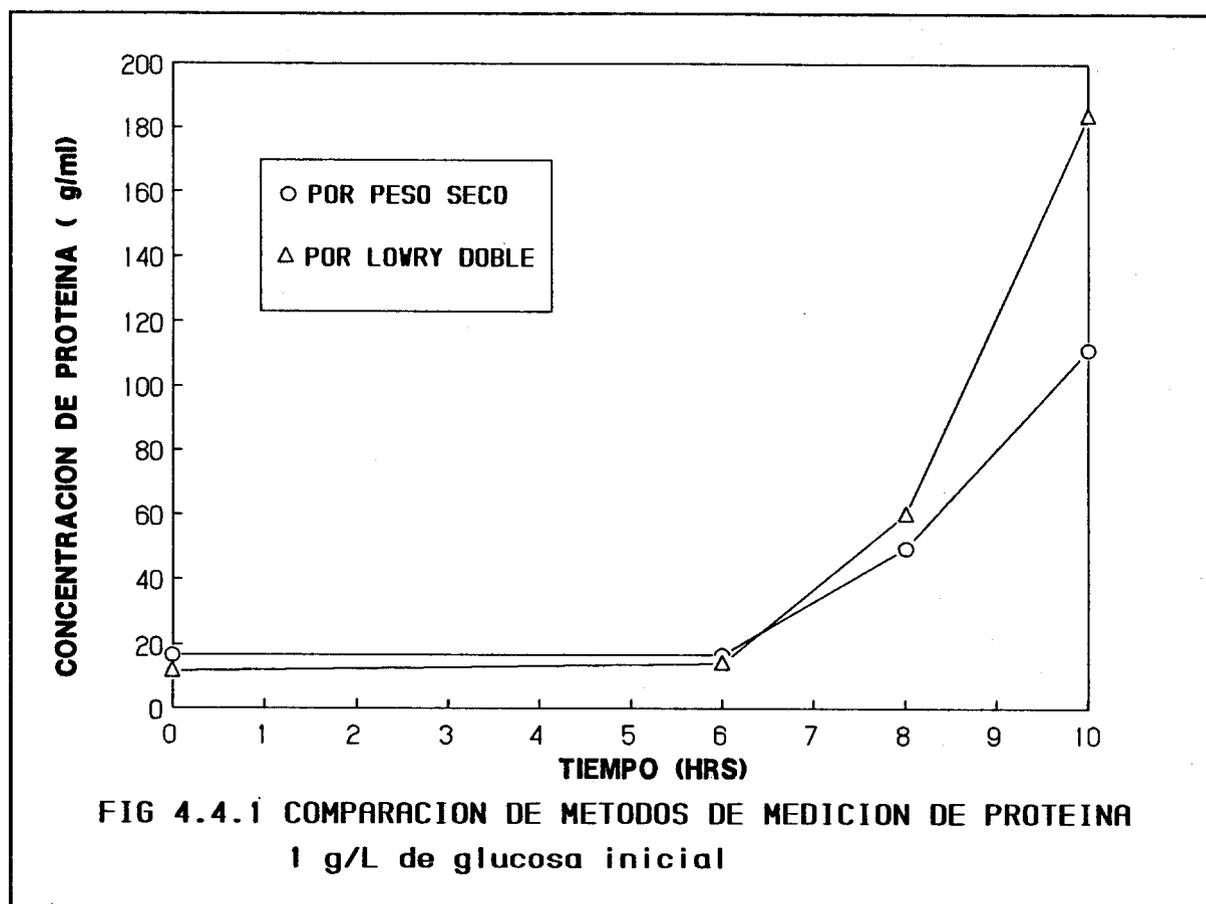
La proteína presentó diferencias según la concentración inicial de glucosa utilizada, como se nota la fig.4.4.



Se aprecia que, para las concentraciones de 0.01 y 0.1 g/L casi no hubo aumento de proteína, presentándose un comportamiento análogo al de la tasa de respiración, por lo que se puede afirmar que el bajo contenido de sustrato del medio no permite que sea sintetizada la cantidad de biomasa máxima potencial de que son capaces las esporas al germinar, sin embargo, como se puede apreciar en la tabla 4.8.1. se presenta una mejor utilización del sustrato carbonado.

Para 1 g/L, la proteína presenta un comportamiento exponencial de las 8 a las 10 horas, lo cual puede ser expresado mediante la ecuación 3.8, que representa el aumento exponencial de la biomasa, pudiéndose encontrar, de esta manera el valor de la tasa específica de crecimiento (de germinación), que va a dar una idea global de la velocidad del proceso según la concentración inicial de sustrato, lo cual se presenta en la sección 4.8.1.

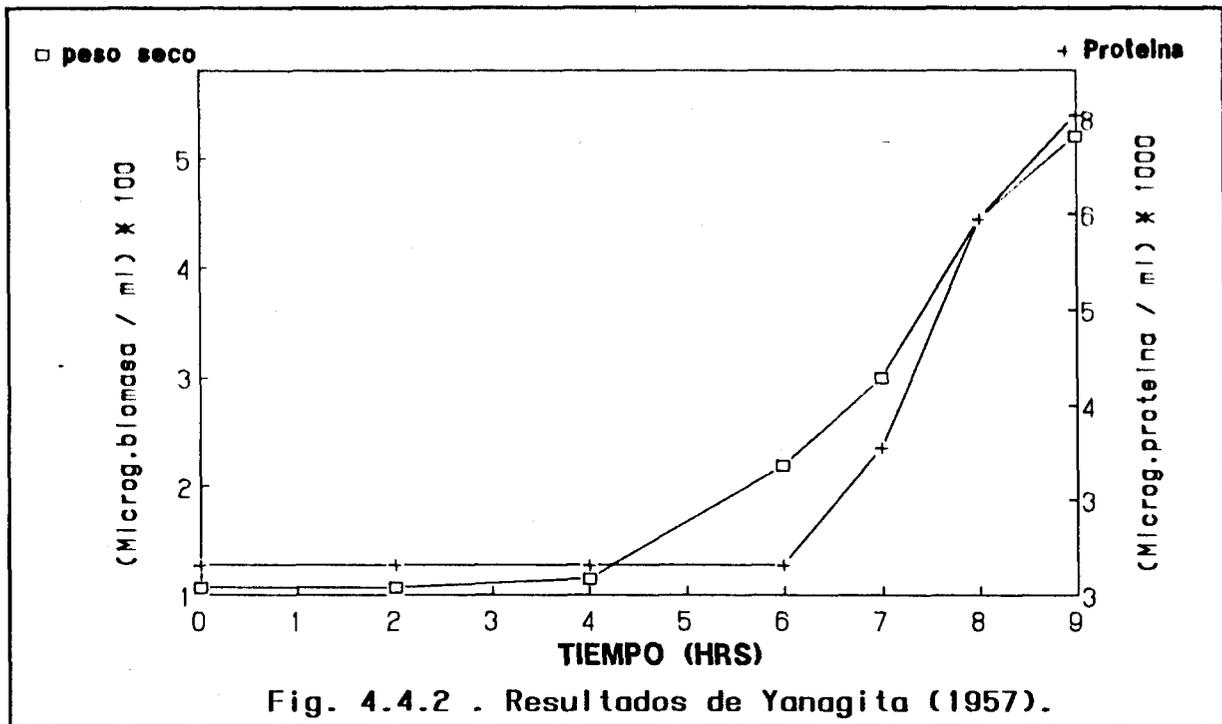
Se quiso probar que tan confiable era el método de medición de proteína utilizado (Lowry doble), por lo que se hizo la comparación, para 1 g/L de glucosa inicial, con el método del cambio en el peso seco, considerándose que el 40% del peso seco era proteína. La comparación se muestra en la figura 4.4.1.



Se aprecia que es confiable hasta las 8 horas, para después alejarse las curvas, y ser mayor la proteína detectada por el método de Lowry doble.

Esto puede deberse a varias razones, una de las cuales es que, según avanza la germinación, las esporas con su túbulo ocupan mayor espacio, alejándose unas de otras, teniéndose menos esporas por mililitro muestreado, con lo cual el peso va a disminuir por unidad de volumen, causando esto un error experimental mayor. Otro factor es que con el peso seco estamos considerando un porcentaje de proteína fijo (40%), lo cual no es del todo correcto, pues se sabe que éste varía con el estado fisiológico del micelio (Sheperd, 1956). En nuestro caso se tiene que, para las primeras horas, el porcentaje inicial de proteína en peso seco sí está alrededor del valor de 40%.

Yanagita (1957) realizó un estudio similar para la germinación de *Aspergillus niger* cepa 1617, en medio líquido. Sus resultados, ya con el cambio apropiado de unidades para poder hacer la comparación, se muestra figura 4.4.2. En este trabajo se detecta un aumento en el peso seco antes que en la proteína, entre las 0 y 3 horas, lo cual lo atribuye a la síntesis de purinas y piridimidias, y de ácidos nucleicos y polipéptidos entre las 3 y 6 horas. Este cambio en el peso difiere de lo encontrado en nuestros experimentos (fig 4.4.1), en los cuales el aumento en peso seco y proteína (medida por Lowry doble) se da simultáneamente. Esto pudiera deberse a la diferencia de los métodos cuantitativos utilizados.



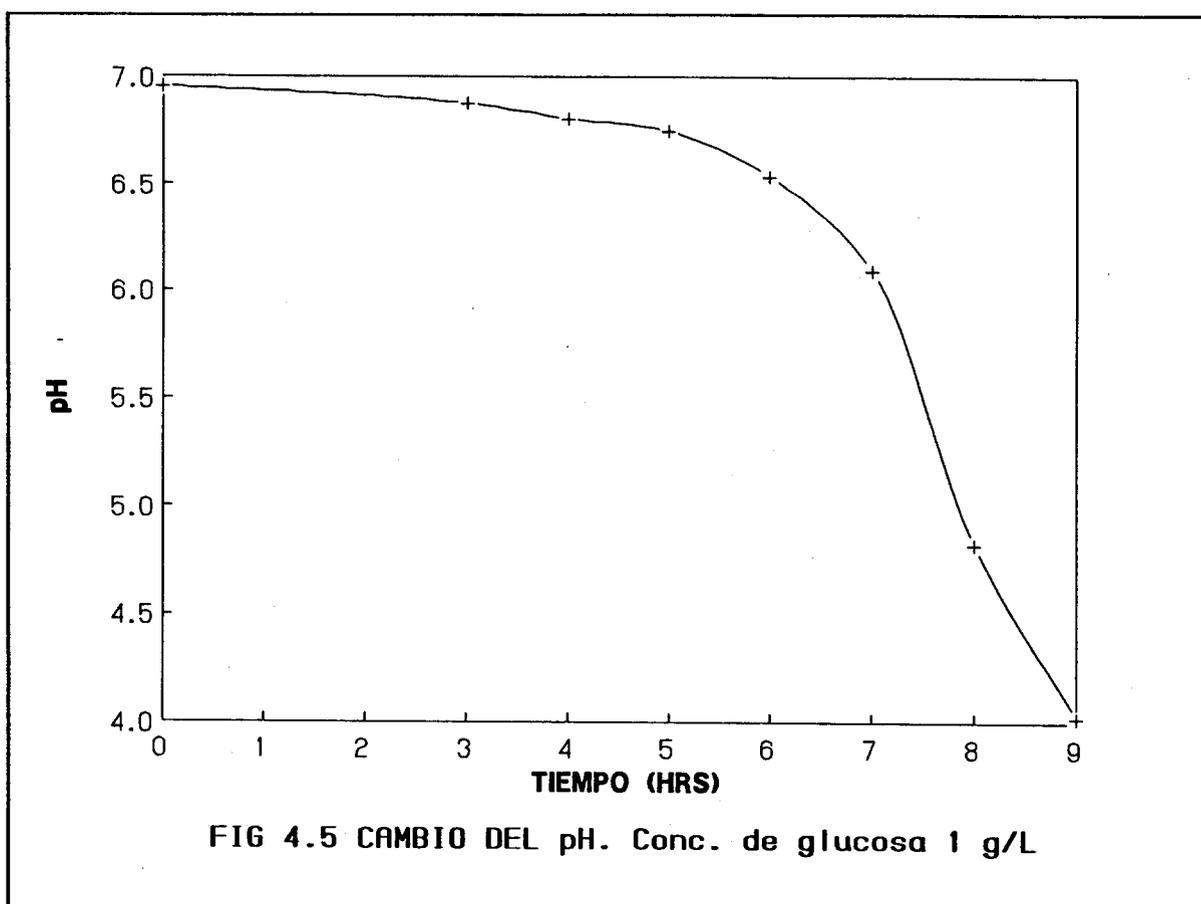
Siguiendo con la idea del peso seco, Ohmori y Gottlieb (1965) encuentran que el peso no solo no aumenta, sino que disminuye durante la primera hora, lo cual lo atribuyen a el consumo de las sustancias de reserva. Concluyen que la biosíntesis que se observa posteriormente es preferentemente de proteína enzimática, y no de proteína estructural, lo cual está indicando que se da el aprovisionamiento de enzimas, lo cual es lógico si se considera que la siguiente etapa, el crecimiento vegetativo, se caracteriza por ser de elevada síntesis de biomasa indiferenciada.

En el sentido de la disminución de peso, en nuestro trabajo no se obtuvieron datos de peso seco o proteína a tan temprana hora, pero, por el procesamiento de imágenes se pudo observar una ligera reducción en el diámetro de las esporas en la primera hora, para después pasar a un hinchamiento, proporcional a la concentración inicial de glucosa, tal y como fue observado por Campbell (1971), y que se muestra en la tabla 4.6.1 para los diámetros de spora finales obtenidos para cada nivel de glucosa. Esta disminución

inicial de las esporas se debe, necesariamente, al reacondo ó a la pérdida de materia interna, en forma de calor por ejemplo, siendo esta última opción la mas factible, dado la evidencia de que, en general, durante las primeras horas del proceso no hay consumo de sustrato externo, como lo muestra la figura 4.2.

4.5 Cambio en el pH

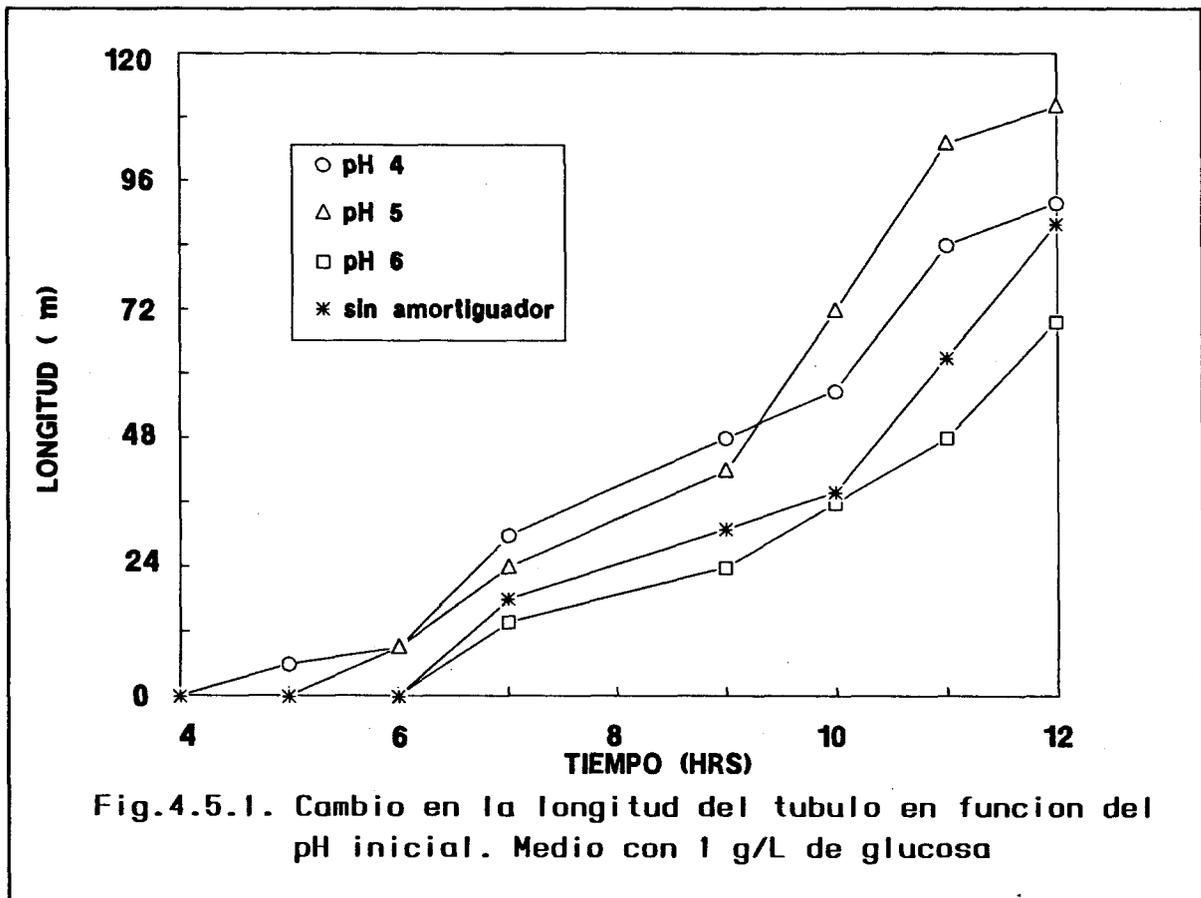
El pH del medio, para todos los niveles de glucosa, no muestra cambios importantes las primeras 6 horas, para después comenzar a descender rápidamente, hasta bajar incluso en dos ordenes de magnitud (de 6.5 hasta 4 ó menos) en los medios con 1g/L o más de glucosa. El comportamiento del pH para el medio con 1 g/L se muestra en la figura 4.5.



Capítulo 4. Resultados y discusión.

La caída fue proporcional a la concentración inicial de glucosa utilizada, lo cual está indicando que el cambio en el pH está muy probablemente relacionado a productos ácidos carbonados extracelulares.

Posteriormente se utilizaron soluciones amortiguadoras de citrato-fosfato para corroborar el efecto del pH inicial sobre la germinación, encontrándose que el pH óptimo para una máxima elongación del túbulo germinativo estaba alrededor de 5, ya que un pH mas bajo o mas alto inhibía el proceso, presentando un retraso importante si era utilizado un pH de 7, para medio con 1 g/L de glucosa (fig.4.5.1).



Este efecto del pH sobre la longitud máxima alcanzada por las

hifas indica la importancia de la existencia de un gradiente redox entre la hifa y el medio, el cual va a facilitar el transporte de los nutrientes y iones necesarios para la elongación. También el porcentaje de germinación se ve afectado por el pH, inhibiéndose el proceso, aún en presencia de cantidades suficientes de sustrato, al colocarse las esporas a un pH menor de 4 (Yanagita, 1957).

Las curvas de elongación presentaron un comportamiento exponencial, el cual puede ser descrito por una ecuación de la forma de la 3.20, por lo que se procedió a realizar el ajuste para encontrar la constante de elongación para cada pH, y poder comparar el efecto de cada medio sobre la longitud máxima alcanzada y la tasa específica de elongación, encontrándose los siguientes valores (Tabla 4.5.2).

Tabla 4.5.2. Valores del coeficiente de ajuste exponencial para diferentes pH iniciales. Medio 1 g/L de glucosa .

	pH 4	pH 5	pH 6	s/amort.
k_L	0.23	0.33	0.32	0.32
L.máx.	92	110	70	88

Unidades: $k_L = h^{-1}$; L.máx = $\mu m/hifa$

Como se puede apreciar, el coeficiente de ajuste (k_L) es prácticamente el mismo para pH inicial de 5, 6 y sin amortiguador (pH inicial de aproximadamente de 6.5), variando el tiempo en que emerge el túbulo y, por lo tanto, la longitud máxima alcanzada, dado que todos los niveles pasan a la siguiente etapa (crecimiento vegetativo) al mismo tiempo. Se puede ver que, para pH 4 y 5 el proceso comienza a las 4 horas, mientras que para pH 6 y sin amortiguador es después de las 6 horas, esto significa que, aunque pH 5 y 6 tienen la misma tasa específica de elongación (0.32), el comenzar a elongarse pH 5 antes le permite alcanzar una mayor longitud. Esto se aprecia mas claramente en el caso de pH 4, que es en donde se presenta la menor tasa (0.23) y que, sin embargo, logra alcanzar una longitud mayor que ph 6 y sin amortiguador.

Este comportamiento, el surgimiento temprano del túbulo, esta indicando, a *grosso modo*, que la síntesis de precursores se completa en menor tiempo en los medios con pH de 4 y 5, además de poder concluir que, dentro de éstos dos medios, el transporte activo y/o la integración de los precursores a la pared es un poco mayor a pH 5, lo que se refleja en un mayor valor de la tasa específica de elongación.

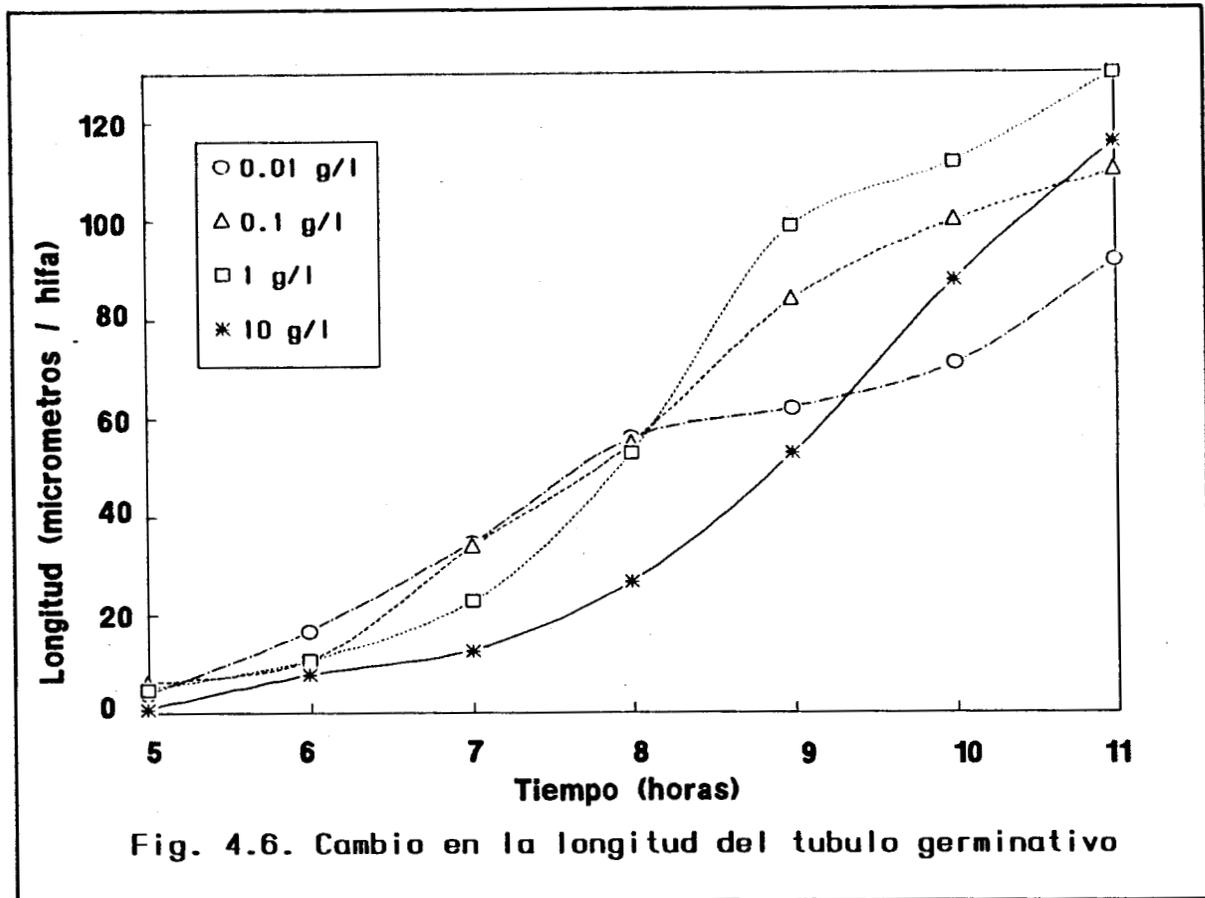
Un retraso importante en el surgimiento del túbulo se observó cuando se utilizó amortiguador a pH de 7, presentándose únicamente un ligero crecimiento del túbulo. Este efecto está indicando que es necesario, para que se presente el crecimiento axial, que exista un pH ácido, lo cual concuerda con el hecho de que, en medios sin control de pH, *Aspergillus niger* rápidamente establece un ambiente ácido, como lo muestra la figura 4.5. Esto demuestra la necesidad de un gradiente de potencial para el establecimiento exitoso del micelio en medio líquido.

4.6 Procesamiento de imágenes: Longitud hifal, diámetro de hifa y de espora.

Al realizar el seguimiento visual de la germinación, se pudo constatar el evento anterior al surgimiento, el hinchamiento de la espora, el cual fue directamente proporcional a la concentración inicial de glucosa utilizada, teniéndose de esta manera que para el nivel de 0.01 g/L no se presenta, de manera detectable, esta fase (tabla 4.6.1). Este hinchamiento parece estar ligado a un incremento en el número de mitocondrias y núcleos en la espora (Campbell, 1971). Este menor número de mitocondrias por espora pudiera explicar la baja tasa de respiración (fig 4.3) observada en los niveles de glucosa inferiores.

El cambio en la longitud del túbulo germinativo, sin amortiguador, fue seguido durante las primeras 11 horas (figura 4.6), encontrando que sigue un comportamiento sigmoideal, con una fase exponencial de las 6 a las 9 horas, para luego darse la fase de desaceleración, justo cuando empieza a observarse la primera

ramificación, que es el momento en que se dejan de tomar las mediciones.



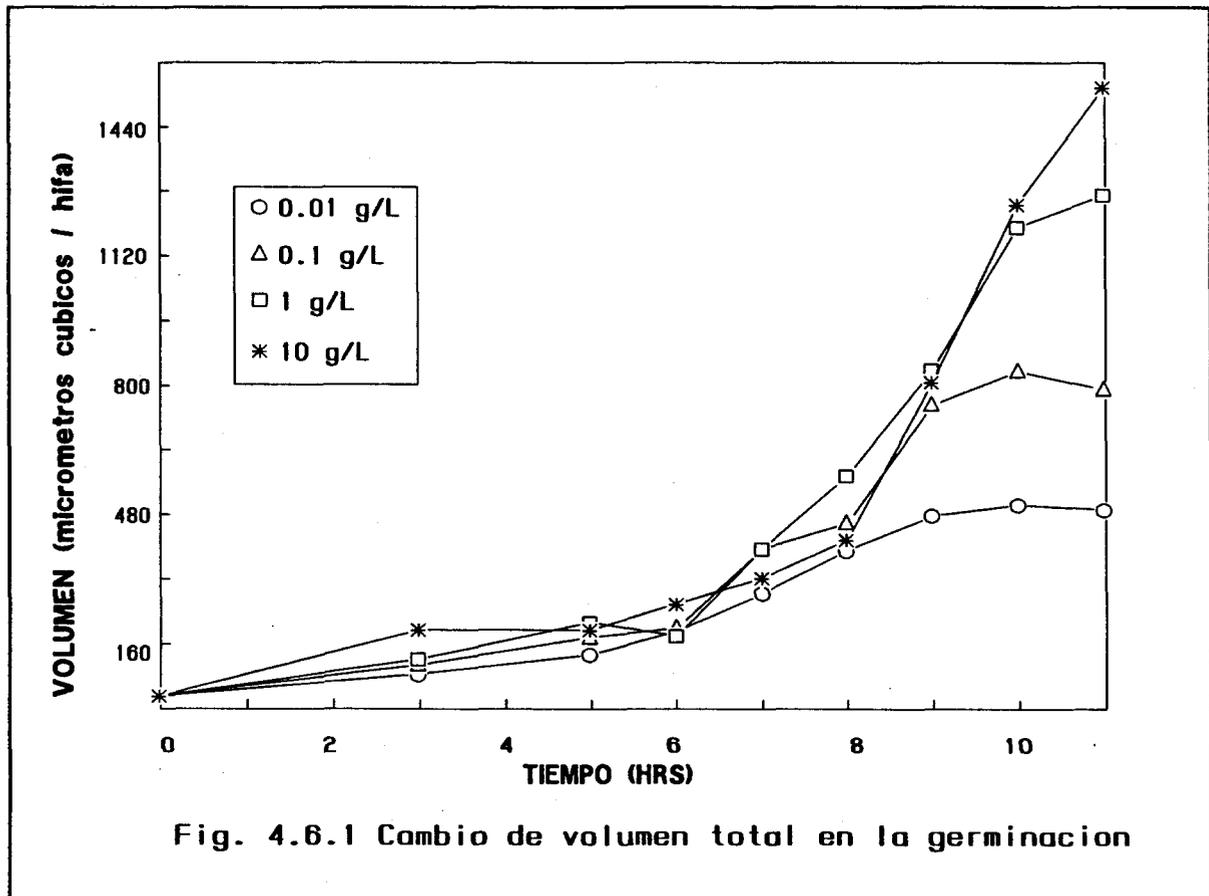
El análisis estadístico de las longitudes del túbulo germinal y del diámetro de espora muestra que sí es significativa la diferencia para cada uno de los niveles iniciales de glucosa utilizados, así como para el diámetro de hifa. Los valores de estas variables se muestran en la tabla 4.6.1. Al utilizar estos valores para calcular el volumen promedio de hifa se tiene un comportamiento mas apegado a lo encontrado con la medición de proteína (Sección 4.4), es decir, que a mayor sustrato inicial hay mayor concentración de biomasa, lo cual está referido a un mayor volumen.

Tabla 4.6.1 Valores experimentales de la longitud de hifa, diámetro de hifa, diámetro de espora y volumen.

Conc (g/L)	0.01	0.1	1	10
D. espora (μm)	5.4 ± 0.47	6.0 ± 0.59	6.2 ± 0.72	7.2 ± 0.91
D. hifa (μm)	3.0 ± 0.22	3.2 ± 0.21	3.3 ± 0.25	3.6 ± 0.21
L. hifa* (μm)	92	110	130	116
Volumen hifa (μm^3)	650	885	1112	1181

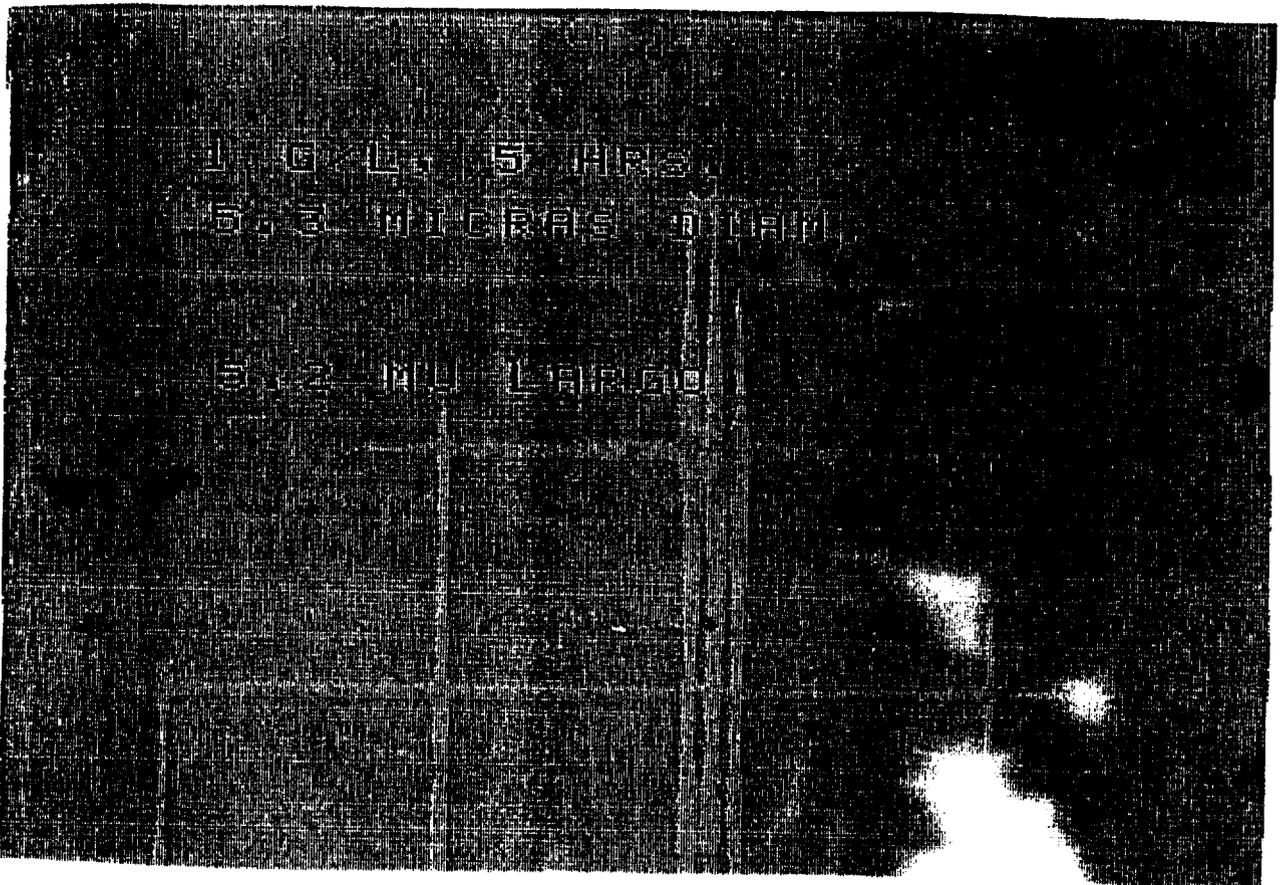
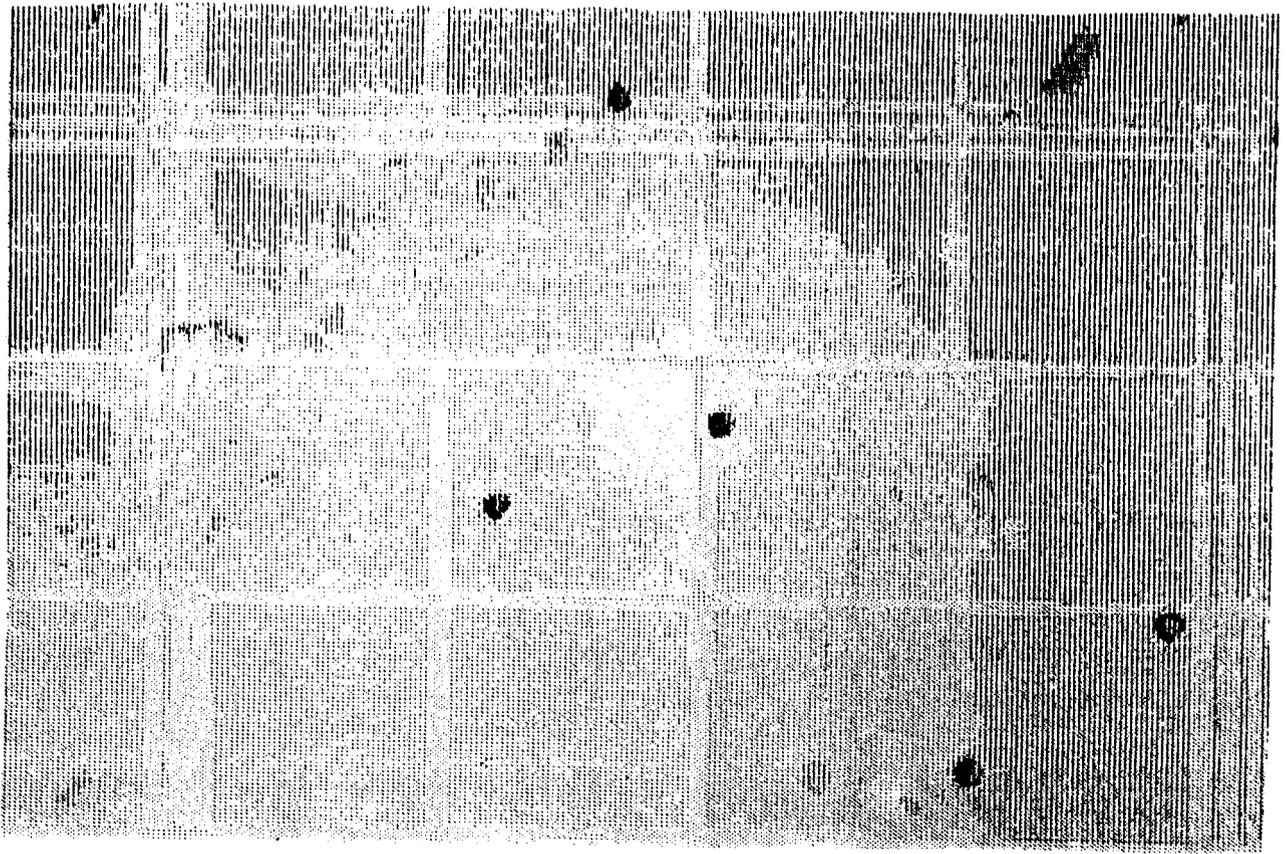
* Longitud máxima a las 11 horas.

La gráfica del cambio de volumen de la hifa en el tiempo, según la concentración inicial de sustrato, se muestra a continuación en la figura 4.6.1.



Se puede observar que, si bien en la figura 4.6 la longitud promedio del nivel 10 g/L es menor que la de 1 e incluso que la de 0.1 g/L, al considerar el volumen se observa que, tal como es de esperarse, 10 g/L es el que mayor volumen, es decir, mayor biomasa produce. Esto significa que la longitud no es el único parámetro morfométrico de importancia a considerar, sino que también el diámetro de la hifa va a ser ajustado según las condiciones del medio, con lo cual se va a poder ajustar la superficie de transporte de la hifa y con esto optimizar la utilización del sustrato.

A continuación se presenta, para 1 g/L de glucosa, una serie de imágenes que muestra la evolución de la germinación. Para cada hora fueron analizadas de 25 a 30 hifas, por lo que las hifas que se muestran se buscó que fueran lo mas representativas posibles del promedio.



1 G/L, 6 HRS.

5.3 MICRAS DIAM.

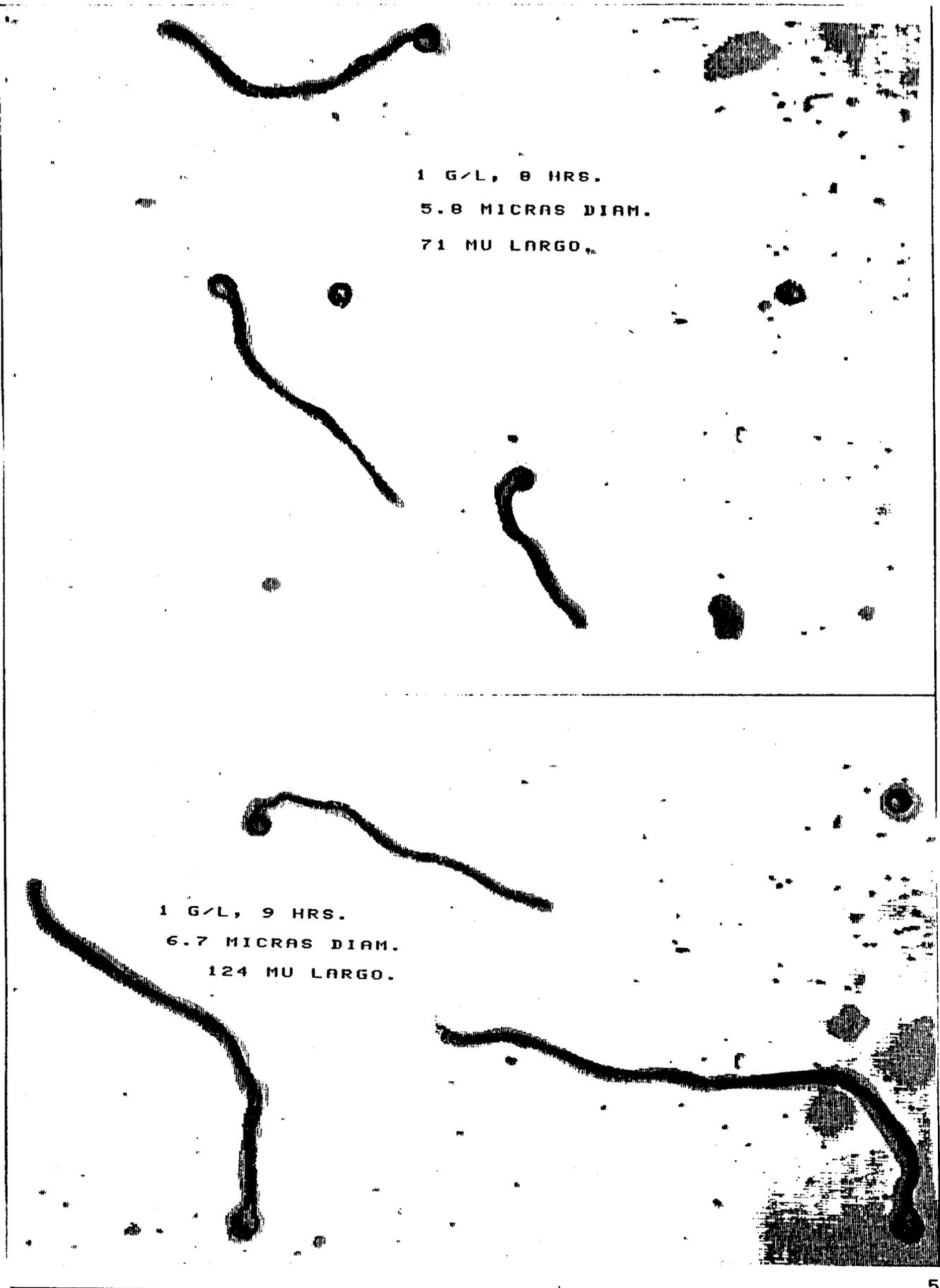
1.5

7.6 MU LARGO.

1 G/L, 7 HRS.

5.3 MICRAS DIAM.

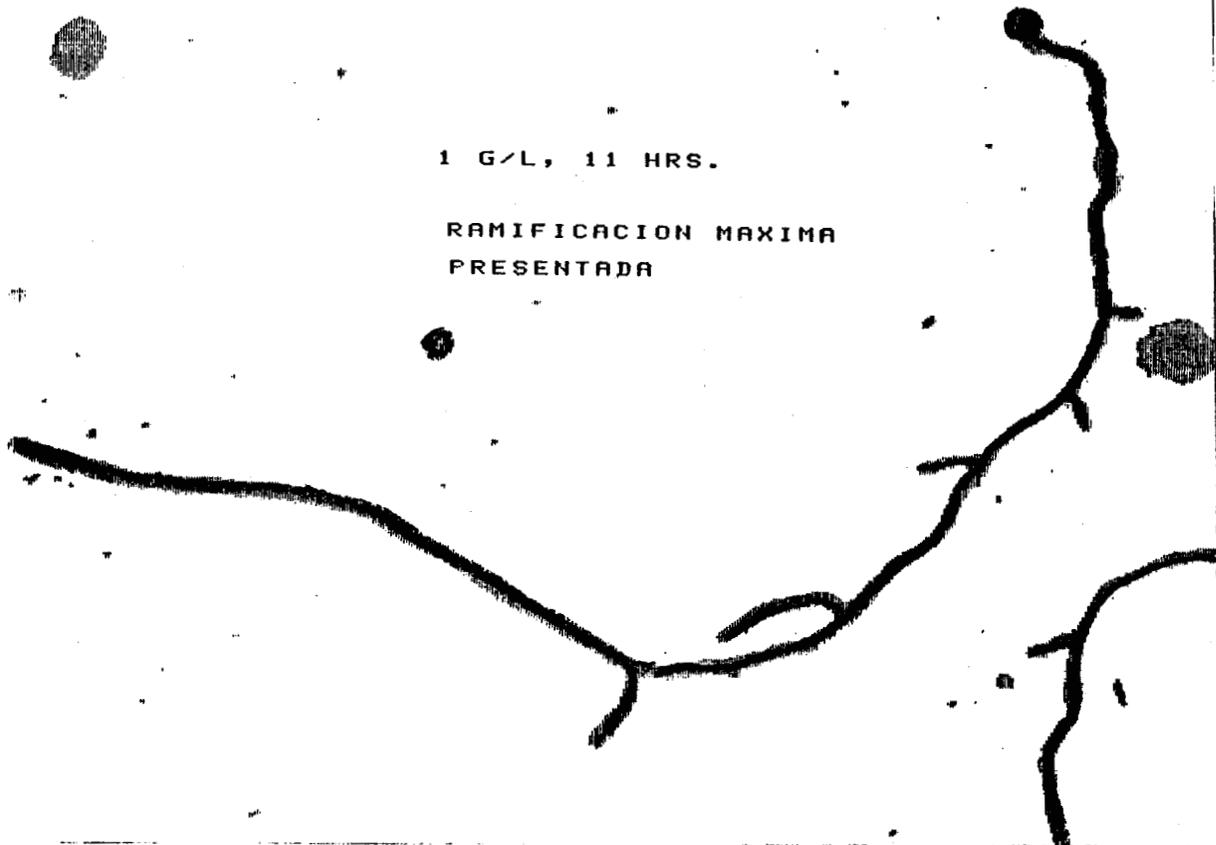
26 MU LARGO.



1 G/L, 10 HRS.
5.3 MICRONS DIAM.
125 MU LARGO.



1 G/L, 11 HRS.
RAMIFICACION MAXIMA
PRESENTADA



4.7. Tratamiento de los resultados: Factores de rendimiento.

Con los datos obtenidos se hizo el balance entre glucosa consumida (fig.4.2) y tasa de respiración (fig.4.3) con la proteína producida (fig.4.4) para con esto conocer el rendimiento global de estos sustratos (glucosa y oxígeno), para cada medio, utilizando para ello las expresiones 3.2 y 3.3, según el caso, con o sin limitación de sustrato, y las cuales son:

$$x - x_0 = Y(S_0 - S) \quad (3.2)$$

$$x_m - x_0 = YS_0 \quad (3.3)$$

presentándose resultados para 0.01, 0.1 y 1 g/L en la tabla 4.7.1.

Tabla 4.7.1. Factores de rendimiento de glucosa y oxígeno para 1, 0.1 y 0.01 g/L de glucosa inicial.

Concentración (g/L)	0.01	0.1	1
$Y_{x/g}$	0.70	0.44	0.43
Y_{x/o_2}	0.38	0.40	0.37

Se puede apreciar que el rendimiento de la glucosa es mayor en el medio de 0.01 g/L que en los de 0.1 y 1 g/L, lo cual está indicando que en el primero la cantidad de carbono presente se está aprovechando en la biosíntesis de proteína compleja, mientras que en los otros un porcentaje mayor está siendo utilizado en funciones diversas, tales como síntesis de precursores no protéicos y la regulación de la presión interna, debido a la mayor concentración de glucosa, fosfato de amonio y urea de estos medios, es decir, en el medio con 0.01 g/L de glucosa se observa el fenómeno de *acoplamiento energético*, lo que indica que es a esta concentración donde la baja concentración de sustrato es ya una limitante para el desarrollo del micelio.

El mayor rendimiento de la glucosa a bajas concentraciones de ésta se debe al reacomodo de las vías metabólicas, ya que se

minimizan los productos extracelulares, y se aumentan el anabolismo, manteniéndolo a la par de la tasa de crecimiento, para optimizar la utilización del sustrato limitante, (Harder y Dijkhuizen, 1983). Para el caso de 0.1 y 1 g/L se tiene que el rendimiento es el mismo, lo cual va a indicar que en ésta zona de concentración el factor de rendimiento global puede considerarse, efectivamente, constante.

Dado que el rendimiento del carbono esta dividido en el sustrato que se utiliza en generación de biomasa y el que sirve para generar energía, se puede hacer la distinción de estos 2 usos utilizando la ecuación estequiométrica de consumo de oxígeno por glucosa consumida (ec.3.11), con lo cual se puede inferir la cantidad de carbono que se utilizó en generar biomasa, lo cual va a permitir calcular los valores de Y_e y Y_{cel} (ec. 3.6), y calcular el coeficiente de mantenimiento (ec. 3.7). La tabla 4.7.2 muestra los valores obtenidos para los factores de rendimiento del sustrato para biomasa y para energía.

Tabla 4.7.2. Factores de rendimiento de glucosa para energía y biomasa. 1, 0.1 y 0.01 g/L de glucosa inicial.

Concentración (g/L)	0.01	0.1	1
$Y_{x/g}$	0.7	0.44	0.43
Y_{cel}	1.5	0.68	0.63
Y_e	1.3	1.3	1.36

Como se puede notar, el rendimiento de energía es el mismo para los 3 medios, por lo que, al utilizar la ecuación 3.7 se tiene que, para cualquier valor de $1/\mu$ el $1/Y_e$ es constante, resultando ser la pendiente de cero, es decir, no hay gasto de sustrato para mantenimiento.

El rendimiento del sustrato para biomasa (Y_{cel}) es mayor para 0.01 g/L, como ya se había visto de manera preliminar en el rendimiento global, lo cual viene a confirmar que en éste medio se está presentando el fenómeno de acoplamiento energético.

El rendimiento del oxígeno es prácticamente el mismo en los 3 medios (tabla 4.7.1), esto es, la actividad metabólica de mayor demanda de oxígeno es la síntesis de proteína compleja (detectada por el método de Lowry), pues en los 3 casos se consume la misma cantidad de oxígeno por microgramo de biomasa sintetizada, por lo que puede concluirse, de manera global, que la actividad metabólica que gasta mayor energía es la síntesis de biomasa (específicamente proteína) y se puede sugerir a este respecto que sería necesario comparar el método de medición de la respiración utilizado con algún otro, como podría ser desplazamiento volumétrico, dado que el aparato utilizado estaba diseñado para sistemas cuya tasa de respiración es mayor que el de la germinación de esporas, tal y como es el de monitorear la respiración de un concentrado de mitocondrias.

4.7.1 Tasa específica de crecimiento y de elongación.

Para un cultivo de microorganismos creciendo en la fase exponencial, el aumento de la población puede ser descrito por la ecuación 3.8, la cual tiene la siguiente forma:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (3.8)$$

Donde μ es la *tasa específica de crecimiento*, la cual expresa el aumento unitario de biomasa en el tiempo. Este parámetro es muy importante cuando se quiere conocer y comparar la velocidad de duplicación de un cultivo. Para conocer el valor de μ en cada uno de los niveles de glucosa durante la germinación se procedió a resolver la ec. 3.8, cuya solución es de la forma:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t. \quad (3.9)$$

Donde el valor de la pendiente de la función x vs. t esta dada por μ . Debido a la escasa síntesis de biomasa durante la germinación, los valores de μ son muy bajos (tabla 4.7.3), especialmente para los 2 niveles de glucosa inferiores, donde no se

observó el comportamiento exponencial de la biomasa clásico, sino únicamente un leve aumento. Aunado a esto se tiene la dificultad que representa el medir la biomasa de las esporas en esta etapa, por lo que se concluyó que la biomasa sintetizada no era un parámetro práctico ni confiable, con la metodología tradicional utilizada, para conocer la evolución del aumento de material. Por esto se decidió utilizar el aumento en la longitud del túbulo germinativo para conocer la *tasa específica de elongación*, es decir, el aumento unitario de longitud del túbulo germinativo, el cual presentó un comportamiento exponencial en todos los niveles de glucosa (fig.4.6). La expresión utilizada fue análoga a la de aumento de biomasa, siendo su solución de la forma:

$$\ln L = \ln L_0 + k_L t \quad (3.20)$$

Donde L_0 es la longitud inicial de la hifa, apenas se hace visible, y depende del tiempo mediante una constante específica de elongación (k_L), asociada directamente, de esta manera, con el cambio de biomasa, es decir, con μ . Se observó experimentalmente (fig. 4.9) que el coeficiente de la exponencial (k_L) estaba influenciado por la concentración inicial de glucosa, dado que se observaron diferentes tasas de elongación para cada uno de los niveles utilizados, quedando al graficar estos valores una curva típica de una cinética tipo Monod, lo cual puede ser expresado por analogía como:

$$k_L = \frac{k_{max} S}{(K_s + S)} \quad (4.1)$$

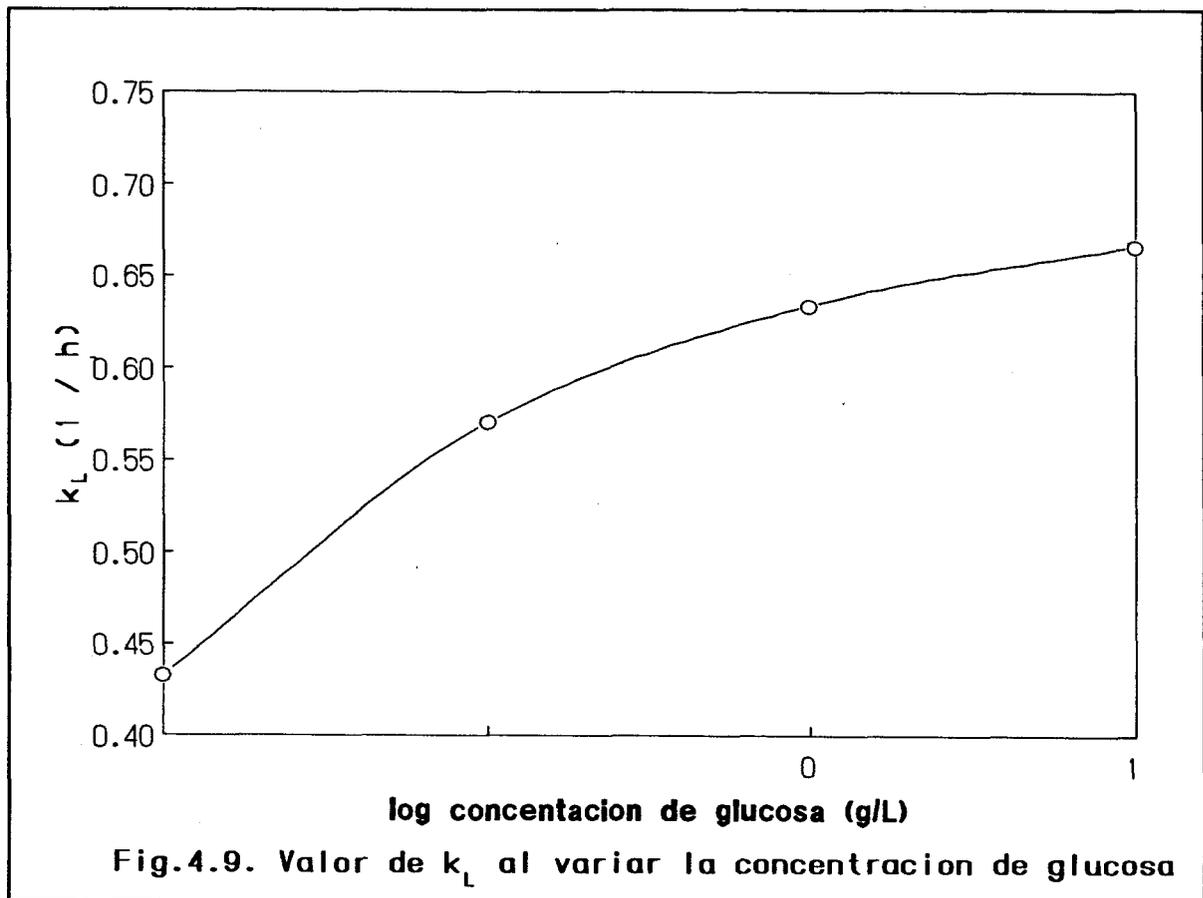
Estando además relacionada k_L , con la velocidad máxima de elongación (V_{max}), y la longitud máxima de la hifa principal (L_e) (Trinci, 1971) por:

$$k_L = \frac{V_{max}}{L_e} \quad (4.2)$$

Con los datos de elongación del túbulo germinal (fig.4.6) se procedió a realizar el ajuste con la ecuación 3.20, para encontrar

el valor de la k_L para cada uno de los niveles de glucosa estudiados, siendo el coeficiente de correlación de 0.93 para la concentración mas baja y mayores de 0.95 para las demás. Se aprecia (fig. 4.9) que la curva obtenida corresponde, efectivamente, al caso de una cinética tipo Monod con un valor máximo asintótico (k_{max}) de 0.673, correspondiendo a la concentración de sustrato mas alta utilizada.

Introduciendo el valor de k_{max} obtenido en la expresión de Monod (ec.4.1) y minimizando la suma de los cuadrados del error, el valor de K_s fue de $5.5 * 10^{-3} \text{g/L}$ ($31 \mu\text{M}$), valor que indica que el transporte de glucosa es de alta afinidad (Schulte y Scarborough, 1975). Es decir, para su introducción a la espora existe un sistema de transporte activo en la pared. Los valores para cada concentración se muestran en la tabla 4.7.3 .



Insertando el valor obtenido en la ecuación 4.2 se calcula la velocidad máxima de elongación (V_{max}). Las longitudes máximas alcanzadas, para cada nivel de glucosa así como V_{max} se muestran en la tabla 4.7.3. Se debe notar que la constante k_L y V_{max} son parámetros microscópicos, teniéndose de esta manera una aproximación mas fiel al evento de germinación. Es preciso señalar que con el dato de volumen de la hifa, número de hifas por unidad de volumen y densidad del micelio puede calcularse la cantidad de biomasa presente, tal y como sugiere el trabajo de Packer y col. (1992).

El parámetro Q_a (tasa específica de aumento de área) se obtiene utilizando la relación propuesta por Bartnicki-García y col.(1989), la cual considera que el aumento de área se encuentra determinado por la función cotangente del ángulo que se forma, tomando el eje axial de base y el spitzenkörper como punto de apoyo, entre el eje y el punto donde comienza el domo que dibuja la punta hifal, además de considerar la velocidad de desplazamiento del spitzenkörper y el diámetro de la hifa, de tal manera que la expresión es la siguiente:

$$Q_a = 2 \Pi V_{max} D_{hifa}$$

Este resultado va a indicar directamente la cantidad de pared sintetizada, lo cual va a estar relacionado con el área de trasporte de la hifa, de tal manera que esta área va a poder ser ajustada variando la velocidad de elongación o el diámetro de la hifa.

Tabla 4.7.3. Parámetros de crecimiento en función del nivel de glucosa inicial.

Concentración (g/L)	0.01	0.1	1	10
μ (h^{-1})	0.017	0.08	0.30	---
k_L (h^{-1})	0.43	0.57	0.63	0.67
Longitud máx (μm)	92	110	130	116
Velocidad máx ($\mu m/h$)	40	63	82	78
Q_a ($\mu m^2/h$)	754	1267	1700	1764

Puede apreciarse la diferencia que existe entre las tasas específicas de crecimiento y de elongación, diferencia que teóricamente no debería existir, o que debería estar relacionada por alguna constante, dado que un aumento en el volumen de la hifa significa un aumento proporcional en la biomasa. Este resultado está indicando que la proteína no es el compuesto de la biomasa que aumenta en mayor proporción, por lo que su aumento no refleja los cambios observados en longitud y volumen.

El medio con 10 g/L presentó una longitud máxima menor que el de 1 g/L, lo cual no significa que se halla obtenido menor biomasa, pues, al igual que en el caso de la figura 4.6.1, el volumen fue mayor en 10 g/L debido a que el diámetro de hifa fue ligeramente mayor. Esto parece indicar que existe una longitud máxima posible, y que si existe la posibilidad de una mayor síntesis de biomasa, esto lo hace variando el diámetro de la hifa. Este ajuste está relacionado con la razón área/volumen de la hifa, pues a menor diámetro, mayor área expuesta de hifa, resultado que concuerda con el hecho de que a menor concentración de glucosa menor diámetro, es decir, mas superficie receptora de sustrato.

Prácticamente se tiene la misma velocidad máxima de elongación para los 2 niveles mas altos, lo cual indica que, a 1 g/L se ha alcanzado la velocidad máxima de aprovechamiento de los sustratos, esto es, el paso controlante de las reacciones de crecimiento va a ser la capacidad de transporte activo de sustrato por la hifa y/o su conversión en precursores, y no la concentración en el medio. Es importante observar que, sin embargo, el diámetro de la hifa si aumenta, siendo este el mecanismo utilizado por la hifa para aumentar de volumen cuando ha llegado a una velocidad límite de elongación.

Un parámetro muy importante dada la información que proporciona es la tasa de aumento de área (Q_a), la cual va a estar indicando directamente la razón de crecimiento de la pared de la hifa, siendo esta una medida directa de la síntesis de vesículas. Se puede

apreciar en la figura 4.10 que la Q_0 presenta un comportamiento análogo a lo observado con la k_L , es decir, la inserción de pared es un fenómeno que presenta saturación.

4.7.2 Cinéticas de consumo de glucosa y de oxígeno.

Los ajustes de las expresiones para consumo de glucosa y de oxígeno fueron realizados para el medio con 1 g/L, dado que en éste fue donde se presentó el comportamiento exponencial de estas variables.

El consumo de glucosa, mostrado en la figura 4.2, puede ser descrito por la ecuación 3.12, cuya solución se muestra en la ec.3.15, y si se considera que no se gasta sustrato en el mantenimiento, el resultado es el siguiente:

$$\frac{S_f}{S_0} = 1 - \frac{x_0}{Y_{cel}} \left[e^{k_c t} - 1 \right] \quad (4.3)$$

Con esta expresión se estimó, minimizando la suma de los cuadrados del error, el valor para k_c , la tasa específica de crecimiento calculada por el consumo de sustrato. Esta tiene un valor de 0.45 h^{-1} , el cual es mayor que el calculado por proteína. Su comparación se muestra en la tabla 4.7.4.

Para el oxígeno se tiene que la ecuación 3.18 describe su consumo, el cual va a estar directamente relacionado con el consumo de glucosa y con la tasa específica de crecimiento, de la siguiente manera:

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{DBO \ x_0}{Y_{cel}} e^{k_o t} \quad (4.4)$$

Con esta expresión, aplicando la operación de logaritmo natural, podemos conocer el valor para k_o , el cual va a ser la pendiente de la recta que resulta de graficar $\ln (dO_2/dt)$ vs tiempo. Se obtiene un valor de 0.48, con un coeficiente de correlación de 0.98 .

Se realizó la comparación entre los coeficientes de las exponenciales de las curvas de proteína (μ), respiración (k_o), consumo de glucosa y longitud (k_L) para el medio de 1 g/L de glucosa inicial, para comparar los valores de las tasas específicas de crecimiento obtenidas y el grado de acoplamiento que hay entre éstas actividades, encontrándose los valores que se muestran en la tabla 4.7.4.

Tabla 4.7.4 Tasas específicas de aumento de biomasa en función de la proteína, respiración, consumo de glucosa y longitud del túbulo germinativo. Medio con 1 g/L de glucosa inicial.

Proteína (h^{-1})	Longitud (h^{-1})	Respiración (h^{-1})	Consumo gluc. (h^{-1})
0.30	0.63	0.48	0.45
μ	k_L	k_o	k_g

Se puede apreciar que la tasa específica de crecimiento tradicional, calculada de proteína, es la que presenta el valor mas bajo, lo cual indica que la síntesis de biomasa es el proceso más lento. Los valores para k_g y k_o son muy parecidos, lo cual indica que tienen la misma tasa de utilización, es decir, no se tiene un consumo importante de las reservas endógenas, y que el sustrato captado del medio es utilizado inmediatamente. El valor de k_L resultó ser el mas alto, lo cual indica que el aumento de longitud de la hifa es el evento en el que puede detectarse cambio mas rápidamente, siendo además, el mas sencillo de obtener experimentalmente.

El que la longitud varíe mas rápidamente que la respiración y que el consumo de glucosa está indicando que la relación entre:

consumo de sustrato \longrightarrow *síntesis de precursor* \longrightarrow *Inserción en pared*

no es lineal, lo que significa que el tiempo de duplicación de la longitud es menor que los tiempos de duplicación de la tasa de respiración y de la tasa de consumo de sustratorespiración y lo cual

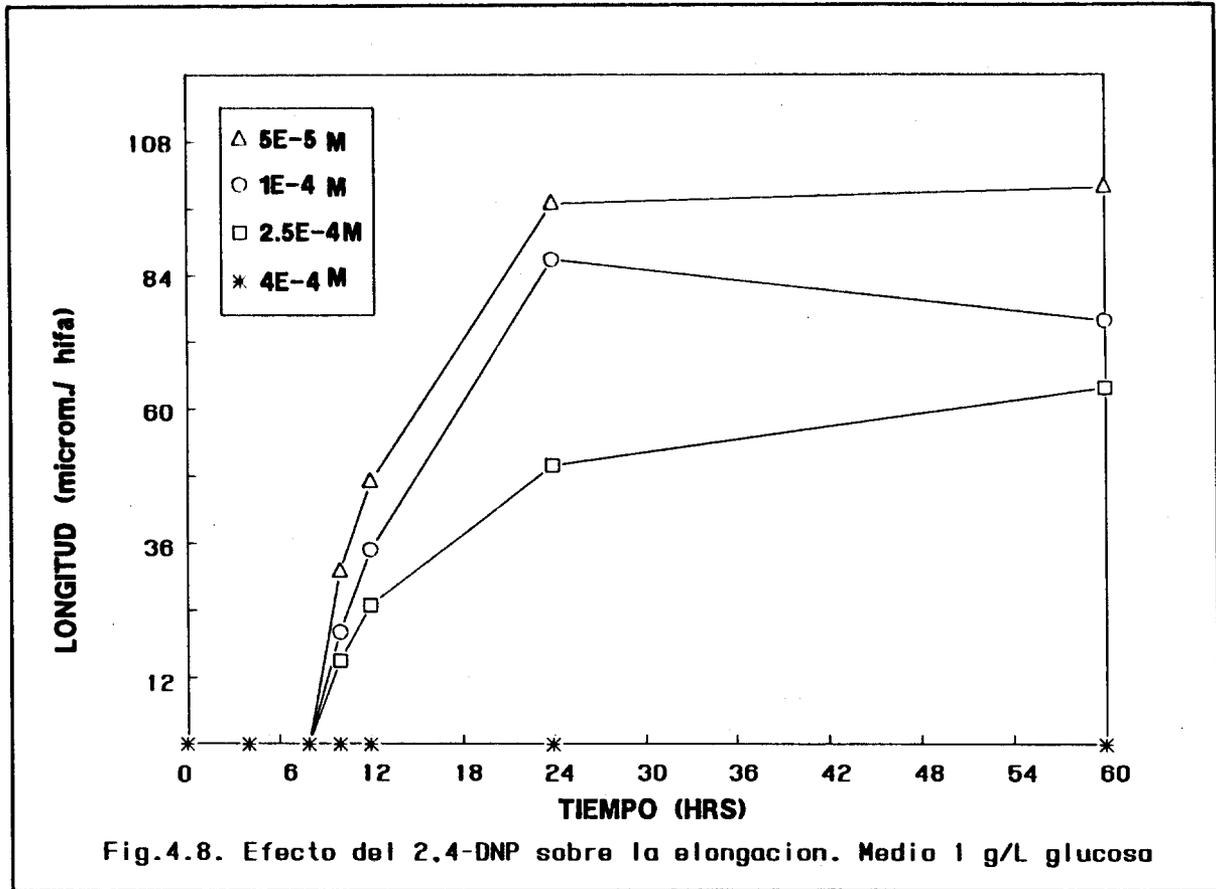
puede ser explicado mediante el esquema propuesto por Grove y Bracker (1970), que establece que los precursores de la pared son sintetizados en el retículo endoplásmico, además de las enzimas necesarias para la inserción de éstos en la pared ya creada. Enzimas y sustratos son, de alguna manera, empaquetados (vesículas) y transportados hacia la punta de la hifa. A cierta distancia del ápice (característica de cada especie) existe una región (*Spitzenkörper*) en donde son acumuladas éstas vesículas, las cuales, al alcanzar una concentración límite, son enviadas a la punta para provocar su elongación. Esto significa que el tiempo que transcurre sin aparecer el túbulo es utilizado en la acumulación de los precursores (Bartnicki-García, 1989), por lo que siempre existe una reserva de ellas, y pueden ser lanzadas, por un período de tiempo, a un ritmo mayor del que son sintetizadas.

4.8 Efecto del 2,4-Dinitrofenol en la elongación.

Dado que el objetivo de este trabajo era el de estudiar el acoplamiento energético en la germinación, se pensó el utilizar una sustancia bien conocida por ser un agente desacoplante de la fosforilación oxidativa (2,4-Dinitrofenol ó DNP) para con esto observar sus efectos sobre la cinética de germinación, basándonos en la evidencia bibliográfica (Yanagita, 1957) de que la germinación es un proceso aerobio.

Se realizó el seguimiento de la elongación del túbulo germinativo a diferentes concentraciones de DNP, en medio con 1 g/L de glucosa inicial, utilizando solución amortiguadora de citrato-fosfato pH 5, para evitar que la inhibición estuviera dada por el pH inicial, dado que el DNP provocaba un pH excesivamente bajo en el medio, llegando a valores de alrededor de 1.5 para la concentración de DNP 1 mM.

Como lo muestra la figura 4.8, la germinación fue totalmente inhibida a una concentración superior a $2.5 \cdot 10^{-4}$ M. A esta concentración la longitud máxima alcanzada fue de 60 μm , y a la concentración inmediata inferior ($1 \cdot 10^{-4}$ M) el túbulo alcanzó una longitud de 84 μm , y ahí se detenían, sin que se llegara a ver ramificación en ninguna de éstas concentraciones.



Para las curvas de elongación se procedió a aplicar la ecuación 3.20 para encontrar los valores de los coeficientes de ajuste, los cuales resultaron ser sumamente bajos, presentándose a continuación en la tabla 4.8.1:

Tabla 4.8.1 Coeficiente de ajuste y longitud máxima a diferentes concentraciones de 2,4-DNP. Medio 1 g/L de glucosa inicial.

		Concentracion de 2,4-Dinitrofenol (M)			
		5 E-5	1 E-4	2.5 E-4	4 E-4
k_L	(h^{-1})	0.019	0.020	0.020	---
L.máx	(μm)	100	76	64	0
%Germ.		84	68	45	0

Como se puede notar, el parámetro que más se afecta es la tasa

específica de elongación (kl), la cual tiene valores aproximadamente 20 veces más bajos que en el caso normal sin DNP, lo cual parece estar indicando que las reacciones de síntesis de precursores están bloqueadas, por lo que para observar un aumento en el tamaño del túbulo se requiere de un tiempo considerable.

Este bloqueo de las rutas biosintéticas está de acuerdo con el efecto reportado para esta sustancia, la cual impide que el ATP sea generado, privando de esta manera de energía a la célula.

Sin embargo, se puede apreciar que la longitud final alcanzada es comparable con la obtenida para el caso de los niveles de glucosa mas bajos sin desacoplante, lo cual indica que el fenómeno que se ve más afectado es, de manera global, la velocidad de síntesis de los precursores de la pared, dado que el material sintetizado si alcanza para lograr elongarse de manera apreciable, pero ésto se realiza muy lentamente. El porcentaje final de germinación fue, igualmente, menor que el caso de medio 1 g/L de glucosa sin DNP, presentándose un efecto análogo al haber utilizado un medio con menor cantidad de glucosa que la utilizada.

En todos los niveles de DNP utilizados la germinación sufrió un retraso de aproximadamente 10 horas, y la tasa de respiración fue muy baja o no se pudo detectar dentro de las primeras 24 horas, lo cual está en contradicción con el efecto de aumento de la tasa de respiración establecido para este desacoplante (Tempest y Neijssel, 1984). El motivo de esto no pudo ser determinado, pero pudiera ser explicado por el hecho de que la respiración tuviera un retraso aún mayor, y no se tomaran lecturas al tiempo en que ésta se presentó.

Como conclusión se puede decir que el agente desacoplante sí afecta a la germinación, retrasándola e impidiendo que se alcance la longitud de túbulo normal. Aún la concentración mas baja de DNP no permitió que se llevaran a cabo las primeras ramificaciones, lo cual indica que ya no hubo energía para sostener este evento. El hecho de no haber observado el aumento en la tasa de respiración ni una caída

Capítulo 4. Resultados y discusión.

importante en la concentración de glucosa del medio pudo deberse a que estos efectos se presentaron muy tarde, en el tiempo en que ya no se midieron estos parámetros.

129830

C A P I T U L O 5

C O N C L U S I O N E S

Conclusiones

La germinación, si bien es considerada como la fase de retardo en el crecimiento de los hongos filamentosos, puede ser estudiada en mas detalle. Dado que la fase de retardo se caracteriza por presentar cambios bioquímicos mínimos o muy sutiles, y casi ningún cambio en el número de células presentes, realizar su seguimiento mediante cambios en la composición del medio resulta ser un trabajo que requiere de métodos analíticos sensibles, dadas las posibilidades de error experimental que se presentan.

Una de las formas utilizadas para cuantificar la germinación de una población de esporas es el conteo directo, con cámara de Neubauer (Yanagita, 1957; Barrios González y Anaya, 1987). Esta aproximación permite conocer el porcentaje de la población que rompe exitosamente la latencia, pero no se puede obtener mayor información.

El evento de más fácil visualización es el surgimiento y elongación del túbulo, por lo que se decidió tratar de correlacionar este cambio con lo observado en el medio, es decir, con la desaparición de la glucosa y la tasa de respiración. Esto podría aportar mayor información sobre el grado de acoplamiento energético que se presenta en ésta etapa del desarrollo de *Aspergillus niger*.

La primera conclusión es que, tal y como se esperaba, la composición del medio influye de manera determinante en el porcentaje y cantidad de biomasa final de las esporas, observándose una disminución de estas variables en forma proporcional a la cantidad de glucosa en el medio. La concentración utilizada mas baja que permitió que el 100% de la población germinara fue de 1 g/L, es decir, en este nivel la concentración de sustrato externo no fue el factor limitante del crecimiento, siendo por este mismo hecho que no fue el medio que presentó el mayor rendimiento.

Se puede concluir que, al igual que sucede con el crecimiento

vegetativo, limitar la fuente de carbono provoca un cambio en el metabolismo de las esporas, pudiéndose observar una utilización mas eficiente del sustrato carbonado. Esto se refleja en los factores de rendimiento de la glucosa obtenidos, los cuales aumentan al disminuir la concentración inicial de sustrato, siendo el mayor para el medio con 0.01 g/L. El nivel anterior utilizado (0.001 g/L) fue demasiado bajo, y solamente permitió que germinara a lo mas un 5% de la población, en el mejor de los casos.

Al utilizar un agente químico desacoplante (DNP) con la idea de inducir el desacoplamiento energético no se pudo observar el aumento en la tasa de respiración. El efecto mas notable fue el retraso relativo (12 vs 6 h) de la aparición del túbulo germinativo y, por consiguiente, un valor de la tasa específica de elongación muy bajo (1% del valor sin usar DNP), esto es, el desacoplante provocó que el transporte al interior de la hifa se viera muy disminuído, encontrándose que el sustrato casi no fue consumido las primeras doce horas, lo cual también podría explicar porque no fue detectada la respiración.

El fenómeno de transporte interfacial hacia la hifa fue muy lento posiblemente debido a alguno de los siguientes fenómenos: i) la captación de sustrato se realiza mediante un sistema de transporte activo, el cual utiliza ATP, por lo que la falta de generación de éste provoca que se retrase el proceso; ii) la molécula de DNP obstruye físicamente a los sistemas de transporte en la membrana al embeberse en ésta. Dado que es un sistema aerobio, el efecto del DNP es muy probable que fuera el largamente establecido de provocar desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, por lo que el efecto del retraso debió de deberse a este efecto, aunque la tasa de respiración observada fue despreciablemente pequeña, es probable que esto se debiera a que no se muestreo a tan largos tiempos.

Mediante el procesamiento de imágenes se pudo observar el efecto físico que provocaron los diferentes niveles de sustrato, siendo los mas fáciles de detectar el diámetro de la espora y la

longitud del túbulo. Esta última variable resultó ser muy útil, y dado que presentaba un comportamiento sigmoide, pudo calcularse su tasa específica de elongación (k_L) y comprobar que ésta tenía una dependencia con la concentración de sustrato del tipo de la cinética de Monod con saturación por sustrato, por lo que se obtuvo la constante de afinidad K_s , que presentó un valor que la define dentro del rango de sistema de alta afinidad para el transporte activo de sustrato, valor que concuerda con los datos publicados (Pirt, 1975), por lo tanto, el seguimiento de variables morfométricas permitió el cálculo de parámetros cinéticos, abriéndose así una simplificación a la obtención de los datos para monitorear el crecimiento de los organismos filamentosos. Con los datos morfométricos obtenidos también fue posible calcular la tasa de aumento de área (Q_a), la cual muestra la adaptación del micelio a la concentración del medio mediante el ajuste del área de transferencia de la hifa.

Las posibilidades del procesamiento de imágenes son enormes, y en este trabajo se pretendió la introducción a esta nueva técnica, a la vez que se abordó un aspecto del crecimiento de los micelios que no presenta grandes cambios bioquímicos y por lo mismo es difícil y tedioso de seguir: la germinación. Además se calcularon los factores de rendimiento para esta etapa, lo cual, si bien algunos autores presentan datos que sugieren que poseen los elementos para calcularlos (Yanagita, 1957), no lo hacen, por lo que, en ese sentido, esta información es novedosa. Desde el punto de vista metodológico se nota que por su naturaleza, métrica, esta técnica es confiable, pudiéndose utilizar los datos obtenidos en el desarrollo de modelos macro y microscópicos de los procesos, así como en la estimación de sus parámetros, como es el caso de la cinética de Monod utilizada en este trabajo.

A1. Cuantificación de azúcares reductores por el método del TPTZ.
(Avigad, 1968).

Reactivo A: Solución de ferricianuro de potasio.

Solución 0.7 M de $K_3Fe(CN)_6$, utilizando como diluyente una solución 10 mM de NaOH con un 2% de $NaCO_3$.

Reactivo B: Solución de cloruro férrico.

Solución 2 mM de $FeCl_3$ utilizando como diluyente una solución ácido acético 5 M que es 0.2 M de ácido cítrico y 2 M de acetato de sodio.

Reactivo C: Reactivo de TPTZ.

Solución 2.5 mM de 2,4,6-tripiridil-s-triazina diluido en ácido acético 3 M.

Metodología:

A 1 mL de muestra que contenga entre 2-100 nmoles de azúcar reductor se le añade 1 mL del reactivo A y se pone a baño maría por 10 minutos; sin dejar enfriar se añaden 1 mL de B y 2 mL de C, se agita bien, se mantienen 5 minutos en la obscuridad, y se lee la absorbancia a 595 nm. La curva patrón se realiza de $3 \cdot 10^{-4}$ a $7 \cdot 10^{-3}$ g/L de glucosa.

A2. Cuantificación de proteína : Lowry doble.

(Lowry y col., 1951)

Reactivo A: Solución de $CuSO_4$ al 2 %.

Reactivo B: Solución de tartrato de sodio y potasio al 4 %.

Reactivo C: Solución de $NaCO_3$ al 4 % en NaOH 0.2 N.

Reactivo D: Se prepara mezclando, en el momento de que vaya a ser utilizada, 0.5 mL de A y 0.5 mL de B con 50 mL de C.

Reactivo E: El reactivo de Folin-Ciocalteau se diluye 1:1 con agua destilada al momento de ser utilizado.

Metodología:

Se realiza un pretratamiento a la muestra que consiste en diluirla 1:1 con una solución de NaOH 0.2 N y colocar a baño maría por 10 minutos. Se toma 1 mL de la muestra pretratada y se le agrega 1 mL del reactivo D, se deja reposar en la obscuridad durante 10 minutos; se añaden 0.2 mL del reactivo E, se agita vigorosamente y se deja reposar durante 30 minutos en la obscuridad para que se desarrolle el color. Se lee absorbancia a 750 nm. La curva patrón se prepara con albúmina sérica bovina, a una concentración entre 0.01 a 0.1 g/L en NaOH 0.1 N.

A3. Procesamiento de imágenes.

Se lleva a cabo utilizando el programa IMAGENIA 2000 de Biocom, instalado en una computadora personal Vectra QS/20 de Hewlett Packard, y con un microscopio óptico marca Zeiss con una cámara fija de circuito cerrado Sentinel blanco y negro, y un monitor de video a color marca Acer; se realizan las mediciones observando por el objetivo 10X, calibrando la escala con una cámara de Neubauer. Se toman muestras a cada uno de los tiempos y se les agrega una solución fijadora (1:1) para detener el metabolismo. También pueden teñirse con azul de lactofenol para resaltar los túbulos y facilitar las mediciones. Las variables de interés fueron diámetro de espora y diámetro y longitud de hifa.

Solución fijadora (Packer y Thomas, 1990)

Formaldehído al 40 %.....13 mL.
Acido acético glacial.....5 mL.
Etanol al 50 %.....200 mL.

Azul de lactofenol:

Fenol.....20 g.
Acido láctico.....20 mL.
Glicerina.....40 mL.
Azul de anilina..... 0.5 g.
Agua destilada.....40 mL.

Solución teñidora:

1.1 mL de azul de lactofenol en 9.2 mL de solución fijadora

BIBLIOGRAFIA

- Avigad, G. (1968). CARBOHID. RES. 7, 94. In Methods in enzymology. Vol XLI, part B. Editor W.A. Wood. Edit. American Press, USA, 1975.
- Aynsley, M.; Ward, A.C. & Wright, A.R. (1990). A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. BIOTECH. BIOENG. 35, 820-830.
- Bailey. J.E. & Ollis, D.F. BIOCHEMICAL ENGINEERING FUNDAMENTALS. 2a. ed. Editorial McGraw Hill B.C. Singapur, 1986
- Barnes, M. & Parker, M.S. (1966). The increase in size of mould spores during germination. TRANS. BR. MYCOL. SOC. 49 (3): 487-494.
- Bartnicki, S.; Hergert, F.; Gierz, G. (1989). A Novel Computer Model for Generating Cell Shape: Application to Fungal Morphogenesis, In Biochemistry of cell walls and membranes in fungi, Kuhn et al Eds. Springer-Verlag.
- Barrios-González, J.; Anaya, S. (1987). Desarrollo de un sistema para el estudio de la germinación de esporas de *Aspergillus niger*. REV MEX MIC, (3), 9-18.
- Barrios-González, J. et. al. (1989). Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. BIOTECH. LETTERS, 11(8), 551-554.
- Brambl, R.M. (1975). Characteristics of developing mitochondrial genetic and respiratory functions in germinating fungal spores. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA. 396, 175-186.
- Brambl, R.M. & Van Etten, J.L. (1970). Protein synthesis during fungal spore germination. part V. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 137, 442-452.
- Brambl, R.M. & Handschin, B. (1976). Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: products of mitochondrial protein synthesis in vivo. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 175, 606-617.
- Campbell, C.K. (1971). Fine structure and physiology of conidial germination in *Aspergillus fumigatus*. TRANS. BR. MYCOL. SOC. 57(3):393-402
- Crook, E.M. & Johnston, I.R. (1962). The qualitative analysis of the cell walls of selected species of fungi. BIOCHEM. J. 83, 325-331.
- Edelstein, L. (1982). The propagation of fungal colonies: A model for tissue growth. J. THEOR. BIOL. (98), 679-701.
- Edelstein et. al. (1983). A model for fungal colony growth applied to *Sclerotium rolfsii*. J. GEN. MICROBIOL. (129), 1873-1881.
- Florance, E.R.; Denison & Allen. (1972). Ultrastructure of dormant and germinating conidia of *A. nidulans*. MYCOLOGIA 69, 115-123.

- Georgiou, G. & Shuler, M. (1986). A computer model for the growth and differentiation of a fungal colony of solid substrate. *BIOTECH. BIOENG.*, (28), 405-416.
- Gray, D.; Gooday, G; Prosser, J. (1990). Apical hyphal extension in *Streptomyces coelicolor*. *J.GEN.MICROB.* (136), 1077-1084.
- Grove, S. & Bracker, C. (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: Vesicles and spitzenkorper. *J.BACT.* (104):2, 989-1009.
- Harder, W. & Dijkhuizen, H. (1983). Physiological responses to nutrient limitation. *ANN.REV.MICROBIOL.* (37), 1-23.
- Hollomon, D.W. (1970). Ribonucleic acid synthesis during fungal spore germination. *J.GEN.MICROBIOL.* 62, 75-87.
- Johnston, I.R. (1965). The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *BIOCHEM.J.* 96(3): 651-658.
- Johnston, I.R. (1965). The partial acid hydrolysis of a highly dextrorotatory fragment of the cell wall of *A niger*. *BIOCHEM.J.* 96(3): 659-664.
- Koch, A. (1975). The kinetics of mycelial growth. *J. GEN. MICROBIOL.* (89), 209-216.
- Koch, A. (1892). The shape of the hyphal tips of fungi. *J. GEN. MICROBIOL.* (128), 947-951.
- Laskin, A. & Lechevalier, H. (1973). *HANDBOOK OF MICROBIOLOGY*. Vol I. Ed. CRC.Press. USA
- Lehninger, A (1975). *BIOENERGETICA*. Edit. Fondo Educativo Interamericano S.A., México.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). *J. BIOL. CHEM.* 193, 265-275.
- 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. *BIOTECHNOL.BIOENG.* 38, 353-362.
- Ohmori, K. & Gottlieb, D. (1965). Development of respiratory enzyme activities during spore germination. *PHYTOPATHOLOGY* 55, 1328-1336.
- Oriol, E. (1987). Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau et de l'activité de l'eau. These de doctorat nouveau régime. Microbiologie. INSA de Toulouse.
- Oriol, E.; Contreras, R.; Raimbault, M. (1987). Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of *A. niger*. *BIOTECH. TECH.* (1):2, 79-84.

- Packer, H.L. & Thomas, C.R. (1990). Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. **BIOTECHNOL.BIOENG.35, 870-881.**
- Packer, H.L.; Thomas, C.R.; Kerhavarz-Moore, E. & Lilly, M.D. (1992). Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis. **BIOTECH. BIOENG. 39, 384-391.**
- Pirt, S.J. **PRINCIPLES OF MICROBE AND CELL CULTIVATION. 1a.ed. Edit. Blackweel Scientific Publications. USA, 1975.**
- Prosser, J.& Trinci, A.P.J. (1979). A model for hyphal growth and branching. **J.GEN.MICROBIOL. (111),153-164.**
- Roussos, S. (1987) Croissance de *T.harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thésés pour l'obtention du grade de docteur es scienses naturelles. Université de Provence.
- Saucedo Castañeda, G.; Gutierrez Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M. & Viniegra González, G. (1990). Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. **BIOTECH. BIOENG. 35, 802-808.**
- Saunders, P.& Trinci, A.P.J. (1979). Determination of tip shape in fungal hyphae. **J .GEN.MICROBIOL. (110),469-473.**
- Shulte & Scarbourough. (1975). Characteristics of the glucose transport systems in *Neurospora crassa sl.* **J. BACTERIOL. 1076-1080.**
- Sheperd, C.J. (1975). Changes occurring in the composition of *Aspergillus nidulans* conidia during germination. **J. GEN. MICROBIOL. 16:i.**
- Tempest,D. & Neijssel, O. (1984). The status of YATP and maintenance energy as biologically interpretable phenomena. **ANN.REV.MICROBIOL. (38),459-486.**
- 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. **J. GEN. MICROBIOL. 67. 325-344.**
- Trinci, A.P.J. & Saunders, P. (1977). Tip growth of fungal hyphae. **J. GEN. MICROBIOL. (103), 243-248.**
- Tsuchiya, H.M.; Fredrickson, A.G. & Aris, R. (1966) . Dynamics of microbial cell populations. **ADV. CHEM. ENG.,6, 125-206.**
- Van Etten, J.L. & Brambl, R.M. (1968). Protein synthesis during fungal spore germination.part II. **J.BACTERIOL. 96 (4) : 1042-1048.**
- Van Etten, J.; Dahlberg, K.; Russo, G. (1984). Fungal spore germination. In *Mycology series, fungal differentiation: A contemporary synthesis.* Eds. J.E.Smith. Ed.Marcel Dekker Inc. 235-266.

-Van Etten, J.L.; Koski, R.K. & El-Olemy, M.M. (1969). Protein synthesis during fungal spore germination. part IV. *J.BACTERIOL.* 100 (3): 1182-1186.

-Van Etten, J.L.; Roker, H.R & Davies, E. (1972). Protein synthesis during fungal spore germination. part IV. *J.BACTERIOL.* 100 (3): 1182-1186.

-Viniegra González, G.; Saucedo Castañeda, G.; López Isunza, F. & Favela Torres, E. Symmetric branching model for the kinetics of mycelial growth. Por publicarse.

-Weber, D.; Hess, W. (1976). The fungal Spore. Form and function. Edit. J. Wiley & Sons. U.S.A.

-Wieble, M.G. & Trinci, A.P.J. (1991). Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. *BIOTECHNOL.BIOENG.* 38, 75-81.

-Yanagita, T. (1957). Biochemical aspects on the germination of conidiospores of *Aspergillus niger*. *ARCH. MIKROBIOL.* 26, 329-344.

-Yang, H.; Reichl, U. & Gilles, E.D. (1992). Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms. *BIOTECH. BIOENG.* 39, 44-48.