



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTIVIDAD PECTINOLITICA EN ESPORAS Y  
MICELIO DE *Aspergillus* EN DIFERENTES  
ETAPAS  
DE DESARROLLO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA  
SALDAÑA DÍAZ BLANCA LILIA**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**     **Profesor:** José Guillermo Aguilar Osorio

**VOCAL:**           **Profesora:** María del Pilar Granada Macias

**SECRETARIO:**   **Profesora:** Maricarmen Quirasco Baruch

**1er. SUPLENTE:** **Profesora:** Martha Giles Gómez

**2° SUPLENTE:**   **Profesora:** María del Carmen Urzua Hernández

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos. Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E, laboratorio 312. Facultad de Química.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

Dr. José Guillermo Aguilar Osorio

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Maestro en Ciencias Carlos Eduardo Gómez Sánchez

**SUSTENTANTE:**

---

Saldaña Díaz Blanca Lilia

El presente trabajo se desarrollo con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Proyecto N° IN209007.

## **Agradecimientos**

A mis padres Blanca Díaz y Alberto Saldaña por haberme dado la vida, su infinito amor y por supuesto el gran apoyo que me dieron en todos los momentos difíciles que he atravesado, les dedico este trabajo que es el primer fruto de su esfuerzo por darme una mejor vida, todo se lo debo a ustedes. Gracias por todo.

Al amor de mi vida mi hermosa hija Fátima, por ser la luz y la alegría de mis días, gracias por enseñarme una nueva forma de amar, por darme esa paz y tranquilidad cuando estoy a tu lado. Te amo.

A mis hermanos Norma, Alberto y su esposa quienes me han ayudado a salir adelante, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Ustedes saben que no lo hubiera logrado sola.

A mi abuelita, a cada una de mis tías, tíos y primos por comprenderme y apoyarme tanto ¡Muchas Gracias ¡

En especial mi agradecimiento infinito al Doctor Guillermo Aguilar Osorio por sus enseñanzas a lo largo de este trabajo.

Mis queridos amigos como olvidarme de ustedes, si gracias a que los conocí me tarde tanto en terminar, Jajaja; saben que no es cierto; les agradezco tanto a cada uno de ustedes por estar en los momentos que más necesite apoyo, por compartir su tiempo en esos maratónicos juegos, viajes, por todas esas “educativas” charlas, y por muchas cosa más; gracias Raúl, David, Mónica, Paola, Paty, Arturo, Ceci, Pablito, Mela, Javier, Maya, Brenda

Wendy, Carla, Lucia, Josefina, Fidel, Aurorita, Gaby, Luis, Natalia, Claudia, Zaragoza; por ser tan maravillosas personas.

A los amigos que encontré al final de mi camino; Carlos y Ruth gracias por brindarme no sólo sus conocimientos sino su inestimable amistad.

## CONTENIDO

<b>CAPITULO I</b> .....	- 8 -
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	- 8 -
<b>CAPITULO II</b> .....	- 10 -
<b>2. JUSTIFICACION E HIPOTESIS</b> .....	- 10 -
2.1. OBJETIVOS .....	- 11 -
2.1.1. Objetivo general .....	- 11 -
2.1.2. Objetivos específicos .....	- 11 -
<b>CAPITULO III</b> .....	- 12 -
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	- 12 -
3.1. Estructuras reproductoras de los hongos .....	- 12 -
3.2. Generalidades sobre la germinación conidial .....	- 16 -
3.2.1. Composición de las conidias .....	- 16 -
3.2.2. Estado de latencia .....	- 17 -
3.2.3. Germinación conidial.....	- 18 -
3.3. Pectinasas.....	- 26 -
3.4. Regulación y represión catabólica de biosíntesis de enzimas.....	- 28 -
3.5. Género <i>Aspergillus</i> .....	- 31 -
<b>CAPITULO IV</b> .....	- 33 -
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	- 33 -
4.1. Microorganismos.....	- 33 -
4.2. Desarrollo del inóculo .....	- 33 -

4.3. Conteo de esporas.....	- 34 -
4.4. Medios y condiciones de cultivo .....	- 35 -
4.4.1. Medio sólido.....	- 35 -
4.4.2. Medio líquido .....	- 35 -
4.5. Germinación de esporas.....	- 36 -
4.6. Determinación de biomasa.....	- 37 -
4.7. Ruptura celular .....	- 37 -
4.8. Determinación de la actividad exo – pectinolítica .....	- 38 -
4.9. Tinción de núcleos.....	- 38 -
<b>CAPITULO V .....</b>	<b>- 40 -</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>- 40 -</b>
5.1. Evaluación de la fuente de carbono y nitrógeno: .....	- 40 -
5.2. Cinética de la germinación conidial .....	- 47 -
5.3. Determinación del crecimiento celular.....	- 53 -
5.3.1. Efecto de la fuente de carbono en diferentes cepas de Aspergillus.....	- 56 -
5.4. Evaluación de la actividad exo – pectinolítica.....	- 64 -
5.5. Tinción de núcleos.....	- 67 -
<b>CAPITULO VI .....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>6. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>CAPITULO VII .....</b>	<b>- 77 -</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>- 77 -</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>- 78 -</b>

## **CAPITULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

La reproducción asexual es un tipo común de reproducción de los hongos filamentosos; este proceso también llamado germinación conidial, es crítico en el ciclo de vida de estos hongos debido a que las conidias son el medio primario de dispersión que fungen como “casa segura” para la protección del genoma en condiciones ambientales adversas.

Una vez que la conidia se encuentra en presencia de una fuente rica en nutrientes, se hincha rápidamente, comienza la reorganización del núcleo, cambia la pared celular provocando que las conidias se adhieran unas con otras; al mismo tiempo, el núcleo se duplica por mitosis, la hifa comienza a crecer, los núcleos se reorganizan y migran hacia el tubulo germinal el cual se elonga dando lugar al micelio (Osherov Nir y May Gregory, 2001). La germinación conidial se ve afectada cuando las conidias se exponen a diferentes fuentes de carbono, observándose que dicho proceso es más lento en presencia de monosacáridos y más rápido cuando se usan polisacáridos como nutrientes, en especial en la pectina; esta adaptación al crecimiento en materiales poliméricos, sugiere que la degradación de estos materiales es debida a la presencia de enzimas que los hidrolizan; algunas de las cuales son sintetizadas en respuesta a la presencia de inductores externos.

Las pectinasas o enzimas pectinolíticas, son producidas por diferentes microorganismos como los hongos, las bacterias, los insectos y las plantas que las utilizan para degradar (obtención de fuente de carbono) y/o modificar -en fruta madura- la compleja estructura de la pectina. Las pectinasas de origen

fúngico son ampliamente utilizadas tanto en la industria textil, la alimenticia, como en la maceración de tejidos vegetales y en la clarificación de jugos y de vinos (Victoria Acosta, 2007).

Dada la importancia económica que tienen las pectinasas y a la gran capacidad que presentan los hongos del género *Aspergillus* para producir y secretar enzimas pectinolíticas al medio de cultivo; así como la influencia que tiene éste en la transición del estado de latencia a la activación de las esporas, en este trabajo se analizó la presencia de enzimas hidrolíticas en las esporas y en el micelio, en diferentes etapas de la germinación conidial; así como la influencia de la fuente de carbono y nitrógeno sobre este fenómeno. Para ello se utilizaron diferentes especies de *Aspergillus*, las cuales se crecieron en medio líquido con fuentes de carbono sencillas, - glucosa, ácido galacturónico - y complejas, como la pectina, a diferentes concentraciones y variando la fuente de nitrógeno. Una vez que se determinó la mejor fuente de carbono y nitrógeno, se evaluó la actividad enzimática en diferentes etapas de la germinación para determinar si ambos fenómenos están asociados, y así tener una idea más clara acerca de cómo las conidias activan y mantienen las reacciones metabólicas necesarias para la germinación y la subsecuente formación de un nuevo organismo.

## **CAPITULO II**

### **2. JUSTIFICACION E HIPOTESIS**

La germinación conidial involucra la activación de una cascada de reacciones necesarias para el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo que se da en respuesta a la presencia de factores externos. En este sentido la variación de la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno tienen un efecto en la germinación conidial, en el rumbo metabólico que adopte la célula así como en la adecuación de los sistemas enzimáticos para detección, degradación y utilización de las fuentes nutritivas de que disponga; por lo que los niveles de actividad pectinolítica se pueden modificar durante esta etapa del ciclo reproductivo de los hongos filamentosos.

En este trabajo estamos interesados en analizar la presencia de enzimas hidrolíticas en las esporas y el micelio en diferentes etapas del desarrollo, así como la influencia de las fuentes de carbono sobre la germinación conidial.

## **2.1. OBJETIVOS**

### **2.1.1. Objetivo general**

Evaluar los niveles de actividad pectinolítica en extractos celulares tanto de micelio como de esporas de algunas especies de *Aspergillus* en diferentes etapas de germinación.

### **2.1.2. Objetivos específicos**

Evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en la germinación conidial y formación de micelio de diferentes especies de *Aspergillus*.

Seleccionar la mejor fuente de carbono y determinar su concentración óptima en el proceso de la germinación.

Observar la germinación conidial, así como los diferentes cambios físicos que se presentan durante esta etapa.

Evaluar la actividad pectinolítica en extractos intracelulares y extracelulares en micelio y espora.

Observar la organización de los núcleos durante la germinación conidial utilizando la técnica de tinción de núcleos.

## CAPITULO III

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Estructuras reproductoras de los hongos

La germinación conidial es una etapa esencial en el ciclo de vida de todos los hongos filamentosos, las conidias son menos susceptibles a condiciones ambientales adversas que el talo vegetativo, permitiendo a los hongos resistir condiciones desfavorables. Más importante aún, la conidia como unidad reproductiva, permite al hongo dispersarse largas distancias permaneciendo en estado de latencia hasta que se halle dentro de un ambiente rico en nutrientes para finalmente germinar en un nuevo organismo (Moore-Landecker, 1990).

Los hongos se pueden reproducir asexual y sexualmente. En algunas especies coexisten las dos formas de reproducción en el mismo organismo que se denomina entonces *halomorfo*. El *halomorfo* tiene a la vez una forma de multiplicación asexuada, *anaformo* o estado imperfecto, y una sexuada el *teleomorfo* o estado perfecto (Robertis, 1999).

La reproducción asexual es llevada a cabo por un hongo individual a través de una mitosis y la consiguiente división celular; no hay fusión de núcleos celulares; el objetivo de la reproducción asexuada o imperfecta es la proliferación y el mantenimiento de la especie. De acuerdo a la forma como se originan las estructuras asexuadas, se pueden dividir en tres grupos, las dos

primeras corresponden a la formación de conidias libres, mientras que la tercera es por medio de esporas internas, formadas dentro de una bolsa.

**1. Origen tálico o artrogènico:** se forman a partir de las hifas, como una fragmentación o desarticulación. Ejemplos característicos son: artroconidias, clamidoconidias y las macroconidias.

**2. Origen blástico:** se forman a partir de una célula madre, o bien de las propias hifas (fértil). Los ejemplos más importantes son: blastoconidias (gemaciones de levaduras), dictioconidias (poroconidias).

**3. Origen endogènico:** endosporas o esporangiosporas; son las únicas que se forman dentro de una bolsa o esporangio, es decir son células libres dentro de una bolsa, no están adheridas a otras estructuras. Son propias de los *Zygomycetes* como *Mucor*, *Rhizopus*, etc.

La reproducción asexual se puede ordenar también en base a la clasificación tradicional, que se fundamenta únicamente en su forma; ésta tiene la facilidad de reconocer de manera sencilla cada estructura, pero no brinda más información. De acuerdo a ello se identifican tres tipos:

**1. Talosporas o taloconidias:** conidias o esporas que se forman a partir de la hifa. Éstas se dividen a su vez en cinco grupos:

- **Artrosporas:** esporas que se forman de la fragmentación de las hifas. Por ejemplo: *Coccidioides immitis*, *Geotrichum candidum*, etc.

- **Blastosporas:** esporas que se forman por gemación, pueden ser únicas como el caso de *Cryptococcus neoformans*, o múltiples como *Paracoccidioides brasiliensis*.

- **Clamidiosporas:** esporas que se forman del engrosamiento de las hifas, son propias de los mohos y específicas de *Candida albicans*. No se

consideran formas de reproducción, sino de resistencia, porque generalmente nacen en condiciones adversas. Pueden ser terminales (*C. albicans*) o intercalares (*Mucor sp.*).

- **Dictiosporas:** son esporas multicelulares que se dividen tanto transversal como longitudinalmente (como una especie de red), son propias de algunos hongos dematiáceos (*Alternaria* y *Ulocladium*).

- **Aleurias o aleuriosporas:** son esporas que se forman de las hifas. El ejemplo más común es del grupo de los dermatofitos, sobre todo del género de *Trichophyton*.

**2. Conidias:** las que tiene su origen en estructuras especializadas (células conidiógenas) y no directamente de la hifa; por ejemplo nacen de conidióforos, esterigmas, vesículas, etc. Se dividen en dos subgrupos:

- **Microconidias** son unicelulares, se presentan de diferentes formas. Se encuentran en muchos hongos filamentosos o mohos como *Penicillium*, *Aspergillus*, etc.

- **Macroconidias** son pluricelulares, polimorfas y de mayor tamaño que las anteriores. Algunos hongos que las presentan son: *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Histoplasma capsulatum*.

**3. Esporangiosporas o endosporas:** sólo incluyen un grupo, las esporas que se encuentran dentro de una membrana o esporangio, cuando éstas alcanzan su madurez, la membrana se debilita y rompe, por lo que son liberadas. Algunos hongos que las presentan son *Mucor* y *Rhizopus* (Bonifaz, 2005)

La reproducción sexual o perfecta se caracteriza por la unión de dos núcleos que dan lugar a esporas sexuales, este tipo de reproducción se

lleva a cabo por tres procesos: plasmogamia (mediante la unión de dos protoplasmas), cariogamia (mediante la fusión de dos núcleos) y sobre todo por meiosis (mediante la fusión y reducción de dos núcleos, lo que da origen a dos células haploides). Los hongos para su reproducción sexual pueden ser heterotálicos, se requiere de la unión de dos talos (hifas) diferentes, y homotálicos hongos cuya reproducción perfecta necesita de un solo talo. Los organismos que crecen a partir de esporas sexuales poseen características genéticas de las dos cepas parentales. Algunos diferentes tipos de esporas sexuales son:

- **Zigosporas** se forman por la unión de dos hifas sexualmente diferenciadas, donadoras y receptoras, aunque morfológicamente iguales; una vez que se lleva a cabo la unión se inicia el fenómeno de plasmogamia que da lugar a la zigospora (cuerpos marrones o negros, con paredes gruesas que frecuentemente están cubiertos por espinas); del que posterior a la meiosis nace el nuevo hongo. Este tipo de reproducción es propio de los mucorales (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*).
- **Ascosporas** resultan de la meiosis, y se forman a partir de una bolsa o asca que produce de dos a ocho esporas. Algunos ejemplos de hongos ascosporados son: *Hansenula* y *Pichia*.
- **Basidiosporas** son propias de las setas u hongos microscópicos, son estructuras unicelulares y haploides, se forman externamente sobre una base o pedestal llamado basidio, de las que nacen esterigmas que producen las basidiosporas., este tipo de reproducción es típico de *Rhodotorula sp.* y *Filobasidiella neoformans*. Las basidiosporas

maduras son descargadas a menudo en forma explosiva cuando una gota de lluvia o un animal tocan la seta (Bonifaz, 2005).

Los hongos producen esporas sexuales con menos frecuencia que las asexuales y a menudo solo lo hacen en circunstancias especiales (Robertis, 1999).

### **3.2. Generalidades sobre la germinación conidial**

Las esporas asexuales, o conidias, son críticas en el ciclo de vida de los hongos filamentosos, porque son el medio primario de dispersión fungiendo a la vez como “casa segura” para el genoma en condiciones ambientales adversas (Osherov Nir y May Gregory, 2001).

#### **3.2.1. Composición de las conidias**

Las esporas inactivas se encuentran rodeadas por una gruesa y multicapa pared celular compuesta principalmente por quitina y hemicelulosa, esta pared celular es la responsable del alto nivel de resistencia que presentan las conidias a condiciones ambientales adversas permitiendo de esta manera que permanezcan en estado de latencia por largos periodos (Van Laere, 1986).

Las conidias inactivas contienen un núcleo hipercondensado, que se encuentra en la fase G1 del ciclo celular. Éstas tienen una alta reserva de mRNA y ribosomas activos los cuales están preparados para una rápida activación y traducción cuando la conidia se encuentre en condiciones favorables para la germinación (Osherov Nir y May Gregory, 2001). Cabe señalar que la trealosa es el componente principal en la conidia inactiva ya que

sirve como protección al estrés al que se encuentra sometida durante el estado de latencia (Van Laere, 1986), mientras que los lípidos y los aminoácidos son los se encuentran en menor proporción en la conidia (Osherov Nir y May Gregory, 2001). (Tabla 1)

**Tabla 1. Composición en peso seco de las conidias**

Composición	% en Peso Seco
Pared celular	35
Proteína	22
RNA	5,2
DNA	0,4
Trealosa	25 – 35
Lípidos	3
Aminoácidos	2 – 3
Cenizas	7
Agua	3

Tomado de: Van Laere Ander (25).

### 3.2.2. Estado de latencia

El estado de latencia en las conidias está a menudo asociado con la resistencia que presentan éstas a las condiciones ambientales desfavorables como sequías, bajas o altas temperaturas, permitiéndoles resistir estas condiciones por largos periodos. Por lo tanto, este estado es un paso importante que contribuye a la sobrevivencia de los hongos filamentosos.

De acuerdo a las condiciones que lo producen este periodo se clasifica en:

- **Estado de latencia exógeno**, causado por condiciones ambientales físicas o químicas desfavorables para el crecimiento vegetativo. La adición de una fuente de carbono o nitrógeno en presencia de agua a menudo es

suficiente para inducir la germinación (Van Mulders y Van Leare, 1984) (Lamarre *et al*, 2008).

- **Estado de latencia constitutivo**, ocasionado por una propiedad innata de las conidias, la inactividad puede deberse a que la espora necesita de un tiempo para completar su maduración para así dar paso a la germinación y al posterior desarrollo del talo vegetativo, aunque este estado de latencia también ha sido observado en esporas maduras. Las conidias solo pueden ser activadas cuando son sometidas a un tratamiento físico o químico por un breve tiempo. Por ejemplo, la activación por medio de un tratamiento de calor una vez que la espora se encuentra hidratada, incrementa la permeabilidad de la membrana y facilita la absorción de los nutrientes (Van Mulders y Van Leare, 1984).

Como el estado de latencia constitutivo, el estado de latencia exógeno es una etapa importante en el ciclo de vida de los hongos filamentosos, permitiendo la germinación de las conidias únicamente bajo condiciones favorables para el crecimiento vegetativo.

### **3.2.3. Germinación conidial**

La germinación conidial es una cadena irreversible de eventos que transforma la conidia a su forma vegetativa, hay tres pasos importantes que pueden distinguirse durante la germinación conidial:

**a) Activación** de la espora en respuesta a condiciones ambientales apropiadas. Se requiere que la conidia esté en presencia de una fuente rica en nutrientes que provoque la germinación conidial, las fuentes pueden variar de

acuerdo a las diferentes especies de hongos y por lo tanto al tipo de espora que producen. De cualquier manera, agua, oxígeno y carbono son requerimientos universales para la activación de la conidia. Algunas conidias requieren factores adicionales como nutrientes de bajo peso molecular y sales inorgánicas en bajas concentraciones (D'Enfert, 1997).

**b) Crecimiento isotrópico** el primer cambio morfológico observado durante la germinación conidial involucra la captación de agua por la conidia, esta se hidrata rápidamente aumentando su tamaño. En esta etapa se desencadenan una serie de reacciones metabólicas que incluyen:

**Síntesis de DNA, RNA y proteínas:** al mismo tiempo que la espora aumenta de tamaño, el núcleo hipercondensado que se encuentra en la *fase G1* o fase del primer hueco pasa a lo que se llama la fase del segundo hueco o *fase G2*, el cual puede ser observado durante las tres o cuatro horas después de iniciada la germinación conidial. La primera mitosis se completa dentro de las cinco o seis horas, antes de la emergencia del tubo germinal. Durante la germinación el núcleo continúa dividiéndose, por lo que estos organizan y migran hacia el tubo germinal (D'Enfert, 1997).

El mRNA y los ribosomas libres se activan rápidamente para llevar a cabo la síntesis de macromoléculas necesarias para el crecimiento tales como la transcripción de genes específicos que codifican para la síntesis de proteínas, para las enzimas intra y extracelulares, la biosíntesis de aminoácidos, las subunidades ribosómicas, el incremento en los niveles de RNA, etc (Sachs y Yanofsky, 1991).

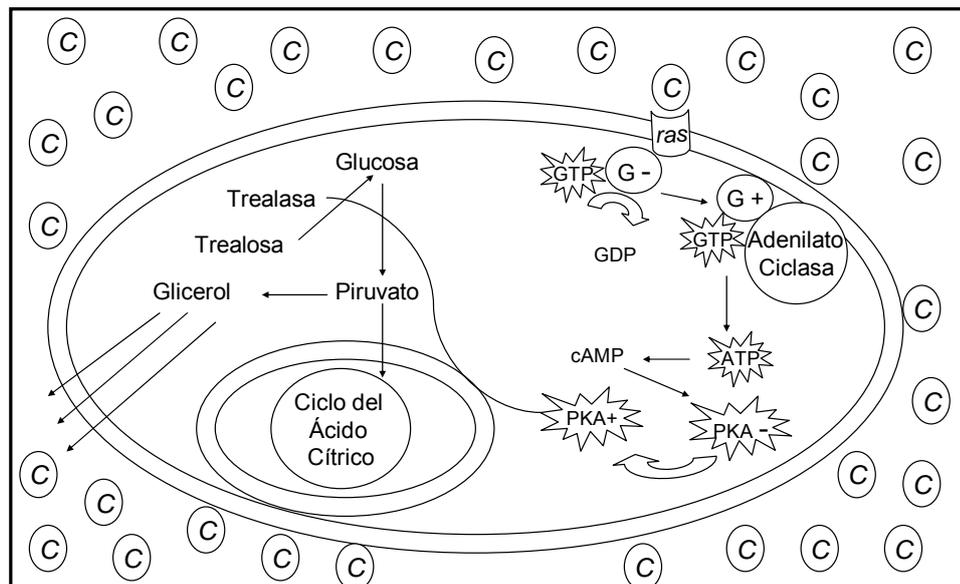
Osherov Nir y May Gregory, (2000) encontraron que *Aspergillus nidulans* codifica ocho genes durante la etapa temprana de la germinación conidial, de los cuales cinco han sido identificados. Cuatro de los cinco genes (*sgdA*, *B*, *C* y *D*) están directamente involucrados en la traducción y plegado de las proteínas, el quinto (*sgdD*) muestra un 83% de similitud con el gen que codifica para la enzima malonil CoA sintetasa, la cual está involucrada en la generación de acetil CoA, proveniente de *Rhizobium trifolii*.

**Respiración:** uno de los cambios más notables es el que ocurre en la respiración. Las esporas inactivas tienen un índice de respiración bajo, en la mayoría de los casos utilizan la ruta de la glucólisis (Embden – Meyerhof). Cuando la germinación inicia, hay un incremento en el índice de respiración debido a la presencia de oxígeno que oxida totalmente el piruvato a dióxido de carbono, liberando la energía almacenada en los enlaces del piruvato y atrapándola en el ATP. El incremento en la respiración es acompañado por cambios en la estructura de las mitocondrias, haciendo la membrana de éstas más permeable al piruvato. Este cambio en la respiración aeróbica por la forma anaeróbica es característico de los hongos filamentosos (Van Laere, 1986).

**Activación de la señal *ras* / *cAMP* / *PKA*:** Osherov Nir y May Gregory, (2000) encontraron que la fuente de carbono funciona como una señal extracelular que activa la señal *ras* la cual desencadena una serie de reacciones que inducen la germinación conidial. La interacción entre la fuente de carbono y la señal *ras* estimula una reacción de intercambio, en el que el GDP unido a la proteína G es sustituido por GTP. Este intercambio activa la proteína G, que a su vez estimula la síntesis de cAMP (adenosina 3',5'-

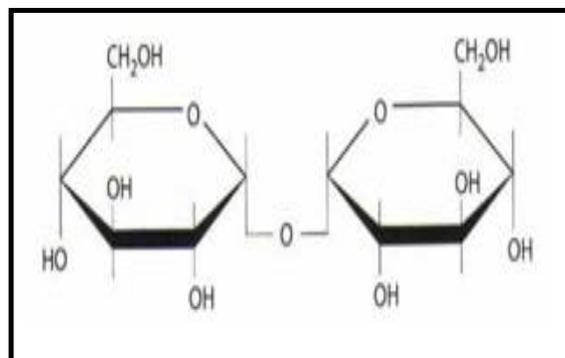
monofosfato) mediante la activación de la adenilato ciclasa (Mathews *et al*, 2002) (Lafon *et al*, 2006).

El cAMP, el segundo mensajero intracelular, activa la proteína quinasa A (PKA), en su forma inactiva, la PKA es un tetrámero formado por dos subunidades C catalíticas y dos subunidades R reguladoras. La unión del cAMP a las subunidades R hace que el tetrámero se disocie dando lugar al monómero catalíticamente activo, este monómero activa algunas enzimas por medio de la fosforilación iniciando algunos cambios metabólicos que ocurren durante la germinación. (Ziv *et al*, 2007). Uno de estos cambios es provocado por la activación de la trealasa, que actúa directamente sobre las reservas de trealosa (D'Enfert, 1997). (Figura 1)



**Figura 1. Representación esquemática de la activación del metabolismo en las conidias:** La fuente de carbono (C) activa la señal ras, la señal es enviada a la enzima adenilato ciclasa por medio de la proteína G. La enzima una vez activada cataliza la conversión de ATP en cAMP, el segundo mensajero intracelular, que activa la proteína quinasa A (PKA) con la fosforilación resultante de las proteínas diana que da lugar a las modificaciones metabólicas. Tomado de Van Laere Ander (25), Oshero Nir (18) y modificado por Saldaña Díaz Blanca.

**Metabolismo de la trealosa:** la trealosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor que almacenan diferentes organismos durante cortos períodos de su crecimiento (Figura 2). En las conidias la trealosa puede encontrarse en concentraciones por arriba del 20 % de masa seca, su principal función consiste en proteger del estrés al que se encuentran sometidas las esporas durante el estado de latencia protegiendo las proteínas y la membrana del daño causado por un ambiente seco, ácidos orgánicos y metales pesados. La movilización sistemática de la trealosa sugiere que ésta es la reserva de carbohidratos que la conidia necesita para la activación de la germinación conidial. La trealosa es rápidamente convertida a glicerol como resultado de su transporte a la ruta de la glucólisis, sin embargo la mayor parte de la producción de glicerol es transportada al exterior de la membrana. Una razón más por la cual la trealosa se metaboliza rápidamente es debido a que ocupa gran parte de volumen dentro de la conidia reduciendo de esta manera la absorción de agua. Cuando los niveles de trealosa disminuyen, la absorción y movilidad del agua se incrementan teniendo una mayor disponibilidad del vital líquido necesario para todas las reacciones metabólicas (Van Laere, 1986).



**Figura 2. Estructura de la Trealosa**

**Adhesión conidial:** las conidias sufren un marcado cambio en la pared celular, aumentando sus propiedades adhesivas lo cual hace que se adhieran unas con otras. Este proceso está mediado por dos pasos; en el primer paso la adhesión comienza como resultado de una reserva preexistente de glicoproteína ubicada en una subcapa de la pared celular; en el segundo, se incrementan los niveles de glicoproteína gracias a la activación del metabolismo y la síntesis de proteínas (Osherov Nir y May Gregory, 2001).

Por último, la pared se polariza resultando en una transición del crecimiento isotrópico a un crecimiento polarizado (D'Enfert, 1997).

**c) Crecimiento polarizado:** se caracteriza por la formación del túbulo germinal, el cual es una extensión de la espora, utilizado comúnmente como un límite entre la etapa de la germinación conidial y el crecimiento vegetativo etapa en la cual el tubulo germinal se elongará y ramificará para dar lugar al micelio.

Cuando la pared se polariza da lugar a la formación y elongación del túbulo germinal, por lo que algunos autores piensan que es necesaria la especificación de él o los sitios donde emergerá dicho túbulo. Harris y Momany, (2003) proponen tres modelos que explican este proceso:

**Modelo I. Señales presentes en la pared celular:** durante el ciclo reproductivo asexual de los hongos filamentosos se producen cadenas de esporas a partir de una sola fiálide cuando las conidias son expulsadas. El sitio de unión de una espora con otra deja una marca en la pared celular que es el lugar específico donde inicia la polarización de la pared y emergencia del tubulo germinal.

**Modelo II. Activación de receptores:** él o los sitios donde emerge el túbulo germinal son el resultado de la activación de receptores específicos en respuesta a la cascada metabólica que experimentan las conidias durante los dos primeros pasos de la germinación conidial.

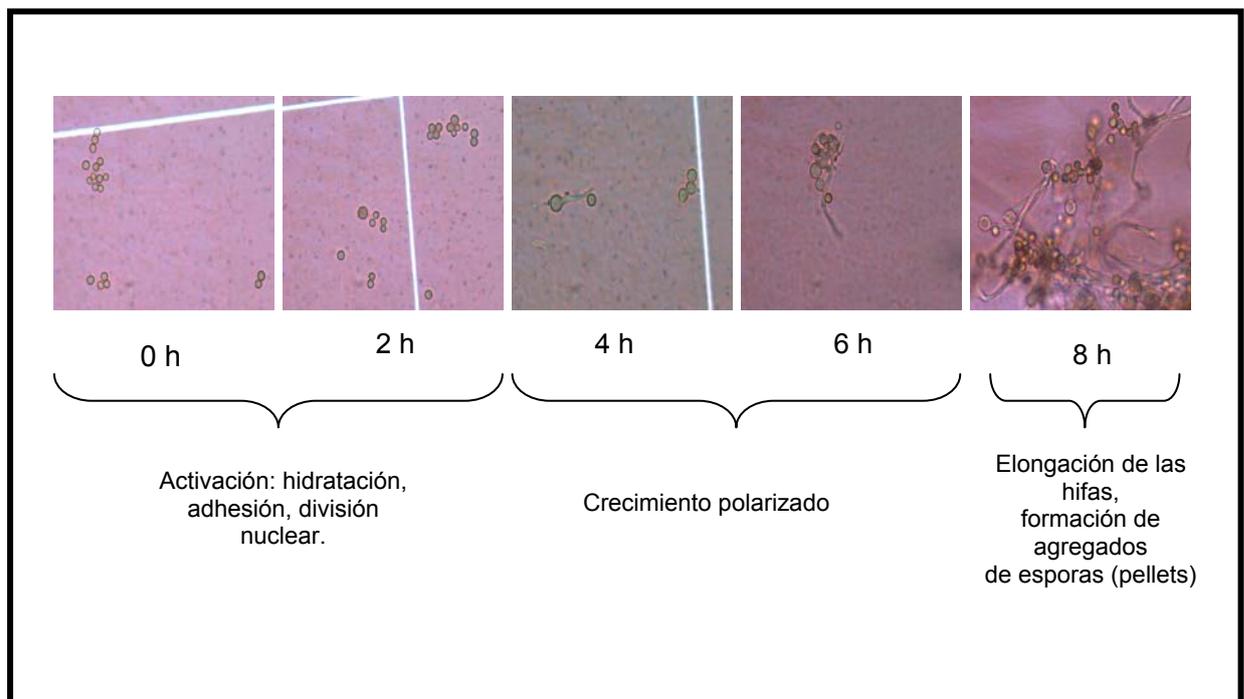
**Modelo III. Polarización espontánea:** en este caso la polarización de la pared se lleva a cabo de manera aleatoria, una vez que se establece el sitio de polarización de la pared se activan mecanismos reguladores que dirigen el brote de un segundo tubulo germinal en el sitio opuesto al lugar donde emergió el primero, generando un modelo bipolar.

La formación del túbulo germinal se lleva a cabo en dos pasos; el primero es el “ensamble” de moléculas de actina donde brotará el túbulo germinal, estas moléculas son esenciales para su formación y elongación (D’Enfert, 1997). Este paso se encuentra mediado por dos complejos multi – proteínicos: el polarisoma y el Arp 2/3. El polarisoma regula la formación de filamentos de actina lineales, el componente más importante de éste es la proteína formin Bni1p que ensambla los microfilamentos de actina; por otro lado el complejo Arp 2/3 regula la formación de filamentos ramificados, que junto con los filamentos lineales, forma una fina red. Los filamentos de actina se extienden desde la conidia hasta el lugar donde emergerá el tubulo, estos sirven de pista para el transporte de vesículas provenientes de la actin citoesqueleto al tubulo germinal (Harris y Momany, 2004).

El segundo paso, el subsecuente establecimiento de la polarización de la pared es llevado a cabo por la actin- citoesqueleto la cual es responsable de la transición y secreción de vesículas que acarrean moléculas que envuelven el extremo del tubulo germinal provocando la elongación de este para dar lugar a

las hifas (D'Enfert, 1997). La elongación y ramificación del túbulo germinal depende del mantenimiento de la polarización de la pared así como de la velocidad de síntesis de ésta (Harris y Momany, 2004).

Como hemos visto, la germinación conidial es un proceso complejo que envuelve diversos niveles de activación y control del metabolismo que inician con la transducción de señales provocadas cuando la espota esta en presencia de una adecuada fuente de carbono, y los cambios físicos que comienzan con la hidratación y aumento de tamaño de la conidia, el incremento de la adhesión entre ellas y por último el brote del tubulo germinal con la consecuente elongación y ramificación de este para dar lugar a las hifas (Lamarre *et al*, 2008). (Figura 3)



**Figura 3. Germinación conidial de *Aspergillus nidulans***  
Fuente: Originado en este trabajo.

### **3.3. Pectinasas**

Las pectinasas también llamadas enzimas pectinolíticas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza y que se caracterizan por su capacidad para degradar pectina y sustancias relacionadas.

Estas enzimas han sido clasificadas tomando en cuenta su mecanismo de acción en:

**Esterasas:** saponifican el sustrato, catalizan la des – esterificación de la pectina para remover los metoxi èsteres, son muy importantes para la degradación eficiente de la pectina, ya que las poligalacturonasas frecuentemente se ven inhibidas por los grupos metilo y acetilo y necesitan que estos grupos sean removidos previamente para poder actuar.

**Despolimerasas:** catalizan el rompimiento de los enlaces  $\alpha - 1,4$  glucosídicos del ácido D – galacturónico de la pectina. Las despolimerasas se subdividen con base en su mecanismo de acción en hidrolasas y liasas (Victoria Acosta, 2007). Hidrolasas, catalizan la ruptura hidrolítica con la adición de una molécula de agua que rompe el enlace glucosídico. Las liasas rompen el enlace glucosídico mediante la trans-eliminación, y se basa en la formación de una doble ligadura entre los átomos de carbono 4 y 5 de la molécula del ácido galacturónico.

Otra clasificación se basa en la forma o frecuencia con la que estas enzimas rompen la molécula de pectina (frecuencia de corte) y pueden ser de tipo “exo” o “endo”. Las enzimas de tipo “exo” rompen el enlace glucosídico en el extremo reductor de la molécula de la pectina formando monómeros, dímeros y trímeros como productos finales. Las del tipo “endo” tienen su sitio de corte en sitios no reductores de la molécula de pectina y generan oligómeros

de entre 5 y 7 unidades, lo que ocasiona la disminución de la viscosidad de una solución de pectina (Gómez, 2006).

Las pectinasas también se clasifican con base en el dominio sobre el cual actúan, pero básicamente se clasifican en dos grupos: el grupo del homogalacturano (HG) y el grupo del ramnogalacturano (RG).

**Enzimas que degradan el homogalacturano (HG):** participan enzimas como la pectin metil- y acetil- esterasa (EC 3.1.1.11 y EC 3.1.1.6, respectivamente), las cuales remueven el grupo metoxilo del grupo carbonilo de las unidades de galacturonato de la pectina y la acetil esterasa remueve los grupos acetilos del carbono 2 ó 3 en el galacturonato produciendo un alcohol y un acetato respectivamente. Las poligalacturonasas se dividen en tres grupos: endopoligalacturonasas (EC 3.2.1.67) que atacan enlaces  $\alpha - 1,4$  al azar de la cadena del polisacárido generando oligómeros de ácido galacturónico; exopoligalacturonasa tipo I que hidroliza ácido poligalacturónico por el extremo no reductor dando ácido galacturónico, y exopoligalacturonasa tipo II libera digalacturonato del extremo no reductor del ácido poligalacturónico . Por último están la pectin y pectato liasa que catalizan la eliminación del enlace glucosídico  $\alpha 1 - 4$  entre los residuos de ácido galacturónico en la pectina o pectato para dar oligosacáridos insaturados entre el carbono 4 y 5 del extremo no reductor del producto.

**Enzimas que degradan el ramnogalacturonano (RG):** en estas enzimas se encuentran la ramnogalacturonano hidrolasa, ramnogalacturonano liasa, exogalacturonasas, ramnogalacturonasa ramnohidrolasa, ramnogalacturonano galactohidrolasa y  $\alpha -$  ramnosidasa (Palomares Ruíz, 2006).

Existe otro grupo de enzimas involucrado en la despolimerización de la pectina y son conocidas como enzimas accesorias, estas enzimas actúan sobre las cadenas laterales de la pectina. De estas enzimas destacan las arabinasas, galactanasas, feruloil esterasas, glucoronidasas, xilosidasas, etc. (Gómez, 2006).

En la industria las pectinasas se utilizan para el procesamiento de frutas y vegetales; en la industria textil, en el tratamiento y degomización de fibras naturales, en la clarificación de jugos y vinos, en la fermentación de té y café. La producción de pectinasas por bacterias y hongos filamentosos ha sido ampliamente reportada (Jayani *et al*, 2005).

#### **3.4. Regulación y represión catabólica de biosíntesis de enzimas**

En términos generales, muchas enzimas extracelulares pueden ser inducibles o parcialmente inducibles. Muchas de éstas hidrolizan moléculas poliméricas que son lo bastante grandes como para entrar a la célula, por lo que presumiblemente existe un nivel basal de enzima que degradará su sustrato, generando compuestos de bajo peso molecular que puedan entrar a la célula y efectuar la inducción. La inducción puede definirse como el aumento específico en la concentración de una enzima como respuesta a la presencia de una sustancia química determinada, denominada inductor.

Comúnmente, el inductor es un sustrato del sistema enzimático, aunque en algunos casos puede ser el producto de la reacción. Con frecuencia, existen análogos químicos relacionados con el inductor que estimulan también la formación de enzimas (inductores gratuitos). Cuando el inductor está ausente

es posible detectar alguna actividad de las enzimas inducibles, llamada nivel basal (no inducible), donde la rapidez de síntesis es mínima.

La expresión de las enzimas está afectada por el medio ambiente pues influye en la o las enzimas que deben ser sintetizadas, así como en la concentración de las mismas (Rodríguez, 1998).

A diferencia de la inducción, la represión es un fenómeno más complejo de definir. Usualmente varios microorganismos no transcriben un gran número de genes en presencia de glucosa, como respuesta al ahorro de energía, afectando la síntesis de enzimas usadas para metabolizar otras fuentes de carbono.

Los genes *creA* de *Aspergillus nidulans* fueron identificados hace varios años demostrándose que están involucrados en la represión catabólica por glucosa, inhibiendo la expresión de varios genes, en particular los que codifican para la expresión de enzimas hidrolíticas extracelulares (Greenstein *et al*, 2005) (Ziv *et al*, 2007).

Ziv *et al*, (2007) encontraron que en *Aspergillus nidulans* la presencia de glucosa como fuente de carbono afecta la actividad adecuada de la proteína quinasa A (PKA) inhibiendo o retardando la transducción de señales que activan el metabolismo de las conidias, así como la inhibición en la expresión de genes. Estos autores identificaron en particular la inhibición del *gen CRE – 1* el cual afecta el establecimiento de la polarización de la pared celular y la elongación del tubo germinal.

Al igual que ellos Belaish *et al*, 2007 identificaron en *Aspergillus nidulans* los genes *cetA/calA* que codifican para la síntesis de proteínas CETA y CALA,

la expresión de uno de estos genes, el *cetA*, se encuentra mediado por la represión por fuente de carbono, principalmente por la glucosa.

Estos genes en conjunto son muy importantes ya que las proteínas que sintetizan se acumulan en la pared celular, presentando una función similar a las proteínas de taumatina producidas por las plantas en respuesta a una infección por hongos, inhibiendo la germinación conidial. Se observó que estas proteínas, CETA/CALA, presentan una función similar inhibiendo la germinación cuando las condiciones no son favorables, y una vez iniciada la germinación hidrolizan el 1,3- $\beta$ - glucano presente en la pared celular, actuando de esta manera como agentes de “ablandamiento” preparando a la pared celular para la emergencia del tubulo germinal y la posterior elongación de éste.

Aunque la represión puede ser ejercida por varias fuentes de carbono, la glucosa es probablemente la más represiva junto con la sacarosa, xilosa y acetato, mientras que la galactosa y el glicerol son intermedios, la lactosa, arabinosa y etanol, son débilmente o no represores.

Fundamentalmente, la producción enzimática dependerá del microorganismo utilizado, naturaleza y concentración del sustrato inductor, la eficiencia de producción y del tipo de proceso que se utilice (Rodríguez, 1998).

### **3.5. Género *Aspergillus***

El género *Aspergillus* constituye un grupo de hongos filamentosos que agrupa un gran número de especies, las cuales pertenecen a los primeros organismos fúngicos en ser sembrados en medios artificiales y caracterizados bioquímicamente, ya que son uno de los hongos más comunes en el medio ambiente.

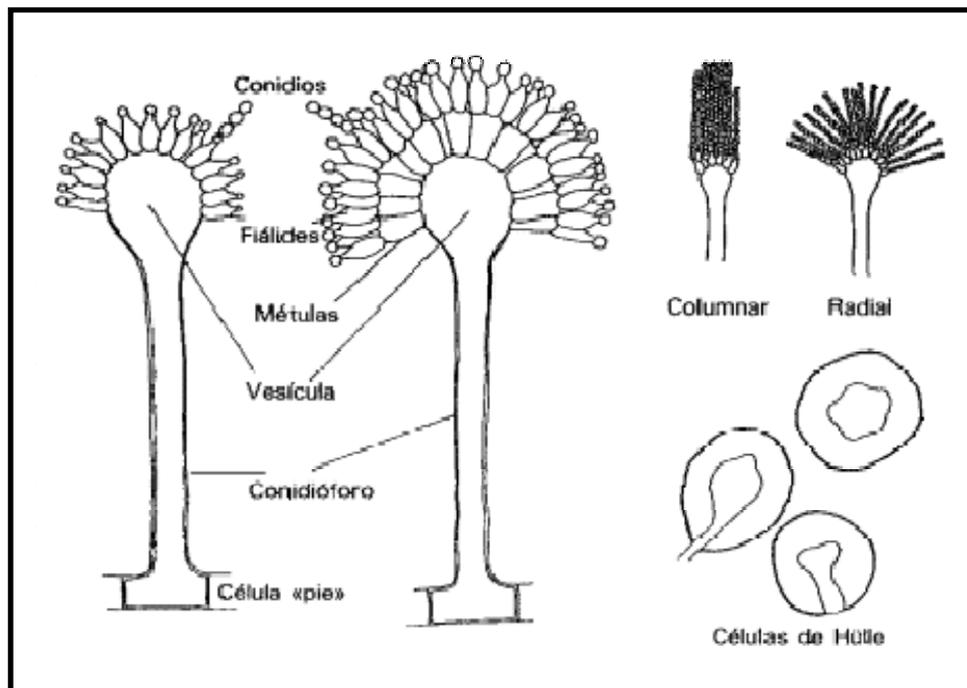
El género *Aspergillus* ha sido especialmente estudiado debido a que es un gran productor de enzimas de interés industrial. Participa en el reciclaje de materia orgánica y tiene amplias capacidades metabólicas para la utilización de un gran número de sustratos. Por lo que no es sorpresa que *Aspergillus* juegue un papel significativo en el campo de la biotecnología.

El origen del nombre *Aspergillus* (cabeza áspera) data del siglo XVIII, cuando Micheli (1729) describe a mohos con conidióforos y cabezas que portan cadenas de esporas. De cualquier modo, tomo casi 200 años, tener la primera clave taxonómica para la clasificación de *Aspergillus*. (Victoria Acosta, 2007)

Las especies individuales de *Aspergillus* se identifican por el color y la apariencia burda de la masa micelial y por el aspecto al microscopio de los cuerpos reproductivos característicos.

*Aspergillus* se ha caracterizado por su estructura morfológica (Figura 4). El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides, donde las conidias son producidas sucesivamente formando cadenas

no ramificadas. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas y las que presentan fiálides y métulas biseriadas. (Guzmán, 2005)



**Figura 4. Morfología de *Aspergillus***

## **CAPITULO IV**

### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Microorganismos**

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron diferentes cepas de *Aspergillus* provenientes del cepario del laboratorio de Fisiología de Hongos Filamentosos. Estas fueron; *A. niger* N – 402, *A. flavipes* FP – 500, *A. nidulans* y *A. flavus* CECT – 2687.

Las cepas fueron sembradas en placas con agar papa dextrosa (PDA), a excepción de *A. nidulans* que fue sembrada en placas con medio PABA (ácido p- aminobenzoico), se incubaron a 37 °C por 5 días. Las cepas fueron mantenidas a 4 °C con resiembras mensuales para mantenerlas viables.

#### **4.2. Desarrollo del inóculo**

Las cepas de *Aspergillus* fueron sembradas en placas con agar papa dextrosa (PDA), a excepción de *Aspergillus nidulans* que fue sembrada en placas con medio PABA (Ácido p – aminobenzoico), en condiciones asépticas e incubadas a 37 °C por 5 días. Al término de este período de crecimiento y esporulación de la cepa, se procedió a la cosecha de esporas.

La cosecha de esporas se realizó a partir de dos cajas por cada cepa a las cuales se les añadió aproximadamente 10 mL de solución salina isotónica (NaCl 0.9% p/v) Tween 80 (0.005% v/v) estéril, la superficie del hongo se raspó y se recolectó la solución, la cual se filtro con gasa estéril para eliminar

el micelio y restos de agar. La suspensión se colocó en tubos para centrifuga, las esporas se lavaron centrifugando la suspensión durante 5 minutos; el sobrenadante se desechó y se resuspendió el botón en 1ml de solución salina-Tween 80 estéril. Este procedimiento se realizó tres veces.

Terminado este procedimiento la suspensión de esporas se sometió al Mini-beadbeater (Biospec Products, INC) durante un minuto, esto con el fin de facilitar el manejo de las esporas. Una vez finalizado el procedimiento se adicionó 5 mL de solución salina-Tween 80 estéril.

#### **4.3. Conteo de esporas**

Se realizó una dilución 1:100 de la suspensión de esporas, a partir de esta dilución se tomó un volumen de 10  $\mu$ l y se colocó en la cámara de Neubauer, ésta se llevó al microscopio para realizar el conteo.

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo del cual se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula, La cuadrícula posee cuatro cuadrantes, por lo que el conteo se realiza en un sólo cuadrante sumando cada una de las esporas contenidas en los 16 cuadros presentes en cada cuadrante, posteriormente se llevan a cabo los cálculos para determinar el número total de esporas en la suspensión de esporas y calcular la concentración final del inóculo, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\Sigma \text{ esporas} * 4 * 2500 * 100 = \# \text{ esporas/ mL}$$

Donde:

$\Sigma$  esporas: es la sumatoria total de esporas presentes en los 16 cuadros pertenecientes a un cuadrante.

4: es el número de cuadrantes presentes en la cámara.

2500: es un factor de volumen de la cámara ya que cuenta con las siguientes dimensiones  $0.1\text{mm} * 0.0025\text{ mm}^2$ .

100: este valor es variable debido a que se le atribuye a la dilución a la que se encuentra la muestra de conteo.

#### **4.4. Medios y condiciones de cultivo**

##### **4.4.1. Medio sólido**

Los medios de cultivo utilizados para la selección, cultivo y mantenimiento de las cepas de *Aspergillus* fueron agar papa dextrosa (PDA) y PABA (ácido p – aminobenzoico) para *Aspergillus nidulans*. El cultivo en medio sólido se incubó en estufa a 37 °C por 5 días.

##### **4.4.2. Medio líquido**

Los experimentos en medio líquido se llevaron a cabo de la siguiente manera:

- Germinación de esporas y evaluación de fuente de carbono y nitrógeno: se utilizaron tres tipos de fuente de carbono: glucosa a una concentración de 1% (p/v), 0.5% (p/v) y 0.2% (p/v), pectina y ácido galacturónico a las mismas concentraciones. Para la fuente de nitrógeno se

utilizó medio basal (MB) con sulfato de amonio y nitrato de sodio a una concentración de 0.5% (v/v), el pH de trabajo fue de 5. Se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo y se inocularon con una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/ mL.

- Evaluación de actividad exo-pectinolítica y tinción de núcleos: se utilizó como fuente de carbono pectina en una concentración de 1% (p/v), como fuente de nitrógeno medio basal (MB) con sulfato de amonio en una concentración de 0.5% (v/v), el pH de trabajo fue de 3.5. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo y se inocularon con una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/ mL.

Ambos experimentos se incubaron a 37 °C con agitación recíproca a 200 rpm por 24 h.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua destilada para la preparación de los medios. La esterilización de todos los medios y otras soluciones se llevó a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

#### **4.5. Germinación de esporas**

La germinación de esporas se determinó con una toma de muestras cada hora durante ocho horas, monitoreando la germinación con la observación al microscopio y conteo de esporas de cada muestra que se tomó.

#### **4.6. Determinación de biomasa**

El crecimiento celular se cuantificó como peso seco. Las muestras se filtraron a través de membranas Millipore de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, a peso constante. La biomasa retenida en la membrana se seca al vacío durante 48 h. El peso seco se calculó con la diferencia de pesos entre las membranas con muestra y las membranas sin muestra, reportado en unidades de mg de biomasa seca por mL de medio (mg/mL).

#### **4.7. Ruptura celular**

Para el rompimiento celular se tomaron muestras de 6 mL cada 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de incubación. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos, el sobrenadante (fracción extracelular) se guardó en refrigeración a 4°C para su posterior análisis; asimismo el botón de esporas se resuspendió en 1mL de solución salina-Tween 80 estéril; las esporas se lavaron centrifugando la suspensión durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y se resuspendió el botón en 1mL de solución salina-Tween 80 estéril. Este procedimiento se realizó tres veces.

Finalizado este procedimiento el botón de esporas se resuspendió en 1 mL de buffer de PBS, el cual se colocó en tubos de 2 mL junto con perlas de vidrio, los tubos se colocaron en el Mini-beadbeater (Biospec Products, INC) a una velocidad de 4800 rpm durante tres ciclos; cada ciclo está constituido por un periodo de 30 segundos en agitación y 60 segundos en hielo. Al finalizar se tomó un volumen de 0.7 mL y se colocó en tubos Eppendorf, estos se centrifugaron a 10 rpm durante 5 minutos. Se desechó el botón y se conservó

el sobrenadante, éste se colocó en refrigeración a 4°C para su posterior análisis (Fracción intracelular).

#### **4.8. Determinación de la actividad *exo* – pectinolítica**

La actividad *exo* – pectinolítica fue determinada por la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática. La mezcla de reacción consistió de 0.5 mL de una solución de pectina 1% (p/v) en agua destilada a un pH de 5.5, 0.4 mL de solución amortiguadora de acetatos 100 mM a pH 5.0. La reacción se inicio con la adición de 0.1 mL de filtrado (intracelular y extracelular), se incubó durante 20 minutos a 45°C al término de este tiempo de incubación la reacción se detuvo adicionando 2 mL de reactivo de DNS (ácido 3,5 – dinitrosalicílico), los tubos con la muestra se colocaron en baño María a ebullición por 5 minutos después de este tiempo se añadieron 5 mL de agua destilada y se determinó la absorbancia a 575 nm, el blanco se preparó de la misma forma pero el filtrado se agrego después de adicionar el reactivo de DNS. La actividad se expresó en unidades enzimáticas (U) definidas como la cantidad de enzimas que produce 1  $\mu$ mol de ácido D – galacturónico en las condiciones de ensayo.

#### **4.9. Tinción de núcleos**

Con las muestras correspondientes al tiempo cero, 2, 4, 6, 8 y 12 horas de incubación se realizó la tinción de núcleos para lo cual se lavaron las muestras centrifugando la suspensión durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y se resuspendió el botón en 1mL de solución salina-Tween 80 estéril,

este procedimiento se realizó tres veces; después las células se preparan para la tinción agregando una solución de formaldehído 4% (p/v) con Tritón X – 100 0.1%, (v/v) en 10 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a pH 6.8 por 10 minutos, esto con el fin de hacer más permeable la membrana y que el colorante penetre con mayor facilidad a la espora (Osherov Nir y May Gregory, 2000). Finalizado este tiempo, las esporas se lavan dos veces con agua destilada; al terminar el lavado se les agrega 500  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:100 de hipoclorito de sodio por 10 minutos, la finalidad de la adición del hipoclorito de sodio es que el colorante penetre en la célula para que sea observado con una mayor intensidad (Prigione Valeria y Filipello Valeria, 2004). Nuevamente, al término de este tiempo las esporas se lavan dos veces con agua destilada y se les agrega 250  $\mu\text{l}$  de DAPI (4,6 – diamino – 2 – fenilindol diclorhidrato) en una concentración de 100 ng/mL durante 15 minutos, pasado este tiempo se realizan dos últimos lavados con buffer de PBS finalizado este procedimiento se agrega 1 mL de solución de glicerol y n – propilgalato en buffer de PBS. (Osherov Nir y May Gregory, 2000)

Al terminar la tinción las esporas se llevan a observación en un microscopio de fluorescencia realizándose observaciones a 40 X y 100 X.

Nota: todos los experimentos realizados se repitieron como mínimo tres veces.

## CAPITULO V

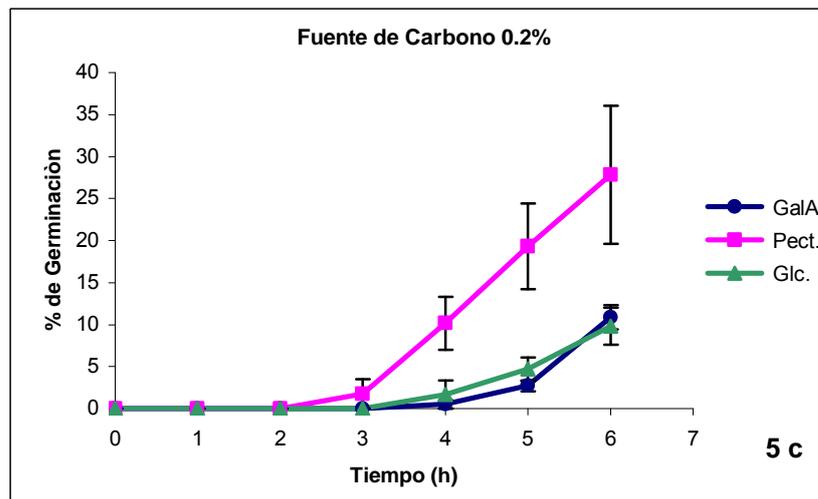
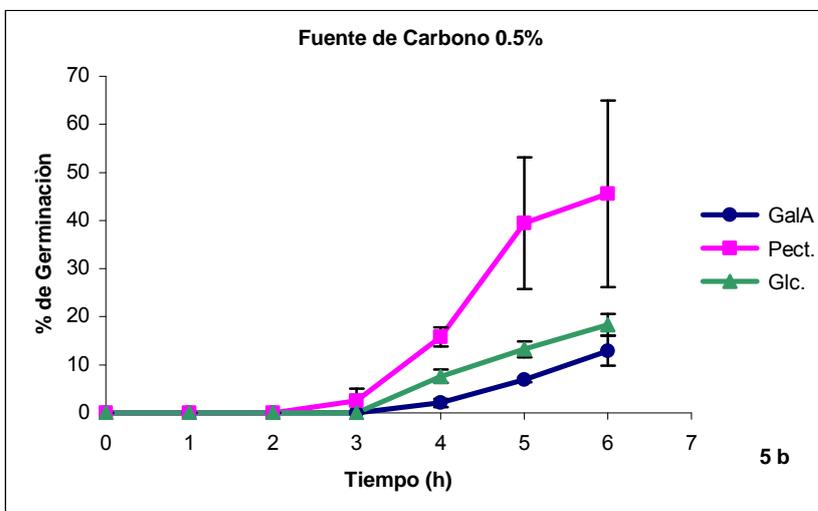
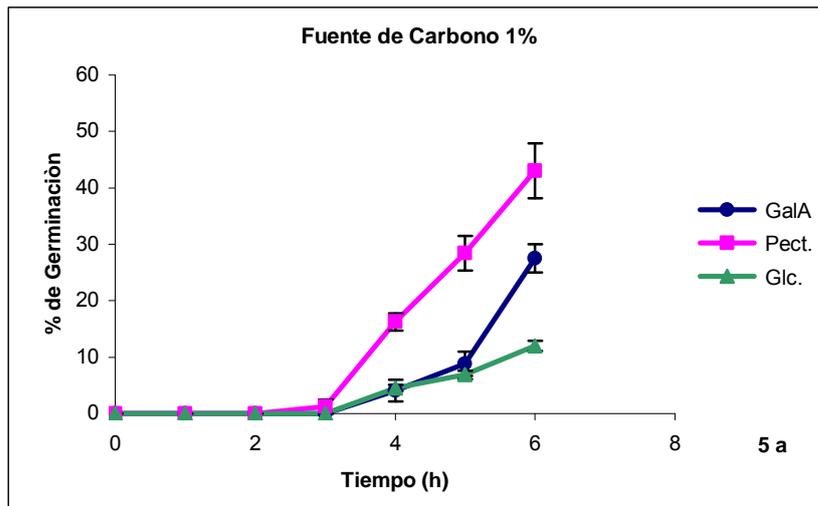
### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **5.1. Evaluación de la fuente de carbono y nitrógeno:**

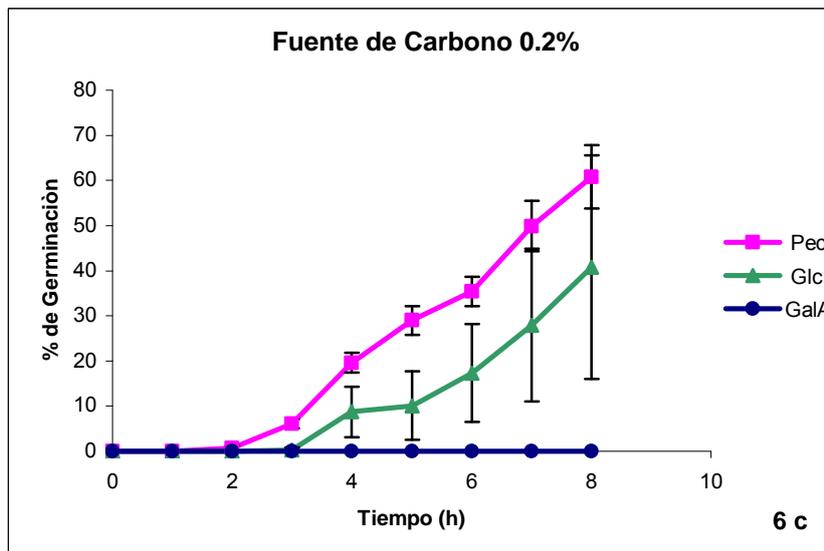
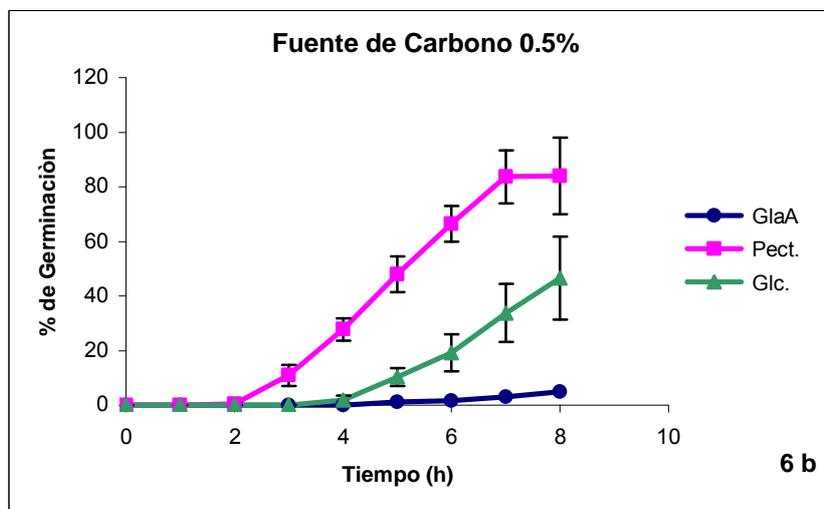
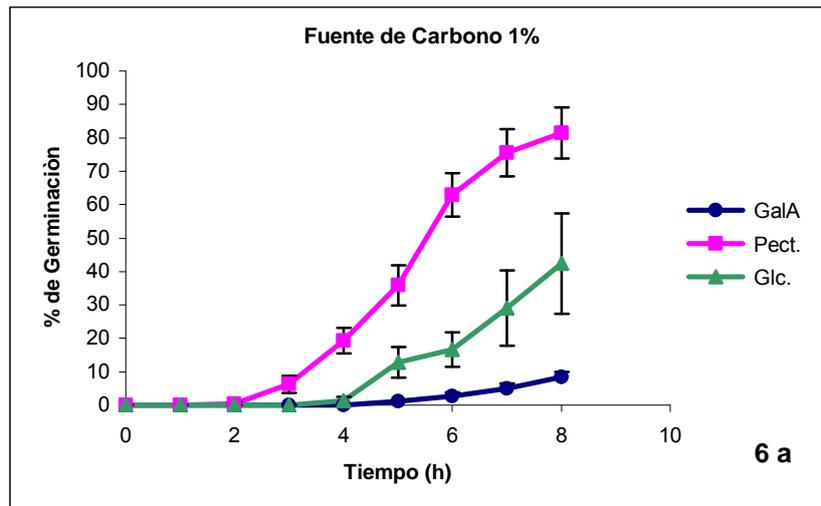
La germinación conidial es una etapa crítica en el ciclo de vida de los hongos filamentosos, dicha etapa es una cadena irreversible de eventos que transforma las conidias a su forma vegetativa, para ello es necesario que se encuentren en presencia de una fuente rica en nutrientes que desencadene y dé sustento a esta serie de reacciones biológicas, de manera que pueda llevarse a cabo finalmente la formación de nuevos organismos genéticamente idénticos al parental (Oshero Nir y May Gregory, 2001).

Por esta razón se evaluó el efecto de tres fuentes de carbono y dos fuentes de nitrógeno sobre la germinación conidial, para lo cual se inocularon matraces con una suspensión de esporas de *Aspergillus flavus* CECT – 2687; utilizándose tres fuentes de carbono: glucosa, pectina y ácido galacturónico cada una de ellas a una concentración de 1% (p/v), 0.5% (p/v) y 0.2% (p/v) respectivamente. Para evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno se utilizó medio basal (MB) con sulfato de amonio o nitrato de sodio a una concentración de 0.5% (v/v), el pH de trabajo fue de 5.

De manera general se observó, en las tres fuentes de carbono utilizadas que la germinación inicia dentro de las dos o tres primeras horas posteriores a la inoculación, y además que el número de conidias germinadas aumenta con el tiempo (Figuras 5 y 6).



**Figura 5. Cinética de germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687.**  
Fuente de carbono: glucosa (Glc), ácido galacturónico (GalA) y pectina (Pect.). Medio basal (MB) sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno.  
Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5



**Figura 6. Cinética de germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687.** Fuente de carbono: glucosa (Glc), ácido galacturónico (GalA) y pectina (Pect.). Medio basal (MB) nitrato de sodio, como fuente de nitrógeno. Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5

De manera particular, observamos que cuando se utiliza pectina a una concentración del 1% y medio basal (MB) con sulfato de amonio, el porcentaje de germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687 llega al 43% a las seis horas de incubación; mientras tanto, en glucosa y ácido galacturónico este porcentaje disminuye alcanzando valores del 12 y 27%, respectivamente para el mismo tiempo y la misma concentración (Figura 5 a).

Un efecto similar se observó cuando la concentración de la fuente de carbono fue de 0.5 y 0.2% (Figura 5 b y 5 c), con la misma fuente de nitrógeno, el porcentaje de germinación es mayor en pectina, el cual llega a ser del 46 y 27% para 0.5% y 0.2% de pectina. Con glucosa y ácido galacturónico nuevamente se observó la disminución de los porcentajes de germinación cuando se redujo la concentración de las fuentes de carbono. Éstos van del 13 al 10% para el ácido galacturónico y del 18 al 9% para la glucosa durante el mismo tiempo y concentraciones de 0.5 y 0.2% respectivamente. (Figura 5 b y 5 c).

Por otro lado, utilizando medio basal (MB) con nitrato de sodio, se observan resultados similares. A las seis horas de incubación, en pectina al 1% se obtiene el mayor porcentaje de germinación (63 %). Para las otras dos fuentes de carbono, glucosa y ácido galacturónico los valores que se obtienen son del 3% (con 0.5%) y 16% (con 0.2%) al mismo tiempo de incubación (Figura 6 a).

Al igual que en el experimento anterior, observamos que al disminuir la concentración de las fuentes de carbono el porcentaje de germinación en la glucosa y ácido galacturónico disminuyen, para la glucosa la disminución es mínima ya que va del 19% (con 0.5%) al 17% (con 0.2%) a las seis horas de

incubación. Pero los resultados más drásticos se presentaron con ácido galacturónico en donde el porcentaje de germinación disminuyó, hasta el punto que a la concentración del 0.2% no hubo germinación conidial y las esporas entraron en estado de activación durante todo el tiempo que duro el ensayo (Figura 6 b y 6 c).

En cambio, para la pectina la germinación aumentó con relación a los porcentajes obtenidos en glucosa y ácido galacturónico, por una parte cuando la concentración fue 0.5% la germinación alcanzó el 66%, por otro lado cuando disminuyó ésta al 0.2% este porcentaje fue del 37% (Figura 6 b y 6c).

De acuerdo a los resultados obtenidos encontramos que *Aspergillus flavus* CECT – 2687 presenta una germinación más eficiente en pectina en comparación con las otras dos fuentes de carbono y para las diferentes concentraciones utilizadas.

El hecho de que esta cepa crezca deficientemente en glucosa no era lo esperado debido a que se considera esta fuente de carbono como la más fácilmente asimilable por la mayoría de los microorganismos (Robertis, 1999). Además; esta molécula de menor tamaño, puede entrar más fácilmente a la conidia para cubrir sus necesidades metabólicas durante la germinación conidial; en comparación con una fuente más compleja como la pectina, la cual necesita de una hidrólisis enzimática previa para poder entrar a la célula.

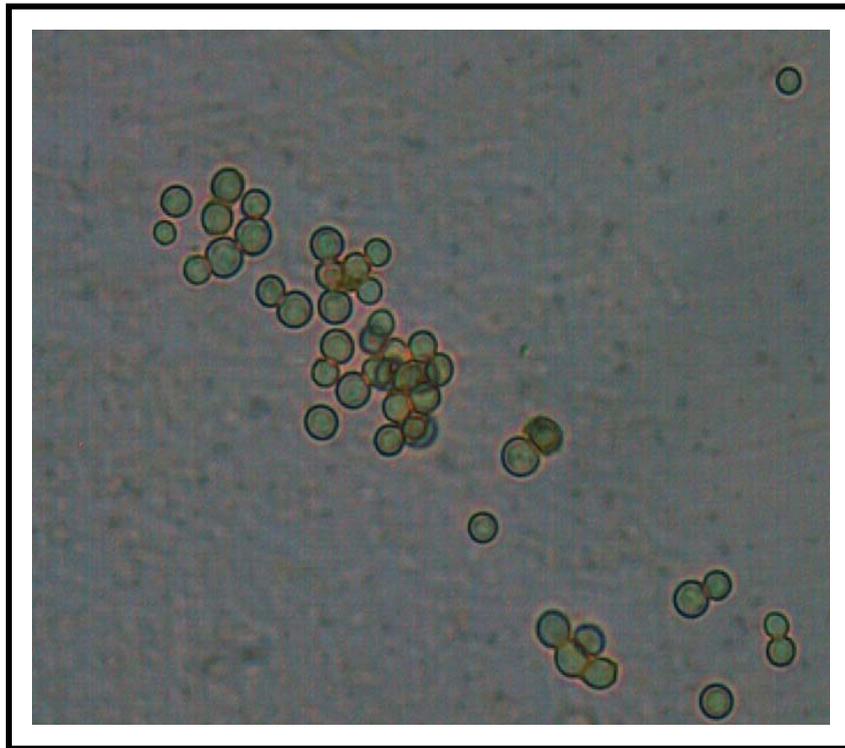
En cuanto a las concentraciones utilizadas es al 0.5% donde se observa que el porcentaje de germinación es el más alto desde las primeras horas de incubación hasta el término del ensayo. Es también en esta concentración donde se ve claramente que la germinación se lleva a cabo de una manera más rápida; por ejemplo a las cinco horas de incubación se alcanza una

germinación del 50%, en comparación con las otras concentraciones donde a la misma hora el porcentaje de germinación está por debajo de este valor, oscilando entre el 10 y 20% (Figuras 5b y 6b).

Analizando las fuentes de nitrógeno se observó que cuando se utiliza nitrato de sodio, la activación y crecimiento isotrópico de las conidias inicia a las dos horas de incubación, etapa que se identifica fácilmente por un aumento significativo en el tamaño de las esporas debido a la hidratación de éstas. Este comportamiento se observa en las tres fuentes de carbono utilizadas así como en las diferentes concentraciones que se manejaron durante los ensayos; mientras que la activación de las conidias inició una hora después cuando se utilizó sulfato de amonio como fuente de nitrógeno en las mismas condiciones. En cuanto al porcentaje de germinación, nuevamente se observa que en pectina al 0.5% se obtiene un mayor porcentaje cuando se utiliza medio basal (MB) con nitrato de sodio en comparación con el medio basal (MB) con sulfato de amonio donde el porcentaje disminuye hasta un 20% (Figura 5 b y 6 b). Para la glucosa en estas mismas condiciones la variación en el porcentaje de germinación fue mínima, con una diferencia de 2% en ambas fuentes de nitrógeno. En cambio donde sí hubo una variación muy alta fue cuando se usó ácido galacturónico y nitrato de sodio, ya que el porcentaje disminuyó llegando a valores de 1% hasta el punto donde no se presentó esta etapa, viendo únicamente en el campo de observación conidias en estado de latencia (Figura 6c).

Como experimento control se realizó un seguimiento de la germinación conidial de *Aspergillus flavus* CECT – 2687, inoculando una suspensión de esporas de este microorganismo en medio líquido con las mismas fuentes de nitrógeno utilizadas anteriormente pero sin fuente de carbono. Observamos que no hubo germinación de las conidias en las 8 horas de incubación, el único cambio observado fue el aumento de tamaño de éstas.

Aún cuando el monitoreo para verificar la germinación se prolongó de 8 a 24 horas ésta no se presentó en ausencia de fuente de carbono (Figura 7).



**Figura 7. *Aspergillus flavus* CECT – 2687.** 24 h de incubación, medio líquido con medio basal (MB) con sulfato de amonio y nitrato de sodio 0.5 % (v/v). Incubación; 37 ° C, 200 rpm y pH=5  
Fuente: Originado en este trabajo.

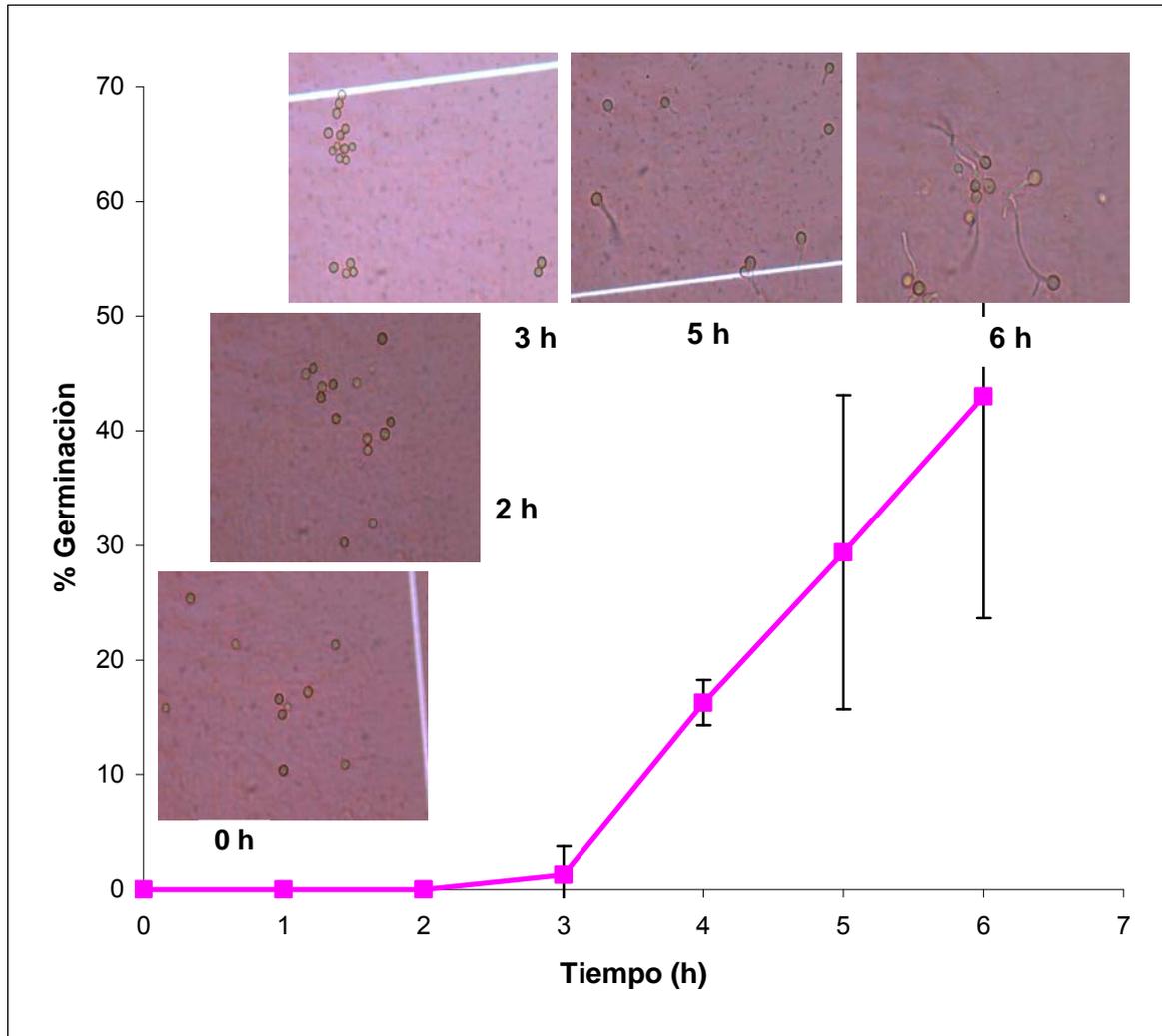
## **5.2. Cinética de la germinación conidial**

La germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687 fue seguida mediante la observación microscópica, especialmente cuando se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno, para lo cual se realizó un muestreo con intervalos de una hora cada uno y el conteo de esporas de cada una de las muestras que se tomaron.

Durante el seguimiento de la germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687 en medio basal (MB) con sulfato de amonio, se observaron cambios morfológicos muy lentos y graduales durante el tiempo que duró el ensayo, en los cuales se diferenciaron las tres etapas de la germinación conidial: (1) la activación en las 2 primeras horas de incubación, (2) el crecimiento isotrópico alrededor de las 3 horas donde hay un aumento de tamaño de todas las esporas y formación de agregados de estas, y a las 5 horas el cambio de este al (3) crecimiento polarizado que se caracteriza por la formación y elongación del tubulo germinal, para finalmente la ramificación de este para dar lugar a las hifas (D'Enfert, 1997) (Osherov Nir and May Gregory, 2000) ( Van Leare, 1986) (Lamarre *et al*, 2008). (Figura 8)

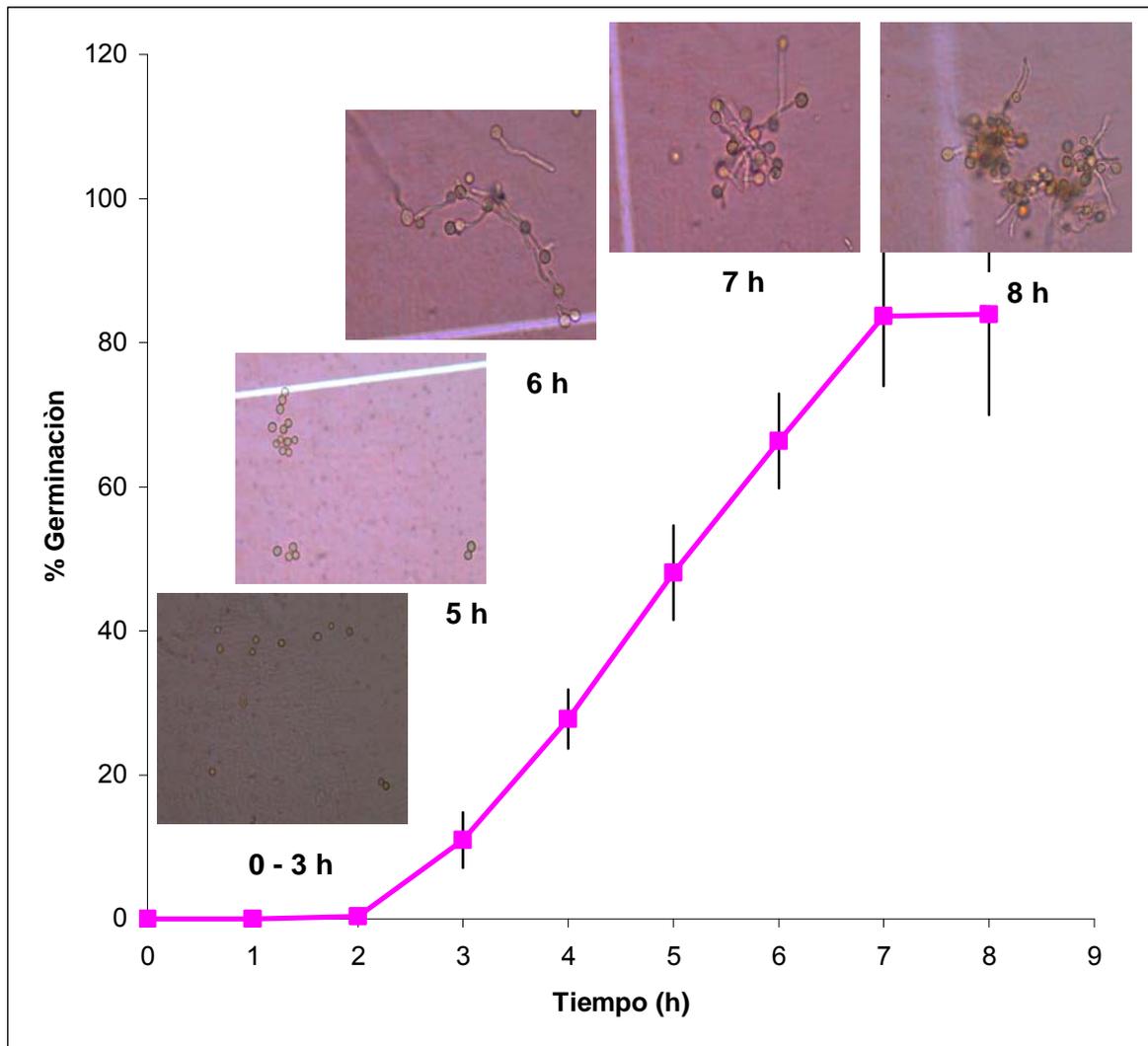
En los experimentos anteriores observamos que la germinación conidial fue más eficiente en medio basal (MB) con nitrato de sodio. Microscópicamente encontramos que las conidias se encuentran en estado de latencia por más tiempo (0 – 3 h) y sufren una activación y cambios morfológicos en un intervalo, durante las primeras 3 horas de incubación no se presenta cambio alguno, excepto el aumento de tamaño, conforme avanza el tiempo se observa la adhesión de esporas formándose agregados de éstas, a partir de las 6 horas los cambios físicos son más rápidos, la espora cambia rápidamente su

morfología: de una espora hidratada e hinchada a una conidia germinada, de aquí en adelante se observa la elongación del tubulo germinal y la formación de grandes agregados de esporas (Figura 9).



**Figura 8. Cinética de germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687.**

Fuente de carbono: pectina (Pect.), 0.5 % (p/v). Medio basal (MB) sulfato de amonio 0.5 % (v/v), como fuente de nitrógeno. Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5 (Imágenes originadas en este trabajo)

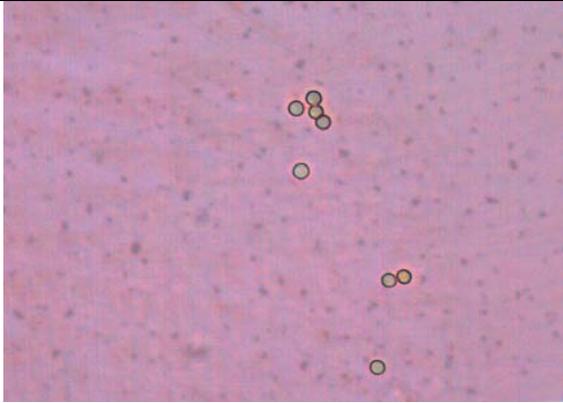
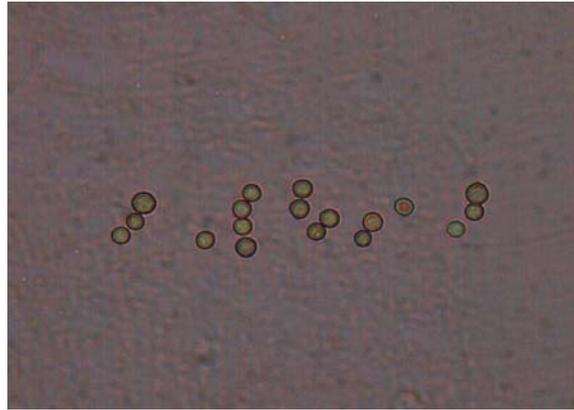
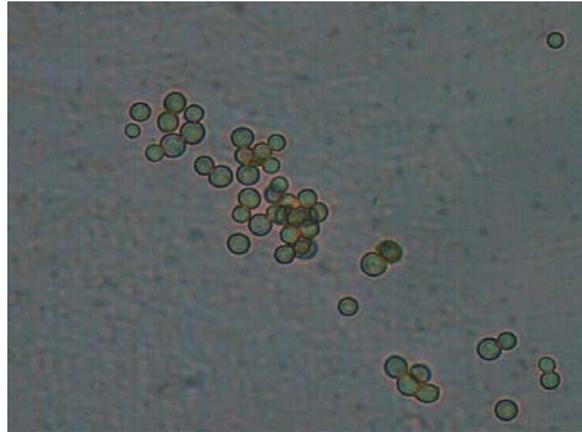


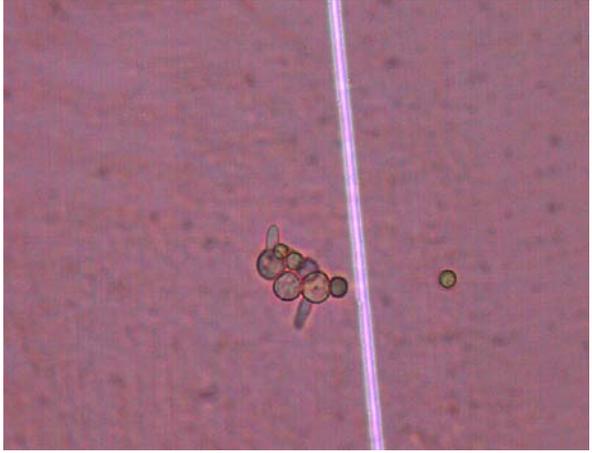
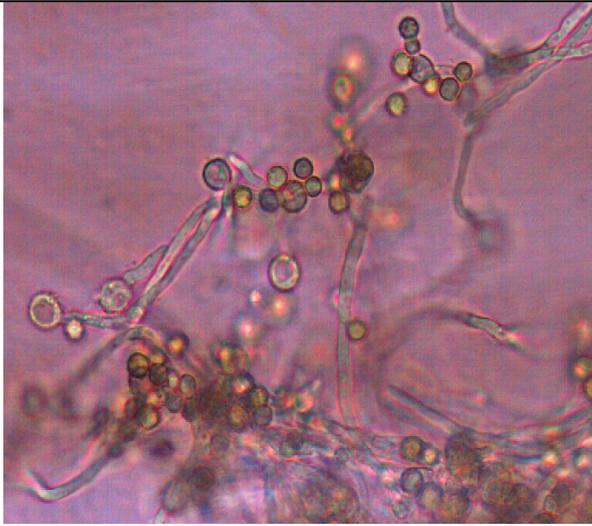
**Figura 9. Cinética de germinación de *Aspergillus flavus* CECT – 2687.**

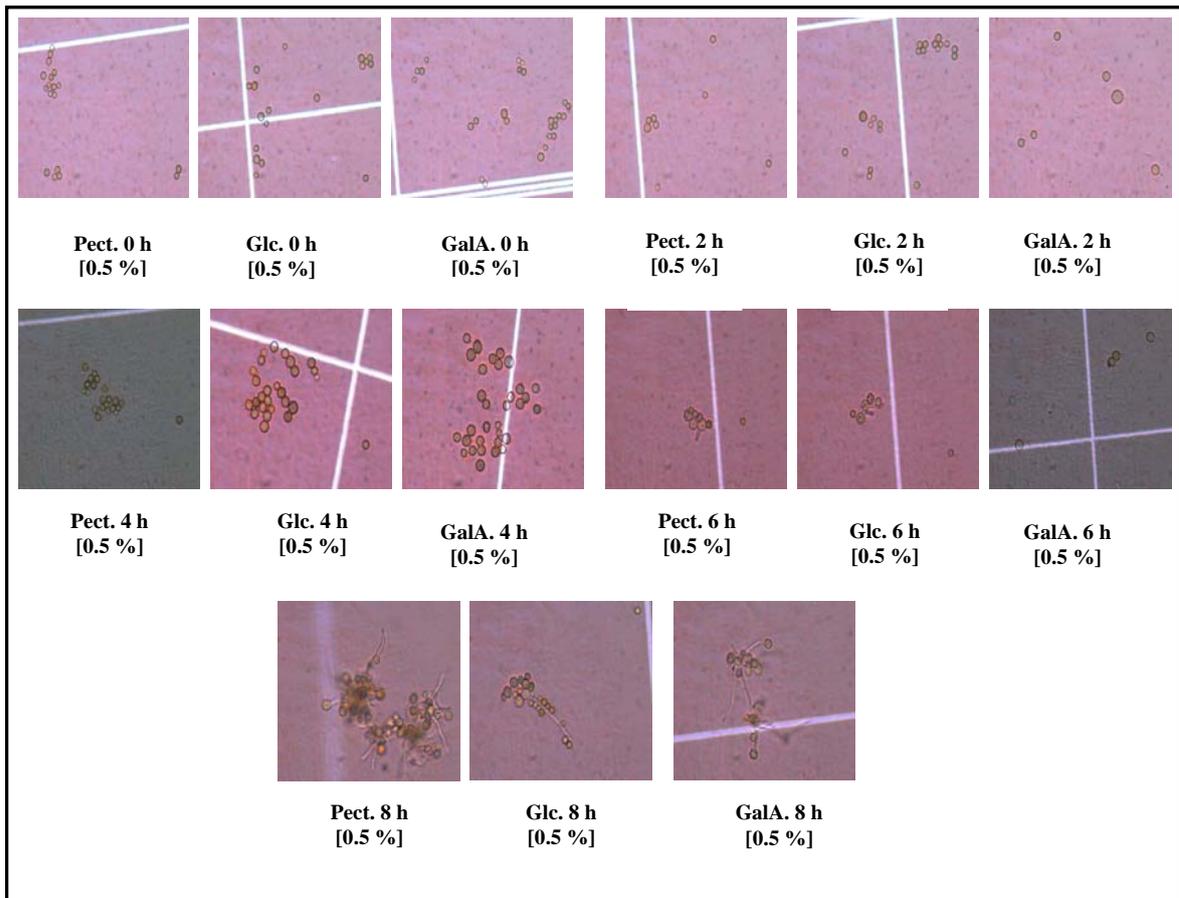
Fuente de carbono: pectina (Pect.), 0.5 % (p/V). Medio basal (MB) nitrato de sodio 0.5 % (v/v), como fuente de nitrógeno. Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5  
(Imágenes originadas en este trabajo)

Según nuestros datos la germinación conidial puede describirse de acuerdo a la Tabla 2 y Figura 10:

**Tabla 2. Descripción de la germinación conidial de *Aspergillus flavus* CECT – 2687**

Tiempo (h)	Fase	Descripción	Figura
0	Inoculación y activación	Las esporas presentan un tamaño uniforme. De acuerdo a datos experimentales anteriores el tamaño es aproximadamente de 3 $\mu\text{m}$ (Palomares Ruíz, 2006).	
2	Crecimiento isotrópico	Aumento significativo en el tamaño de la espóra; esta se hidrata, incrementando su tamaño de 3 a 7 $\mu\text{m}$ .	
4	Crecimiento isotrópico (Adhesión conidial)	Las esporas comienzan a adherirse unas con otras, se observan agregados de esporas en todo el campo de observación.	

6	Crecimiento polarizado	Este cambio se observa fácilmente ya que la espora cambia su forma, alargándose hacia los extremos, en algunas de ellas se observa como el tubo germinal comienza a emerger.	
7	Crecimiento polarizado (Establecimiento de la polarización)	El tubo germinal se elonga de manera rápida, este alcanza el doble o hasta el triple del diámetro de la espora en tan solo una hora, por lo que ya se diferencia la transición entre la etapa de la germinación conidial al crecimiento vegetativo.	
8	Crecimiento polarizado (Crecimiento vegetativo)	Formación de pellets a simple vista, al observar al microscopio este se puede ver como un agregado de esporas entrelazadas por medio de las hifas las cuales aumentan de tamaño de manera rápida	



**Figura 10. Seguimiento de la germinación conidial de *Aspergillus flavus* CECT – 2687.**

Fuente de carbono: pectina (Pect.), glucosa (Glc.) y ácido galacturónico (GalA.).

Medio basal (MB) sulfato de amonio 0.5 % (v/v).

Incubación: 37 ° C, 200 rpm y pH= 5.

Fuente: Originado en este trabajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que la fuente de nitrógeno más favorable para la germinación conidial era el medio basal (MB) con sulfato de amonio porque los eventos o etapas de la germinación se pueden ver con mayor claridad a lo largo del tiempo, a diferencia del medio basal (MB) de nitrato de sodio, ya que para el desarrollo de nuestro trabajo era de suma importancia observar detalladamente la germinación conidial (Figura 10).

### **5.3. Determinación del crecimiento celular**

Para evaluar la relación que existe entre el porcentaje de esporas germinadas con el crecimiento celular, se midió el peso seco a las 24 h de incubación.

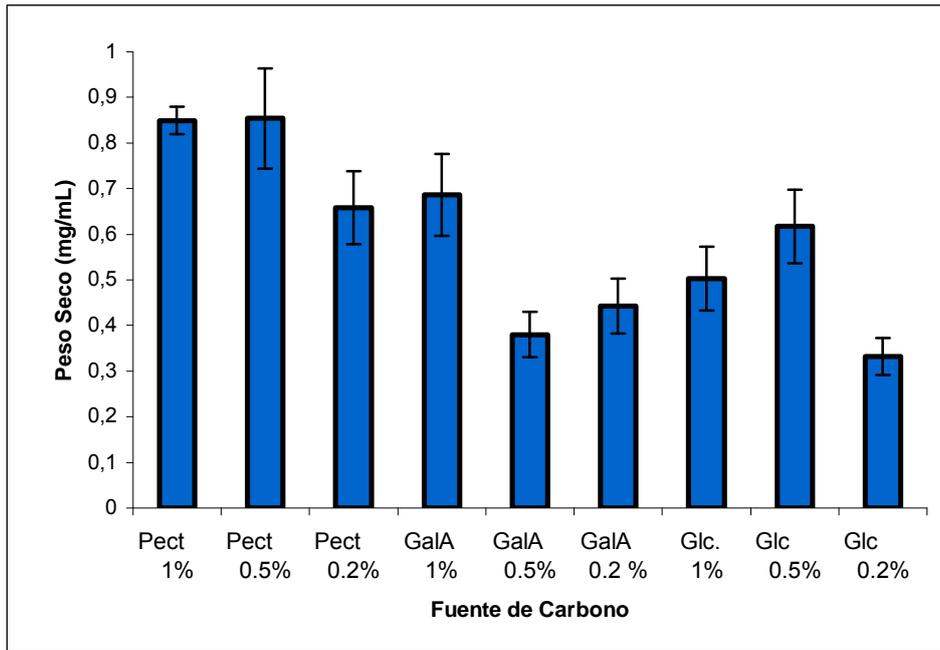
De manera general, se observa en la Figura 11 que hay una relación directa entre el porcentaje de esporas germinadas con la biomasa obtenida. Analizando la concentración del 0.5% para todas las fuentes de carbono utilizadas y usando como fuente de nitrógeno el sulfato de amonio, se observa que utilizando pectina se tiene un mayor crecimiento celular, 0.85 mg/mL; resultado que concuerda con el porcentaje de germinación del 46%, a diferencia de las otras dos fuentes de carbono donde, bajo estas mismas condiciones, el crecimiento es menor pero conserva la relación con el porcentaje de germinación; siendo el ácido galacturónico donde se obtiene el menor porcentaje de germinación 10%, y por lo tanto la menor biomasa 0.30 mg/mL, mientras que al disminuir la concentración al 0.2% esta se eleva (Figura 11).

Al hacer la comparación de la biomasa obtenida para todas las fuentes de carbono, usando la misma fuente de nitrógeno (Figura 11) con el porcentaje de germinación (Figura 5), se concluye que entre mayor número de esporas germinadas se obtendrá una mayor biomasa al final de la incubación de los medios de cultivo.

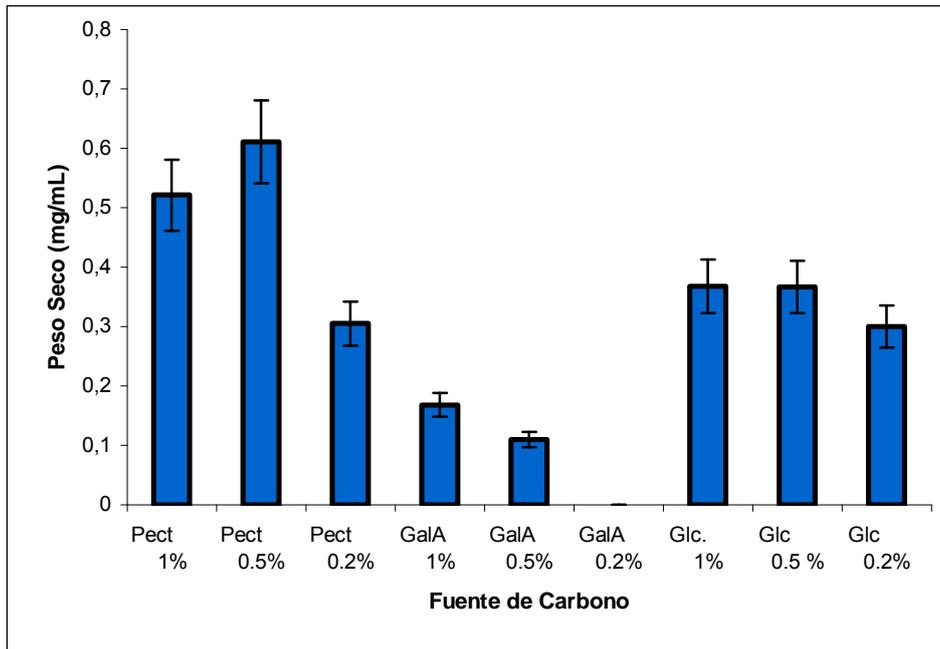
En cuanto al nitrato de sodio, los resultados presentan la misma tendencia que los resultados analizados anteriormente; sin embargo con la concentración del 0.2% los cambios son más drásticos en la pectina donde el porcentaje de germinación decae prácticamente hasta la mitad. Para el ácido

galacturónico, no hubo germinación y por lo tanto no se presentó crecimiento de la cepa (Figura 12).

En este experimento se comprobó nuevamente la relación que hay entre el porcentaje de germinación y la biomasa obtenida. Es en este experimento en particular se evidencia que la mejor fuente de nitrógeno es el medio basal (MB) con sulfato de amonio, debido a que en todas las fuentes de carbono utilizadas se obtiene una mayor biomasa, a diferencia del medio basal (MB) con nitrato de sodio, que aunque tenía un porcentaje de alrededor de un 20% mayor en comparación con el sulfato de amonio a las seis horas de incubación; este porcentaje es igualado y superado cuando se utiliza sulfato de amonio durante las últimas horas y al final de la incubación. En cuanto a la fuente de carbono se confirma que la mejor es la pectina a una concentración del 0.5%.



**Figura 11.** Crecimiento a las 24 h, de *Aspergillus flavus* CECT – 2687, cultivada en medio líquido con diferentes fuentes de carbono, medio basal (MB) sulfato de amonio, como fuente de nitrógeno 0.5 % (v/v). Incubación; 37 ° C, 200 rpm y pH=5



**Figura 12.** Crecimiento a las 24 h, de *Aspergillus flavus* CECT – 2687, cultivada en medio líquido con diferentes fuentes de carbono, medio basal (MB) nitrato de sodio, como fuente de nitrógeno, 0.5 % (v/v). Incubación; 37 ° C, 200 rpm y pH=5

De acuerdo a los resultados presentados hasta ahora concluimos que *Aspergillus flavus* CECT – 2687 es un hongo que se encuentra adaptado a crecer sobre sustratos complejos como los polisacáridos y no así sobre azúcares sencillos.

Esto concuerda con lo observado en la naturaleza, en donde los hongos se encuentran ampliamente distribuidos, iniciando la colonización sobre la pared celular de las plantas, compuesta principalmente por polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) (Jayani *et al*, 2005).

Los resultados muestran que la pectina favorece la germinación conidial, mientras que en azúcares sencillos, como la glucosa, los porcentajes obtenidos son menores. Por ello decidimos determinar si este comportamiento era exclusivo de la cepa de *Aspergillus flavus* CECT – 2687, por lo que se evaluaron otras tres cepas: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* N – 402 y *Aspergillus flavipes* FP – 500 utilizando las mismas condiciones; pectina, ácido galacturónico y glucosa como fuente de carbono al 0.5% y sulfato de amonio 0.5% como fuente de nitrógeno.

### **5.3.1. Efecto de la fuente de carbono en diferentes cepas de *Aspergillus***

Con la finalidad de evaluar el efecto que ejerce la fuente de carbono sobre diferentes cepas de *Aspergillus* se realizó un ensayo en el cual se siguió la germinación conidial de tres diferentes cepas, los resultados fueron los siguientes:

Se observa en la figura 13a que *Aspergillus nidulans* nuevamente presenta un porcentaje de germinación mayor en pectina, obteniéndose el 77% a las 6 horas de incubación, en comparación con glucosa y ácido galacturónico

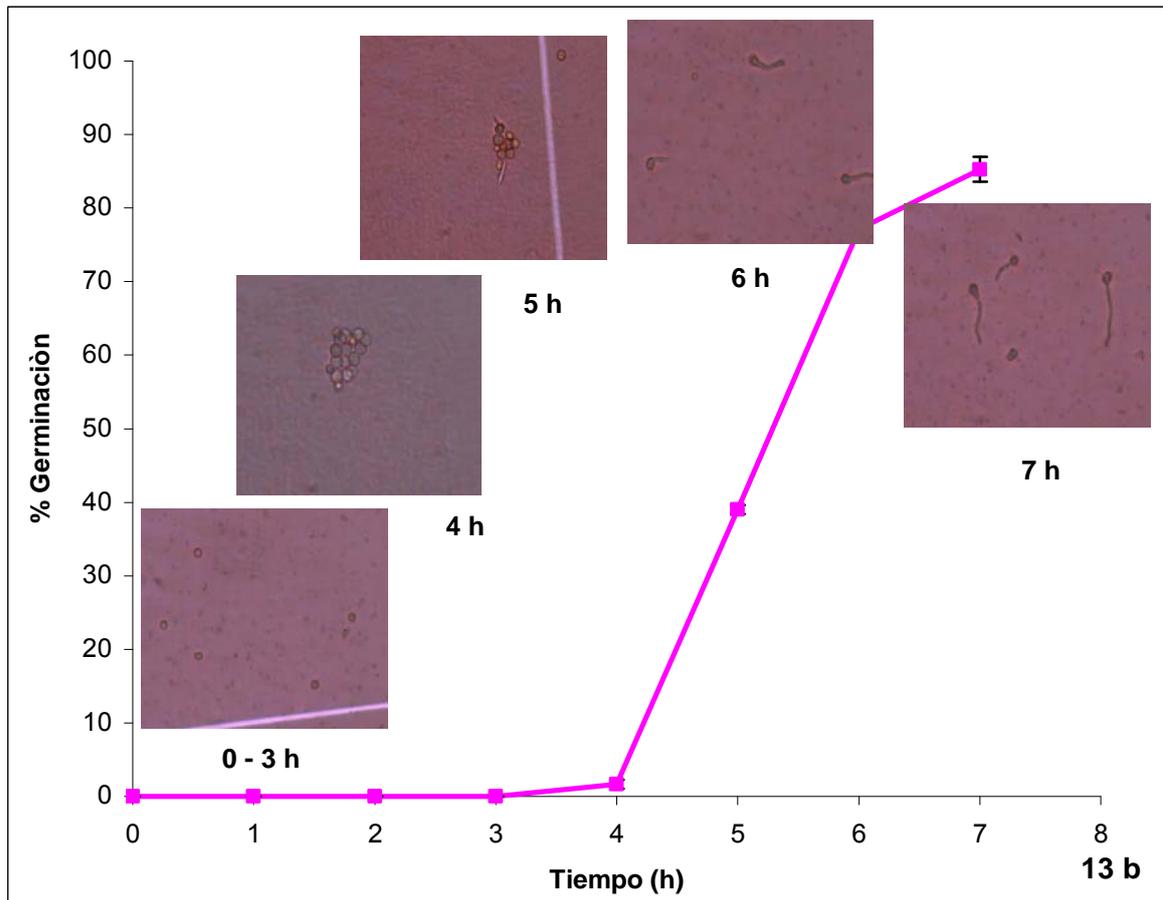
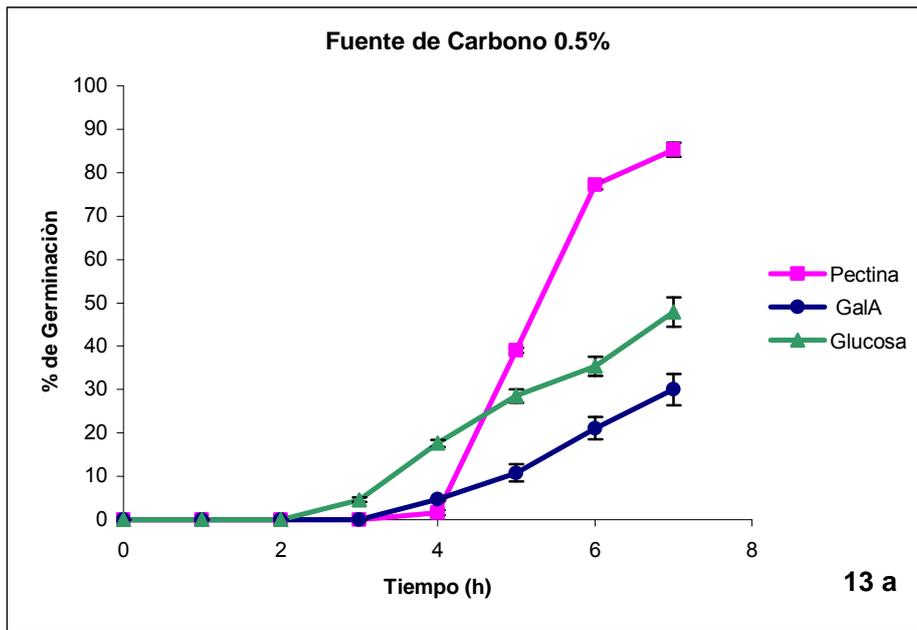
donde este porcentaje disminuye hasta 35 y 21% respectivamente. Para *Aspergillus niger* N- 402, se observa que no hay germinación cuando se utiliza ácido galacturónico como fuente de carbono, pero sí cuando esta en presencia de pectina que como en los casos anteriores tiene el porcentaje más alto de germinación, del 30% con los mismos períodos incubación (Figura 14 a). Este comportamiento puede ser debido a que el hongo al estar en presencia de este polisacárido lo hidroliza en moléculas de menor peso molecular, las cuales pueden entrar fácilmente a la conidia induciendo la síntesis de enzimas e iniciando la cascada de reacciones necesarias para la activación de las esporas; de esta manera la obtención de energía es de manera gradual. En cambio cuando se utiliza como fuente de carbono ácido galacturónico, estas moléculas de menor tamaño se encuentran en abundancia en el medio, y pueden provocar una represión catabólica por fuente de carbono como ha reportado Aguilar y Huitron, (1987) los cuales encontraron que la represión catabólica producida por los productos de degradación de la pectina depende de la concentración de ácido galacturónico liberado en dicha degradación, observando este fenómeno cuando el ácido es adicionado en altas concentraciones al medio de cultivo; mientras que a bajas concentraciones actúa como un inductor en la síntesis de enzimas. Así que su papel como inductor y/o represor está directamente relacionado con su concentración en el medio

Con respecto a la última cepa analizada, *Aspergillus flavipes* FP – 500, nuevamente tenemos que el porcentaje de germinación es mayor en pectina y disminuye en glucosa y ácido galacturónico (Figura 15 a).

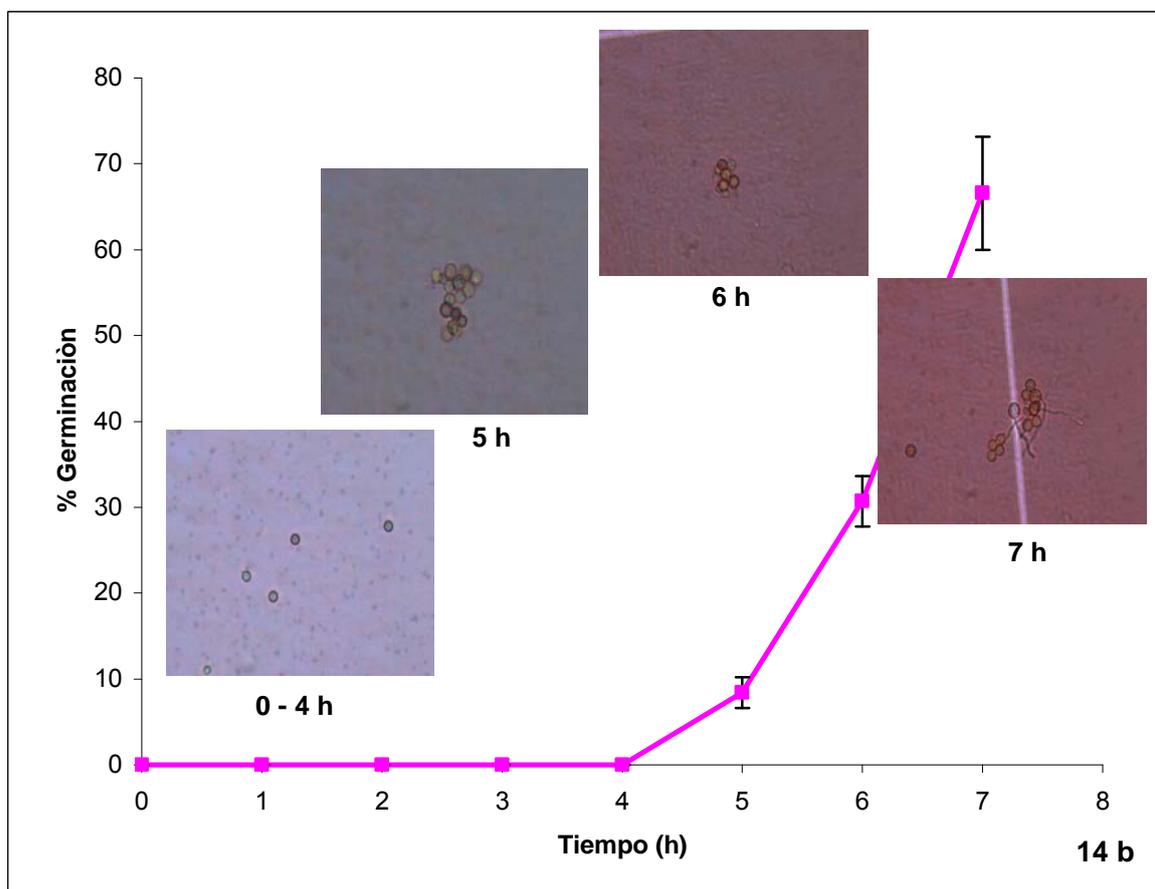
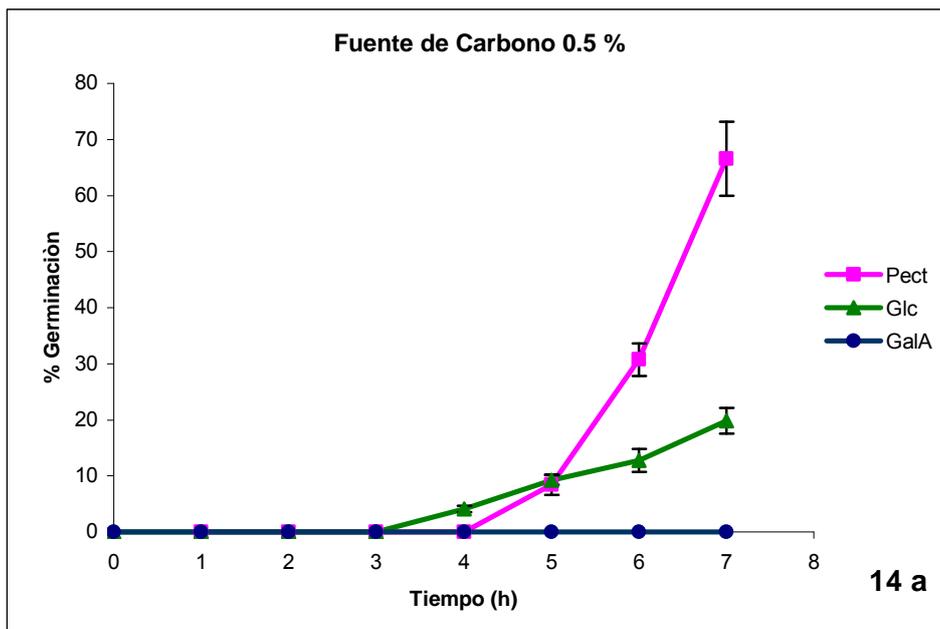
Estos resultados sugieren que el factor limitante en el crecimiento y desarrollo de los hongos del género *Aspergillus* en diferente fuente de carbono es la germinación conidial, en este fenómeno la transición del estado de latencia a la activación de las conidias se ve fuertemente influenciado por diversos factores entre los cuales destacan la fuente de carbono y su concentración, la fuente de nitrógeno; además de otros como la temperatura y el pH del medio (Gómez, 2006) (Araujo Ricardo y Gonçalves Acacio, 2004).

Resultados que coinciden con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo, en donde han encontrado una deficiencia en el crecimiento de los hongos en azúcares sencillos atribuyendo ésta en gran medida a la germinación conidial (Fabela Leal, 2000; Gómez, 2006; Palomares Ruíz, 2006; Victoria Acosta, 2007).

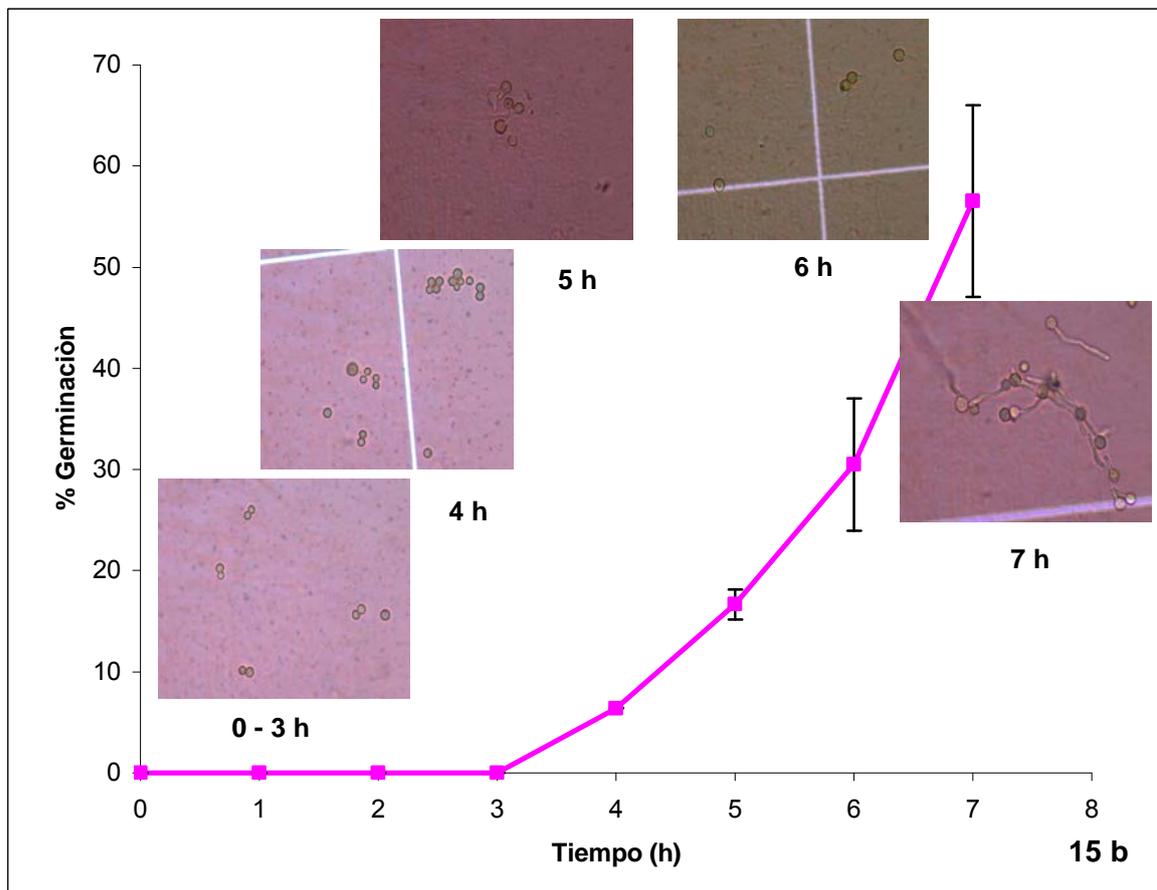
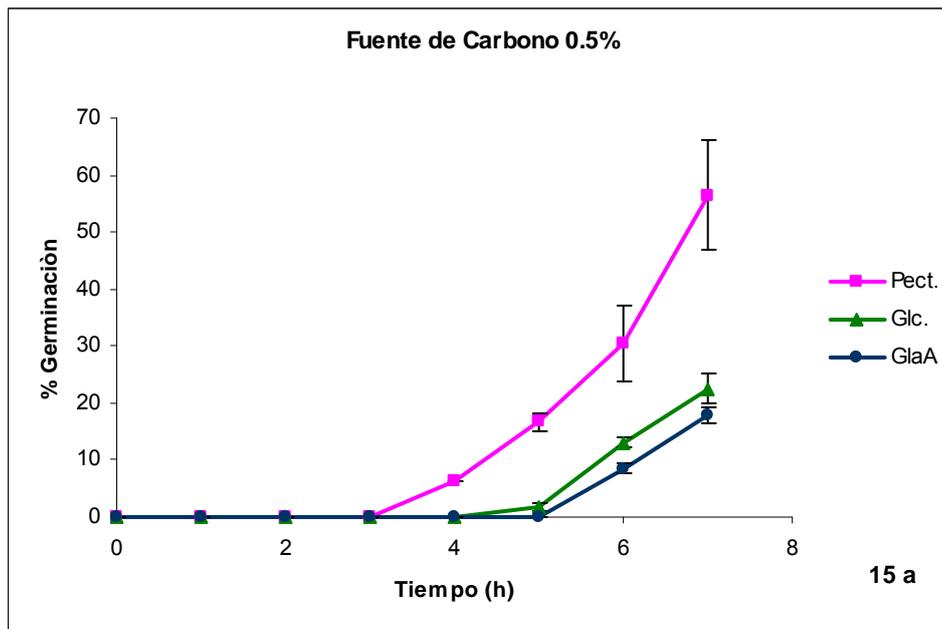
Con respecto a la cinética de germinación que se realizó con *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* N – 402 y *Aspergillus flavipes* FP – 500; encontramos un comportamiento parecido al de *Aspergillus flavus* CECT – 2687. El único cambio entre estos experimentos fueron los cambios morfológicos, los cuales se presentaron en un intervalo mayor; mientras que entre las cepas seleccionadas de *Aspergillus* para este experimento se observó un comportamiento similar.



**Figura 13. Cinética de germinación de *Aspergillus nidulans*.**  
Fuente de carbono pectina (Pect.) 0.5 % (p/v), medio basal (MB) sulfato de amonio 0.5 % (v/v).  
Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5  
(Imágenes originadas en este trabajo)



**Figura 14. Cinética de germinación de *Aspergillus niger* N - 402.**  
Fuente de carbono pectina (Pect.) 0.5 % (p/v), medio basal (MB) sulfato de amonio 0.5 % (v/v).  
Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5  
(Imágenes originadas en este trabajo)



**Figura 15. Cinética de germinación de *Aspergillus flavipes* FP – 500.**  
Fuente de carbono pectina (Pect.) 0.5 % (p/v), medio basal (MB) sulfato de amonio 0.5 % (v/v).  
Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5  
(Imágenes originadas en este trabajo)

Tomando en cuenta la similitud en los cambios morfológicos durante el seguimiento de la germinación de las tres cepas analizadas observamos que en las 3 primeras horas después de la inoculación las conidias se encontraron en estado de latencia, el único cambio notable fue el aumento de tamaño debido en gran parte a la absorción de agua presente en el medio; para las 4 horas comienzan a adherirse unas conidias con otras para formar agregados de esporas, en la hora 5 comienza la formación del tubulo germinal y para las últimas horas de incubación se elonga el tubulo germinal de manera rápida y comienzan a formarse agregados de esporas entrelazadas para dar paso a la transición entre la etapa de la germinación conidial al crecimiento vegetativo (Figura 13 b, 14 b y 15 b).

Los resultados obtenidos nos indican que la preferencia de *Aspergillus flavus* CECT – 2687 por la pectina no es exclusiva de esta cepa, si no que este comportamiento se extiende de manera similar a las cepas analizadas anteriormente, ya que en las tres se observa de manera marcada que la germinación conidial se ve favorecida en este polisacárido donde los porcentajes de germinación son los más altos, oscilando entre el 60 y 80%; y en cambio hay una disminución en estos porcentajes cuando se utilizaron fuentes sencillas de carbono como la glucosa o el ácido galacturónico.

Debido al bajo crecimiento y el deficiente porcentaje de germinación que presentaron las cepas de *Aspergillus* en azúcares sencillos, en particular la glucosa; se realizó un nuevo experimento donde se comparó el porcentaje de germinación usando como fuente de carbono pectina, glucosa y una fuente compleja de energía, el extracto de levadura a una concentración del 1%, con una variación la adición en glucosa de este extracto pero a una concentración

de 0.1%. La fuente de nitrógeno utilizada fue medio basal (MB) con sulfato de amonio.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla .

<b>Tabla 3. Cinética de germinación de <i>Aspergillus flavus</i> CECT – 2687</b>			
<b>Fuente de carbono</b>	<b>Extracto de Levadura</b>	<b>% de Germinación</b>	<b>Peso seco (mg/mL)</b>
Pectina	-----	60 ± 4	1.094 ± 0.05
Glucosa	-----	12 ± 5	0.491 ± 0.06
Ninguna	+++	65 ± 6	1.1 ± 0.15
Glucosa	+++	84 ± 6	1.94 ± 0.12

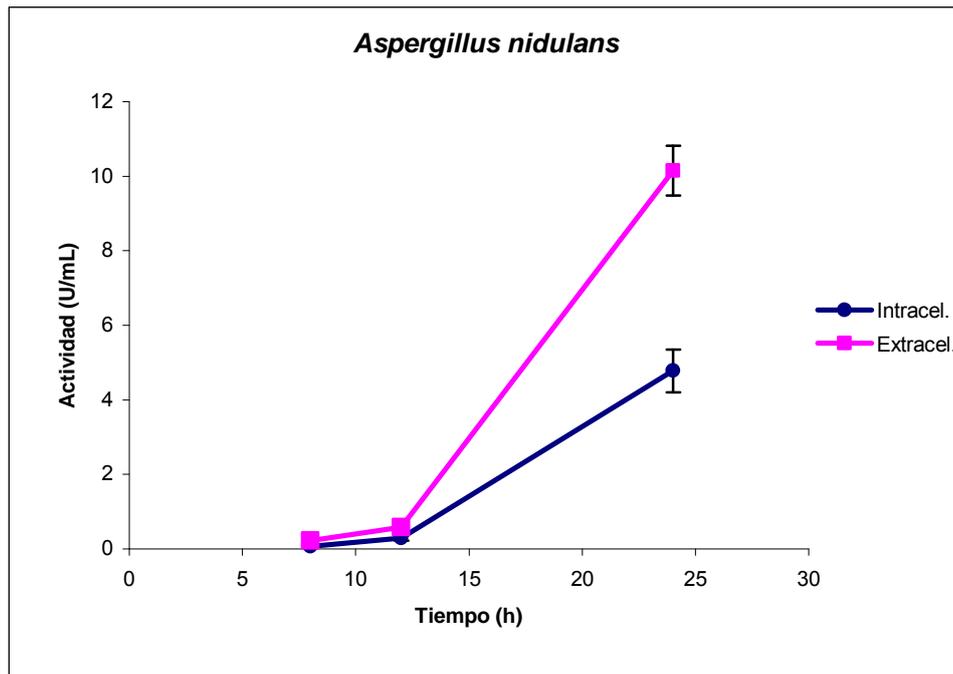
Los resultados muestran nuevamente que el porcentaje de germinación es mayor en pectina que en glucosa, con una diferencia del 40%, mientras que al comparar la pectina y el extracto de levadura el porcentaje es mayor en la última fuente de carbono, con una diferencia estadísticamente insignificante. En cambio, cuando se adicionó extracto de levadura a la glucosa el porcentaje de germinación aumenta de manera considerable, aproximadamente 7 veces, con el consecuente aumento en la cantidad de biomasa, a diferencia de cuando se usa glucosa exclusivamente. Lo cual nos indica que existen ciertas diferencias en cuanto a la forma de metabolizar y aprovechar las fuentes de carbono y el extracto de levadura presentes en el medio, afectando de manera directa el fenómeno de la germinación conidial.

#### **5.4. Evaluación de la actividad exo – pectinolítica**

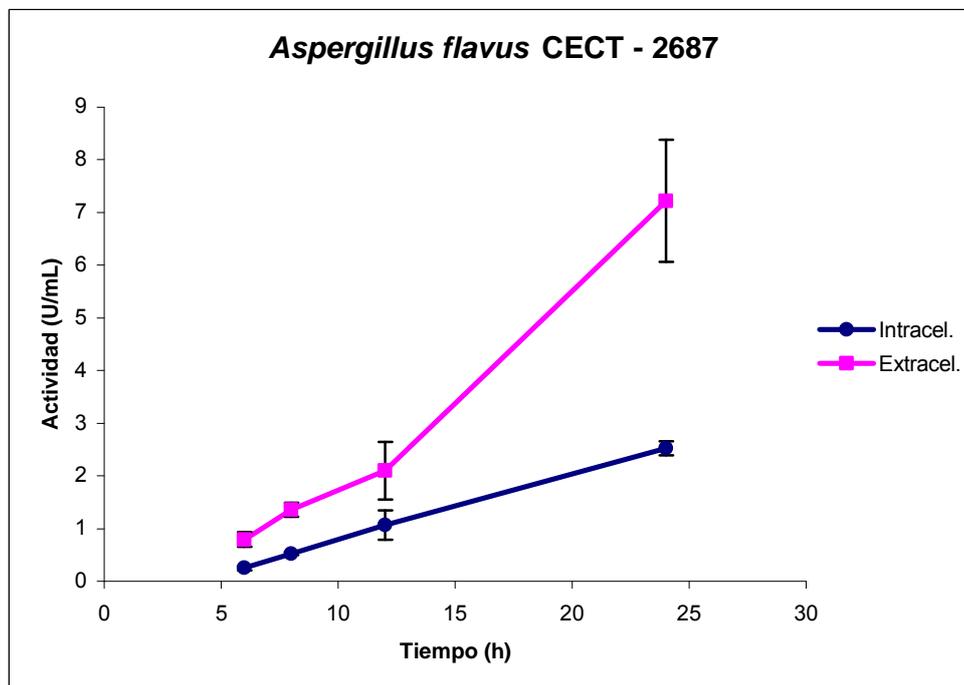
Para evaluar la actividad exo – pectinolítica se emplearon las cepas de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus níger* N – 402 y *Aspergillus flavipes* FP – 500, a partir de muestras tomadas en el tiempo 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h de las cuales se obtuvo la fracción intra y extracelular para cada una de ellas. Es importante

mencionar que a partir de este experimento se variaron dos de las condiciones en la incubación de las cepas, la concentración en la fuente de carbono, que se cambio al 1%; ya que a esta concentración hay una mayor producción de actividad exo – pectinolítica a diferencia del 0.5% donde la actividad es mínima. El segundo cambio fue en el pH de trabajo que fue de 3.5, porque es el más favorable para la actividad exo.

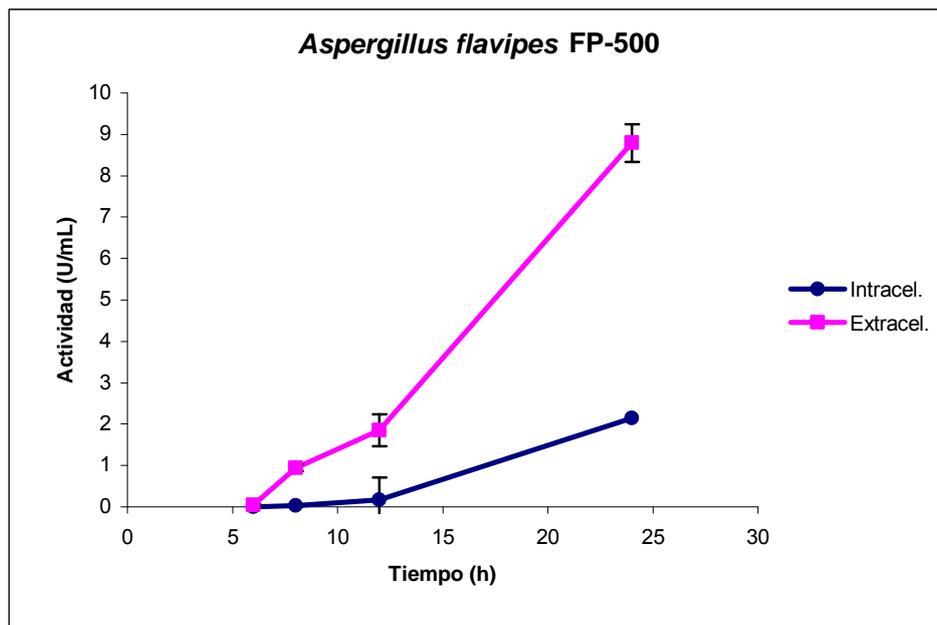
Los resultados obtenidos muestran de manera general que hay actividad pectinolítica en ambas fracciones. La producción de actividad exo – pectinolítica es mayor en la fracción extracelular que en la intracelular, aunque después de las primeras 6 horas a partir de la de la inoculación la variación es mínima, conforme aumenta el tiempo de incubación esta diferencia aumenta, duplicando el valor de la actividad intracelular a las 24 h de incubación (Figuras 16, 17 y 18)



**Figura 16. Producción de actividad exo-pectinolítica de *Aspergillus nidulans*.** Fuente de carbono pectina (Pect.) 1 % (p/v), medio basal (MB) con sulfato de amonio 0.5 % (v/v). Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=3.5



**Figura 17. Producción de actividad exo-pectinolítica de *Aspergillus flavus* CECT - 2687.** Fuente de carbono pectina (Pect.) 1 % (p/v), medio basal (MB) con sulfato de amonio 0.5 % (v/v). Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=3.5



**Figura 18. Producción de actividad exo-pectinolítica de *Aspergillus flavipes* FP – 500.** Fuente de carbono pectina (Pect.) 1 % (p/v), medio basal (MB) con sulfato de amonio 0.5 % (v/v). Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=3.5

En el caso de *Aspergillus nidulans* la actividad exo - pectinolítica en ambas fracciones presenta valores con una diferencia mínima de 0.15 U/mL hasta las 12 horas; sin embargo aunque la actividad en las dos fracciones aumenta la diferencia entre ambas es muy grande; ya que se obtienen valores de 4.7 U/mL en la fracción intracelular, mientras que para la fracción extracelular se obtiene aproximadamente 10 U/mL; un aumento de más del doble (Figura 16).

Una tendencia similar presentan *Aspergillus flavus* CECT – 2687 y *Aspergillus flavipes* FP – 500; aunque en estas cepas se observa desde el inicio que las dos fracciones presentan valores de actividad muy diferentes; se observó una marcada diferencia en *A. flavus* CECT – 2687 ya que aquí al inicio tenemos una diferencia entre ambas fracciones de 0.5 U/mL, incrementando este valor conforme avanzó el tiempo de incubación, obteniendo para el final del ensayo una diferencia de 4.5 U/mL; para finalizar nuevamente con una

mayor actividad en la fracción extracelular (Figura 17). *A. flavipes* FP – 500 tiene un valor semejante en ambas fracciones al inicio del ensayo pero al igual que las cepas anteriores esta diferencia aumenta en función del tiempo; presentando desde las 8 h un cambio marcado que va de 0.03 U/mL para la fracción intracelular a 0.95 U/mL para la extracelular; y para el final del ensayo la diferencia entre ambas es aproximadamente de 6 U/mL (Figura 18).

Los resultados indican que la actividad exo – pectinolítica esta asociada con la germinación conidial; ya que la producción de enzimas se incrementa conforme avanza la germinación. Al inicio la diferencia en ambas fracciones es mínima, lo que concuerda con la etapa en que la conidia se adapta al medio y pasa de un estado de latencia a un estado activado, conforme avanza el tiempo las conidias cambian de la activación al crecimiento isotrópico etapa muy importante donde se lleva a cabo la síntesis de macromoléculas necesarias para el crecimiento como son enzimas, proteínas, etc., lo que de manera similar se refleja en el aumento de la actividad en ambas fracciones, el cual en las tres cepas este valor aumenta al doble.

### **5.5. Tinción de núcleos**

Con la finalidad seguir los eventos intracelulares que se llevan a cabo durante la germinación conidial y tener otro punto de vista acerca de la importancia que tiene la germinación en el ciclo de vida de los hongos filamentosos, se realizó una tinción de núcleos para observar de manera más detallada cada una de las etapas que tienen lugar durante este fenómeno.

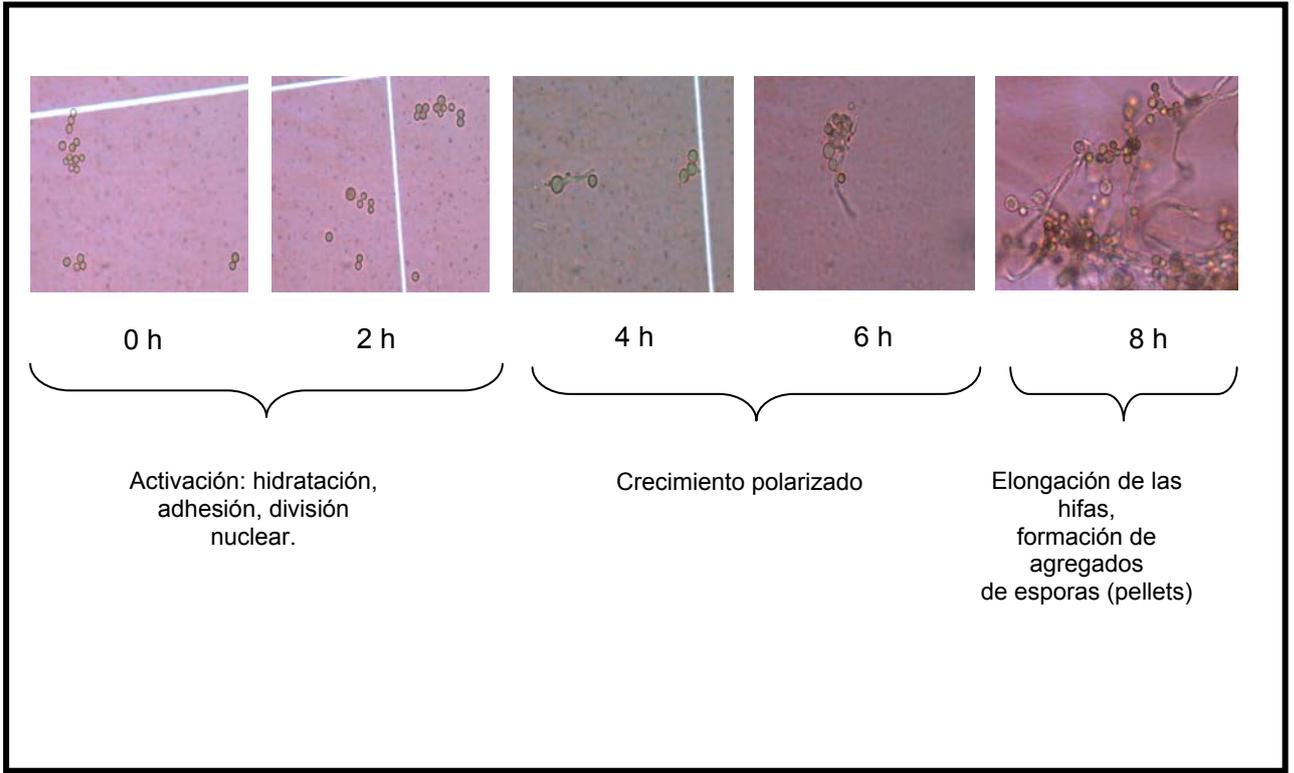
Como se ha mencionado con anterioridad es necesario que las conidias se encuentren en una fuente adecuada de carbono para que se

active e inicie la cascada de reacciones fisiológicas y bioquímicas que dan paso a este fenómeno, las cuales a *grosso* modo son: la activación e hidratación de las esporas (crecimiento isotrópico), duplicación y organización de los núcleos, acompañado por cambios en la pared celular de las conidias adhiriéndose unas con otras (crecimiento isotrópico) y por último el establecimiento del crecimiento polarizado que conlleva a la formación y elongación del tubo germinal que da lugar a las hifas. Y al mismo tiempo la división y la migración de los núcleos hacia el tubo germinal (Figura 19 y 20).

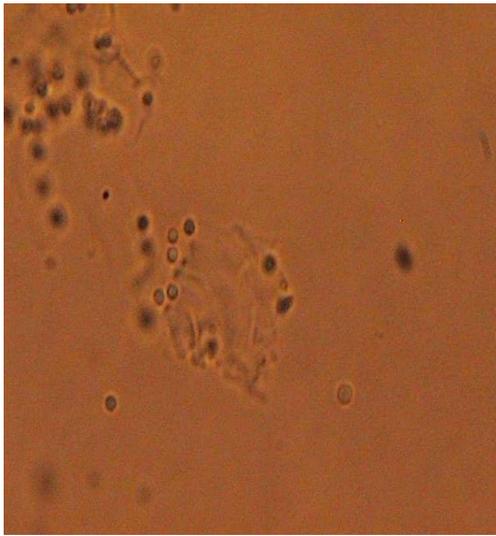
Durante este experimento se observó claramente el inicio de la germinación conidial, que es la activación de las esporas, ya que las esporas activadas se tiñen con DAPI. Para que se lleve a cabo la tinción con el colorante es necesario que el DNA del núcleo se organice, que pase del estado hipercondensado, *fase G1*, a la *fase G2*; y así el colorante pueda reaccionar con los residuos de adenina y timina en el DNA y formar enlaces fácilmente identificables por la emisión de fluorescencia (Figura 20 a).

Al seguir la germinación en el transcurso del tiempo, se observan claramente todas las etapas posteriores a la activación, la duplicación de los núcleos y la organización de estos; la migración hacia el tubo germinal conforme éste se va alongando durante el crecimiento polarizado;

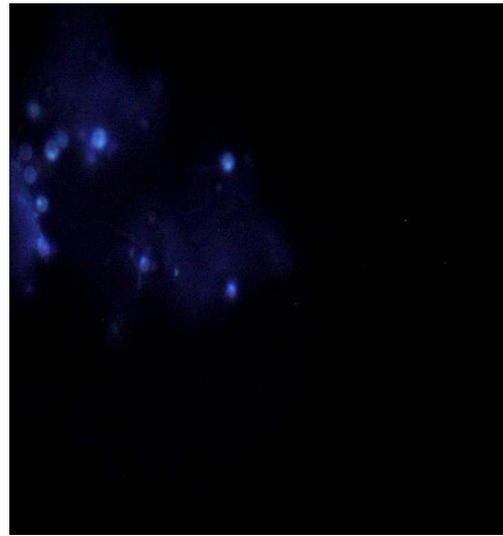
Es en este experimento donde también se observa la deficiencia que se presenta durante la germinación, ya que no todas las esporas se activan, quedando en estado de latencia, sugiriendo que la transición del estado de latencia a la activación de las conidias es un factor limitante en la reproducción, crecimiento y desarrollo de los hongos del género *Aspergillus*.



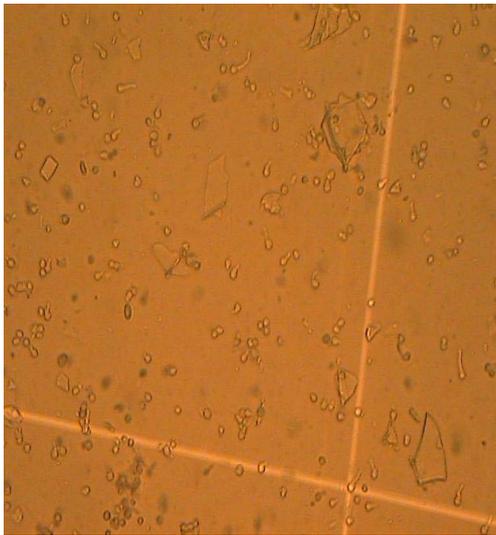
**Figura 19. Germinación conidial de *Aspergillus nidulans***  
 Fuente: Originado en este trabajo.



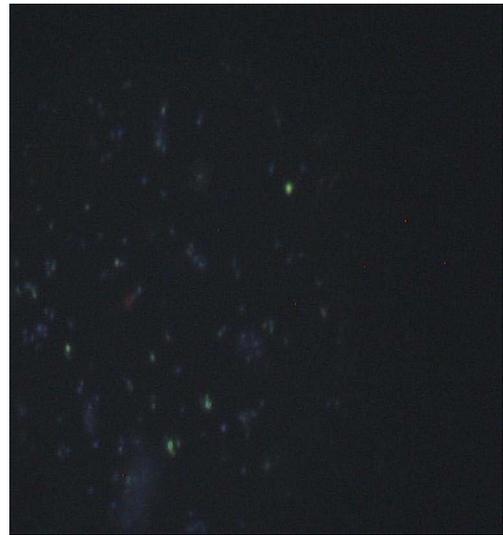
2 h



2 h



4 h

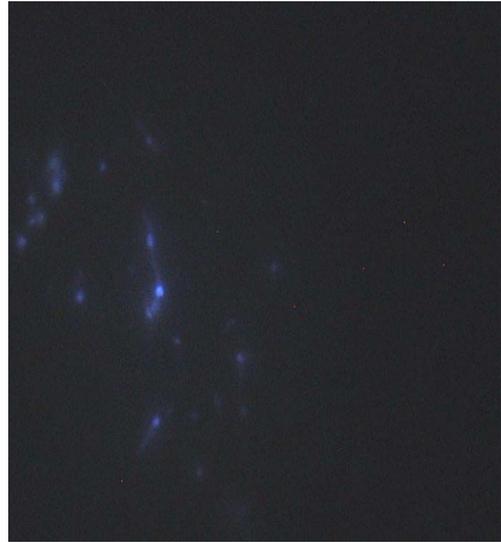


4 h

Fig. 20 a



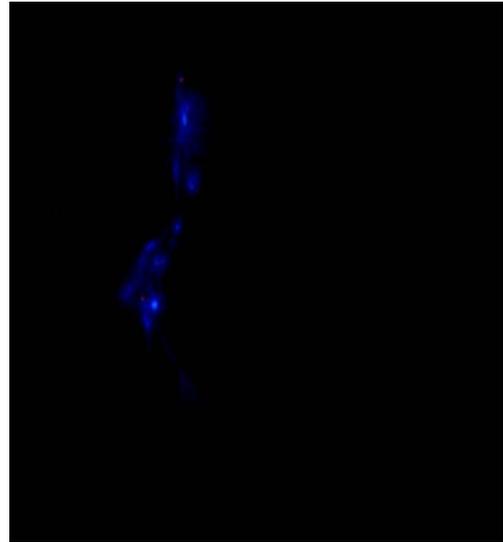
6 h



6 h

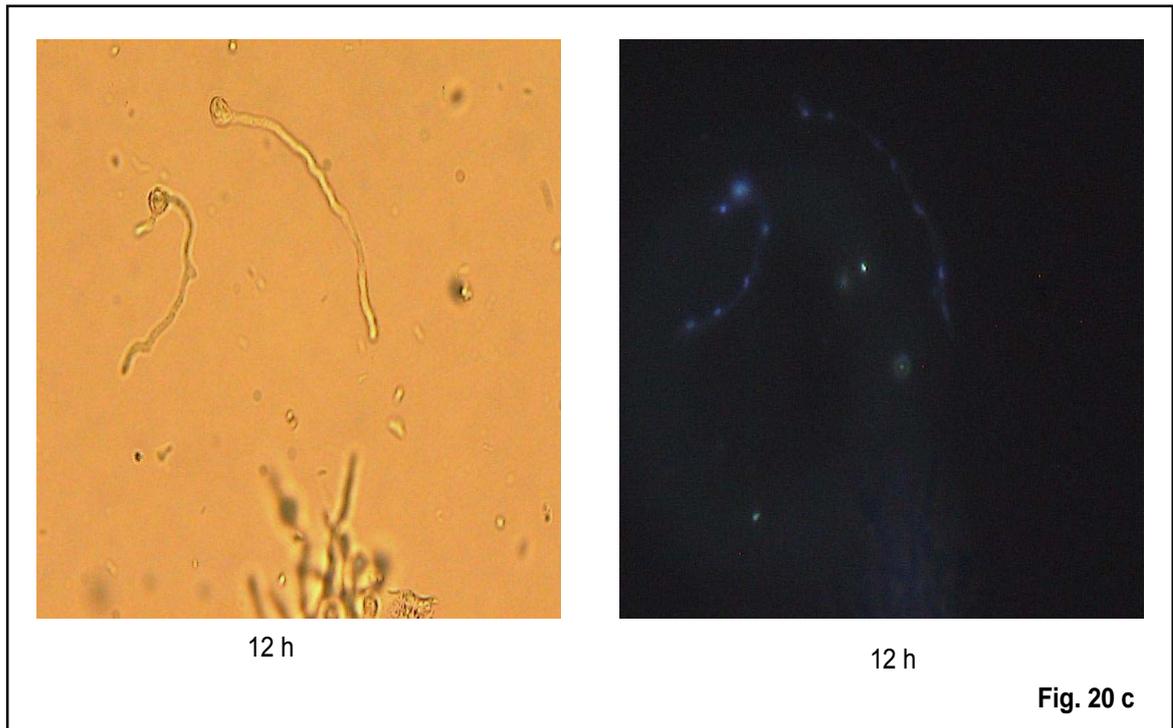


8h



8 h

**Fig. 20 b**



**Figura 20. Tinción de núcleos de *Aspergillus nidulans*.**

Fuente de carbono pectina (Pect.) 0.5 % (p/v), medio basal (MB) con sulfato de amonio 0.5 % (v/v).

Incubación: 37 °C, 200 rpm y pH=5

Fuente: Originado en este trabajo.

## CAPITULO VI

### 6. DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se evaluó la influencia que tiene la fuente de carbono, la concentración de ésta y la fuente de nitrógeno sobre la germinación conidial. Así como los niveles de actividad pectinolítica en extractos intracelulares y extracelulares en diferentes etapas de la germinación.

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento de *Aspergillus flavus* CECT – 2687 está fuertemente influenciado por la fuente de carbono, de acuerdo a éstos se determinó que el sustrato más favorable para tal efecto era la pectina en comparación con fuentes de carbono sencillas, como el ácido galacturónico y en especial la glucosa. Comportamiento no esperado ya que la mayoría de los microorganismos crecen de una manera más favorable en monosacáridos que en oligosacáridos o polisacáridos, en donde primero es necesario hacer un gasto energético para sintetizar enzimas que degraden la red polimérica.

En cuanto a las concentraciones utilizadas para la fuente de carbono, es al 0.5% donde se observó que el porcentaje de germinación es el más alto desde las primeras horas de incubación hasta el término del ensayo, influyendo de manera positiva en la germinación conidial ya que es en esta concentración donde este fenómeno se lleva a cabo de manera más rápida.

Para la fuente de nitrógeno, se determinó que la mejor es el medio basal (MB) con sulfato de amonio, ya que (durante los experimentos realizados) se observó en esta fuente que los cambios morfológicos son más lentos y graduales, factor importante para el desarrollo de este trabajo el observar detalladamente la germinación conidial, así como cada uno de los pasos

durante esta etapa. Los resultados que confirmaron que la mejor fuente de nitrógeno es el sulfato de amonio, fueron los de crecimiento celular, donde se observa de manera muy marcada cómo se obtiene una mayor producción de biomasa.

También se observó que el crecimiento de la cepa depende en gran medida de la germinación conidial, ya que la biomasa obtenida comparada con el porcentaje de germinación mantiene una relación directa. A un mayor número de esporas germinadas se obtiene una mayor biomasa al final.

Estos resultados nos indican que *Aspergillus flavus* CECT – 2687 es un hongo adaptado a crecer sobre sustratos complejos, como la pectina. Al analizar otras cepas de *Aspergillus* encontramos que este comportamiento no era exclusivo de *Aspergillus flavus* CECT – 2687, si no que se extiende de manera similar a las otras cepas analizadas - *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* N – 402 y *Aspergillus flavipes* FP – 500- ya que en las tres se observó que la germinación se ve favorecida en este polisacárido donde los porcentajes de germinación son los más altos y en cambio hay una disminución de ellos cuando se utilizó glucosa o ácido galacturónico.

Lo anterior indica una mejor adaptación de estos microorganismos para crecer sobre sustratos complejos (pectina) que sobre sustratos sencillos (glucosa y ácido galacturónico), puesto que en la naturaleza los azúcares sencillos están siempre en concentraciones muy bajas. Adaptación que favorece a los hongos para crecer y colonizar tejidos vegetales.

Por otro lado, la adición de extracto de levadura a la glucosa aumentó de manera considerable el porcentaje de germinación, obteniéndose valores por encima de la glucosa sola, e incluso sobrepasando el porcentaje de

germinación obtenido con la pectina. Estos resultados sugieren que existen ciertas diferencias en cuanto a la forma de metabolizar y aprovechar los nutrientes presentes en el medio, afectando de manera directa el fenómeno de la germinación conidial.

En cuanto a la actividad exo – pectinolítica, los resultados muestran que esta actividad está asociada con la germinación conidial porque la producción de enzimas se incrementa conforme aumenta el tiempo. Esto coincide con la transición que sufren las conidias del estado de latencia a la activación, el cambio al crecimiento isotrópico y de esta etapa al estado vegetativo. El encontrar valores mayores de actividad en la fracción extracelular en un periodo corto, nos indica que cuando las conidias tienen una fuente de carbono adecuada, comienzan a secretar enzimas al medio para poder hidrolizar los polisacáridos en moléculas de menor peso molecular que pueden entrar fácilmente a las células para cubrir y dar sustento a la serie de reacciones biológicas necesarias para activar su metabolismo.

La tinción de núcleos muestra una perspectiva diferente acerca de la importancia que tiene la germinación en el ciclo de vida de los hongos filamentosos. Los resultados obtenidos muestran claramente el inicio de la germinación, que es la activación de las esporas, debido a que estas se tiñen con el colorante (DAPI), y la transición a las etapas posteriores a la activación.

En este experimento también observamos la deficiencia que se presenta durante la germinación, puesto que no todas las esporas se activan permaneciendo en estado de latencia, sugiriendo que este paso, la transición del estado de latencia a la activación de las conidias es un factor limitante en

la reproducción, crecimiento y desarrollo de los hongos del genero *Aspergillus*.

## CAPITULO VII

### 7. CONCLUSIONES

- Se identificaron y describieron las diferentes etapas de la germinación conidial.
- La germinación conidial se ve fuertemente afectada por la fuente de carbono, la concentración de ésta, y la fuente de nitrógeno: para tal efecto tenemos que la pectina, a una concentración al 0.5%, es la fuente de carbono donde la germinación conidial se ve favorecida. Mientras que la mejor fuente de carbono fue el medio basal (MB) con sulfato de amonio.
- Se encontró una relación directa entre el número de esporas germinadas y la biomasa obtenida.
- Se determinó que la actividad exo – pectinolítica está asociada a la germinación conidial. La fracción extracelular presenta los valores más altos de actividad exo – pectinolítica, lo que indica que las conidias secretan enzimas al medio para degradar los polisacáridos, y obtener la energía necesaria para cubrir sus necesidades metabólicas.
- Se observaron los eventos celulares que se llevan a cabo durante la germinación conidial: la activación de las conidias, la duplicación y organización de los núcleos.
- Se obtuvieron y estandarizaron los protocolos de las metodologías de germinación conidial y tinción de núcleos.



## 8. REFERENCIAS

1. Aguilar Guillermo and Huitron Carlos. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 9, 690 – 696, 1987.
2. Araujo Ricardo and Gonçalves Rodrigues Acacio. Variability of germinative potencial among pathogenic species of *Aspergillus*. *Journal of Clinica Microbiology*, 4335 – 4337, 2004.
3. Belaish Ravit, Sharon Haim, Levdnasky Emma, Greenstein Shulamit, Shadkchan Yana, Osherov Nir. The *Aspergillus nidulans* *cet A* and *cal A* genes are involved in conidial germination and cell wall morphogenesis, *Fungal Genetics Biology*, 2007.
4. Bonifaz Alexandro. *Micología Médica Básica, Segunda Edición*, Francisco Méndez Cervantes, Francisco Méndez Oteo; México, D.F., Págs.17 – 28, 2005.
5. Bussink Henk – Jan, Osmani Stephen A. A mitogen – activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*, *FEMS Microbiology Letters* 173, 117 – 125, 1999.
6. D'Enfert Christophe, Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*, *Fungal Genetics and Biology* 21, 163-172, 1997.
7. Fabela Leal Sara. Secreción de pectinasas extracelulares de *Aspergillus* MGM-180 en condiciones extremas de pH. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F., pág. 2-11, 2000.

- 8.** Gómez Sánchez E. Identificación y comparación de las pectinasas extracelulares producidas por cepas de *Aspergillus flavus*., Tesis Maestría, UNAM, México, D.F., pág. 9-11, 2006.
- 9.** Greenstein Shulamit, Shadkchan Yona, Jadoun Jeries, Sharon Chaim, Markovich Sarit, Osherov Nir, Analysisi of the *Aspergillus nidulans* thaumatin – like *cet A* gene and evidence for transcriptional repression of *pyr4* expression in the *cet A* – disrupted strain, fungal Genetics and biology 43, 42 – 53, 2005.
- 10.** Guzmán Bedolla Selene. Identificación de cepas productoras de aflatoxinas en medio sólido APA, Memorias de residencias profesionales, UNAM, México, D.F., Pág.4 -10. 2005.
- 11.** Harris Steven D. and Momany Michelle, Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm, Fungal Genetics and Biology 41, 391 – 400, 2003.
- 12.** Jayani Singh Ranveer, Saxena Shivalika, Gupta Reena, Microbial pectinolytic enzymes: A review, Process Biochemistry 40, 2931 – 2944, 2005.
- 13.** Lafon Anne, Han Kap – Hoon, Seo Jeong – Ah, Yu Jae – Hyuk, D'Enfert Christophe, G – protein and cAMP – mediated signalling in Aspergilli: A genomic perspective, Fungal Genetics and Biology 43, 490 – 502, 2006.
- 14.** Lamarre Claude, Sokol Serguei, *et al.* Transcriptomic analysis of exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Genomics 9:417, 1 – 15, 2008.
- 15.** Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. Bioquímica, Tercera Edición, Pearson Educación, S.A., Madrid, pàgs. 471-478, 503-510, 541-548, 2002.
- 16.** Moore-Landecker Elizabeth. Fundamentals of the fungi, 3rd. Edition, Prentice Hall. pág. 360-390, 1990.

- 17.** Osherov Nir, Mathew John, Tromans Angela and May Gregory, Identification of conidial – enriched transcripts in *Aspergillus nidulans* using suppression subtractive hybridization, *Fungal Genetics and Biology* 37, 197 – 204, 2002.
- 18.** Osherov Nir and Gregory May. Conidial germination in *Aspergillus nidulans* requires RAS signaling and protein synthesis, *Genetic Society of America* 155:647-656, 2000.
- 19.** Osherov Nir and Gregory May. The molecular mechanisms of conidial germination, *FEMS Microbiology Letters* 199, 153-160, 2001.
- 20.** Palomares Ruiz José Alberto. Producción secuencial de enzimas degradadoras de polisacáridos por cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, creciendo en sustratos complejos. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F., 2006.
- 21.** Priogione Valeria, Filipello MarchisioValeria. Methods to maximise the staining of fangal propagules with fuorescent dyes. *Journal of Microbiological Methods* 59, 371 – 379, 2004.
- 22.** Robertis, E.D.P. *Biología celular y molecular*, Argentina; El Ateneo, 285-287, 1999.
- 23.** Rodríguez Pastrana Blanca Rosa. Identificación de algunos inductores de las pectinasas extracelulares producidas por *Aspergillus* FP – 180. Tesis Maestria, UNAM, Mèxico D.F., 1998.
- 24.** Sachs Matthew S. and Yanofsky Charles. Developmental expression of genes involved in conidiation and amino acid biosynthesis in *Neurospora crassa*, *Developmental biology* 148, 117 – 128, 1991.

- 25.** Van Laere André J. Biochemistry of spore germination in *Phycomyces*. FEMS Microbiology Reviews 32,189-198,1986.
- 26.** Vab Mulder and Van Laere. Cyclic AMP, trehalasaand germination of *Phycomyces blakesleanus* spores. J. Gen. Microbiology. 130:541 – 547, 1984.
- 27.** Victoria Acosta Georgina. Producción, purificación y caracterización de endo – poligalacturonasa de *Aspergillus flavipes* FP – 500. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F., 2007.
- 28.** Ziv Carmit, Gorovits Rena, Yarden Oded, Carbon source affects PKA – dependent polarity of *Neurospora crassa* in a CRE – 1 – dependent and independent manner, Fungal Genetics and Biology, 2007.