

Comportamiento de *Aspergillus niger* en los exudados gomosos de *Cercidium praecox* y *Cedrela odorata*.

(Behavior of *Aspergillus niger* in the gum exudates of
Cercidium praecox and *Cedrela odorata*)

Luz Mila Mesa C¹, Sofía Rodríguez V¹, Olga Beltrán F¹,
José Quintero A¹, Edith Sánchez C¹, Gisela Páez F,² Gladys León P.³

1. Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina.

2. Cátedra de Fermentaciones Industriales, Escuela de Ingeniería Química.

3. Centro de Investigaciones en Química de los Productos Naturales.
Fac. de Humanidades y Educación, Univ. del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, exudados gomosos, cultivos, *Cedrela odorata*, *Cercidium praecox*.
Key words: *Aspergillus niger*, gum exudates, culture, *Cedrela odorata*, *Cercidium praecox*.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 11414, en medios de cultivo basados en los exudados gomosos de *Cercidium praecox* y *Cedrela odorata*. Las condiciones óptimas para la preparación de estos medios se determinaron previamente. Se evaluó el crecimiento de la colonia y la biomasa por técnicas específicas. Las características macro y microscópicas observadas para el hongo en estos medios, fueron similares a las exhibidas en Sabouraud dextrosa agar. Este comportamiento sugiere que, *A. niger* produce las enzimas necesarias para hidrolizar los heteropolisacáridos ácidos ("exudados gomosos"). La preparación de los medios ensayados, indujo la autohidrólisis de los polímeros: se liberó preferentemente galactosa, arabinosa y xilosa, sustratos aprovechados como fuente de carbono y energía por este microorganismo.

SUMMARY

The behavior of *Aspergillus niger* ATCC 11414 on media prepared with *Cedrela odorata* and *Cercidium praecox* gum exudates was studied. The best conditions for the preparation of these media were previously studied. The growth of the colony and the biomass was evaluated by means of particular techniques. Macro- and microscopic characteristics seen in the fungus in these media were similar to those observed on dextrose Sabouraud agar. This behavior suggests that *A. niger* produces the necessary enzymes to hydrolyze the acid heteropolysaccharides ("gum exudates"). The preparation of the tested media, induced the autohydrolysis of polymers: galactose, arabinose and xylose were mainly released substrates which were used as a carbon and energy source by this microorganism.

INTRODUCCION

Los hongos son organismos que requieren de condiciones mínimas para su desarrollo, las cuales varían de una especie a otra. Se ha demostrado en su crecimiento, la utilización de carbohidratos simples y complejos (mono, oligo y polisacáridos); oligoelementos (azufre, calcio, magnesio, hierro, cobre, etc.) y vitaminas (Robinson, 1978).

El uso biotecnológico de especies de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* y *Fusarium*, tiene singular importancia a nivel industrial. La fermentación de carbohidratos por *Aspergillus niger*

ha permitido la obtención de diversos compuestos orgánicos (ácido cítrico, oxálico, gálico, glucurónico; grasa microbiana) y enzimas (glucoamilasa y glucosa oxidasa), con un alto rendimiento (Raper & Fennel, 1965).

Es oportuno destacar que el aprovechamiento con fines industriales de los hongos, requiere de medios de cultivo que les permitan un desarrollo adecuado para su preservación y posterior uso. Recientemente, se ha reportado que los medios de cultivo basados en los exudados gomosos de *Laguncularia racemosa* (Mesa & León de Pinto, 1993), *Cedrela odorata* y *Cercidium praecox* (Rodríguez et al, 1997), son apropiados para el cultivo de algunos hongos.

Los exudados gomosos, se obtienen en respuesta a lesiones practicadas en la corteza de los árboles que crecen en ambientes tropicales y subtropicales. Se ha observado la participación de insectos, bacterias u hongos en la producción de las gomas (Aspinell, 1970., Anderson & Pinto, 1974). La existencia en Venezuela de especies productoras de gomas, facilita el uso de estos productos naturales para el cultivo de hongos "in vitro".

En este trabajo, se evaluó la cinética de crecimiento y las características multiplicativas de *A. niger*, en los medios que contienen exudados gomosos de *Cedrela odorata* y *Cercidium praecox*, comparandolos con un medio estandar (Sabouraud dextrosa agar).

MATERIALES Y METODOS.

1.- Origen de los materiales.

Los exudados gomosos de *Cercidium praecox* ("yabo") y *Cedrela odorata* ("cedro"), se colectaron en áreas de los Edo. Zulia (Ciudad Universitaria, Universidad del Zulia.) y Táchira (San Cristobal), Venezuela. Se usó Bactopectona, Bactoagar y Dextrosa (Merck). Sirvió como cepa de referencia, *Aspergillus niger* ATCC 11414.

2.- Métodos.

A.- Preparación de los medios de cultivos

El exudado gomoso crudo original de *C. praecox* (EGCP) y *C. odorata* (EGCO) no purificado, se calentó (40°C) por 24 horas, y se molió (Molino tipo martillo y cuchillo. Retch Muhle LBI-27). El material pulverizado se disolvió en agua destilada en un volumen suficiente para preparar la solución seleccionada (2 %). La disolución se facilitó por agitación constante en agitador magnético durante 30 minutos. Se filtró mediante un tamiz de gasa, con la finalidad de eliminar las partículas insolubles del exudado. Se adicionó como suplemento peptona (1%) y se ajustó el pH a 7.0 (con NaOH 0.1N). La preparación del medio sólido se llevó a cabo por la adición de agar (2%) y se calentó hasta ebullición en baño maría. La esterilización se realizó en autoclave (15 libras de presión, 121°C, 15 minutos).

El medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), constituido por: Dextrosa (20 gr.), Peptona (10 gr.) y Agar (15 gr.), disuelto en agua destilada (1.000 ml.), se preparó por la técnica tradicional.

B.- Ensayo Macro y Microscópico de *A. niger*.

Ensayo Macroscópico - Características de la colonia:

Se inoculó la cepa de *A. niger* en placas de Petri, que contenían los medios sólidos preparados con las gomas ensayadas (EGCP y EGCO) y el medio de referencia (SDA). Estas placas (3 placas por cada medio), se incubaron

en estufa a 28 °C, en oscuridad, durante 7 días. Posteriormente, se evaluaron las características macroscópicas de la cepa en estudio.

Ensayo Microscópico: Se realizaron las observaciones y mediciones de las estructuras vegetativas y reproductivas en el periodo de incubación (7 días), mediante la técnica de cultivo en lámina (Borelli, 1954). Como líquido de montaje, se utilizó lactofenol.

C.- Cinética de crecimiento:

Crecimiento del micelio: el cálculo del área del micelio se hizo de acuerdo a la técnica tradicional (French y Hebert, 1980)

Cultivo por carga. Peso seco: la cepa mantenida en los medios usados (a 28 °C), permitió la preparación de una suspensión densa y homogénea del hongo en agua destilada estéril. Se inoculó una alícuota (2.5 ml) de la suspensión, en matraces (25ml) que contenían los medios investigados (EGCP y EGCO) y el medio de referencia (SDA). Estos cultivos, por duplicado, se incubaron en un incubador rotatorio a temperatura de 28°C y con agitación constante (150 r.p.m). La determinación de la biomasa se hizo de acuerdo a técnica clásica (Pirt, 1975).

RESULTADOS Y DISCUSION

El estudio macroscópico de *A. niger* en los medios con *Cercidium praecox* (EGCP) y *Cedrela odorata* (EGCO), mostró características similares a las observadas en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), Fig. 1. El micelio se presentó ligeramente más granuloso en EGCP, que en EGCO, como una posible consecuencia de la mayor producción de las estructuras vegetativas y reproductivas. En SDA, el micelio aéreo mostró un aspecto granuloso, de color blanco al principio, el cual se tornó negro rápidamente. El reverso de la colonia fue incoloro.

Las características microscópicas típicas de *A. niger*, se observaron claramente a los 7 días de incubación en los medios ensayados (EGCP y EGCO). Se detectaron hifas hialinas septadas, conidióforos largos, de pared lisa e incoloros, que se tornaron oscuros hacia la vesícula globosa, con métulas y fialides de las que nacen conidios abundantes, globosos, de color marrón y pared rugosa. Las estructuras observadas en todos los medios se detallan en Tabla I, siendo el tamaño de los conidióforos mayor en SDA.

Se apreció un crecimiento favorable de *A. niger* en los medios con los exudados gomosos; el tamaño de la colonia fue similar en los medios EGCP y SDA. Tabla II. Este comportamiento se correlaciona con las curvas de

crecimiento del microorganismo en estudio. Los contenidos de biomasa en EGCP (0.1201 mg/ml) y en EGCO (0.1023 mg/ml), fueron menores que el obtenido en SDA (0.1613 mg/ml); sin embargo, el tiempo requerido para alcanzar los valores de biomasa fue mínimo (32 y 48 h.) en los medios ensayados, en comparación con el requerido para SDA (72 h.) Fig. 2. Es oportuno aclarar que la no observación de la fase latente en las curvas de crecimiento, está relacionada, probablemente, con el uso de inóculos aclimatados en los medios respectivos, los cuales se encontraban en la fase logarítmica. (Rhodes, 1969).

Los exudados gomosos, gomas, polímeros solubles en agua e hidrocoloides, son heteropolisacáridos ácidos constituidos por hexosas (galactosa, manosa, glucosa), pentosas (arabinosa y xilosa), metilpentosas (ramnosa) y ácidos urónicos (galacturónico, glucurónico y su 4-O-metil derivado). La estructura del polisacárido, obtenido de la goma de *C. odorata*, exhibe un ramnogalactan como

esqueleto central; sus ramificaciones están constituidas por galactosa, arabinosa, ramnosa y ácidos urónicos (León-Pinto et al, 1996). El polisacárido de la goma de *C. praecox* no contiene galactosa ni ramnosa; su núcleo estructural es un xilán ácido. Resíduos de arabinosa, xilosa y ácido glucurónico y su 4-O-metil derivado, están presentes en sus ramificaciones (León-Pinto et al, 1993, 1994).

La complejidad de los polisacáridos de *C. odorata* y *C. praecox* requiere de una hidrólisis previa, para que sus constituyentes puedan ser incorporados al metabolismo del hongo, mediante un sistema enzimático específico. El proceso de autohidrólisis de los polisacáridos que ocurre en la preparación de los medios ensayados, como se ha demostrado en polímeros afines (Mesa & León-Pinto, 1993), produce la liberación parcial de monosacáridos; en el caso de *C. odorata*, se libera galactosa preferentemente y en *C. praecox*, xilosa y arabinosa. Estos monosacáridos se aislaron e identificaron, después de la preparación de

TABLA I. Observaciones microscópicas de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en los 3 medios de cultivo a los 7 días de incubación.

Morfometría (µm)	MEDIOS DE CULTIVO		
	EGCP*	EGCO	SDA
Conidióforos	350 - 665,5	169,4 - 653,4	484 - 2360
Vesículas	9,2 - 23	9,2 - 20,7	11,5 - 25,3
Métulas	5,5 - 8,8	6,6 - 8,8	5,5 - 8,8
Fialides	4,4 - 8,8	5,5 - 6,6	6,6 - 7,7
Conidias.	3,3 - 4,4	3,3 - 4,4	3,3 - 4,4

* Medio de cultivo con base en exudados gomosos de *Cercidium praecox* (EGCP), *Cedrela odorata* (EGCO), Sabourard Dextrosa Agar (SDA).

TABLA II. Crecimiento de la colonia de *Aspergillus niger* ATCC 11414 en los 3 medios de cultivo.

TIEMPO, h	MEDIOS DE CULTIVO (Área, cm ²)		
	EGCP*	EGCO	SDA.
48	3,8	2,8	4,5
72	11,5	9,8	11,9
96	21,2	16,9	23,0
120	31,5	27,7	34,2
144	52,8	47,7	52,8
168	52,8	47,7	52,8

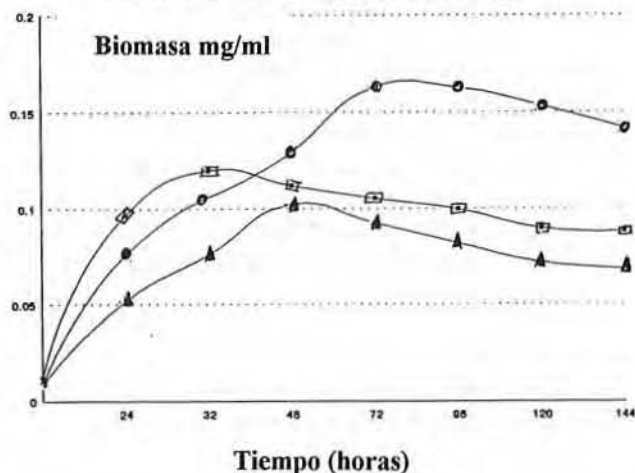
* Medios de cultivos indicados anteriormente en Tabla I.

dichos medios. Es oportuno destacar que la autohidrólisis puede continuar durante el desarrollo del hongo.

La capacidad de *A. niger* para producir varias enzimas (Costa et al, 1994., Lerouge et al, 1993) podría facilitar la utilización como fuente de carbono de los polisacáridos constituyentes de los medios que contienen los exudados gomosos. Las enzimas xilanolíticas, degradan el xilán a oligosacáridos y posiblemente a monosacáridos (xilosa), mientras las enzimas endo -L-arabinosa y -L-arabinosidasa pueden actuar sobre los residuos de arabinosa, existentes en las ramificaciones estructurales del polímero de *C. praecox*, constituyente del medio EGCP. Este hecho explica el crecimiento del microorganismo observado en dicho medio. Por otra parte, las enzimas exo 1-3-β-D-Galactanasa y β-D-Galactosidasa (Pellerin & Brillouet, 1994; Pócsi et al, 1994), pueden actuar sobre los residuos de galactosa, presentes en las ramificaciones estructurales del polímero de *C. odorata* y permitir el crecimiento del *A. niger* en el medio EGCO, los cambios estructurales de la goma por acción del hongo están en estudio.

Los medios con base en los exudados gomosos de *C. praecox* y *C. odorata* son sustratos adecuados para el

Fig. 2. Cinética de crecimiento de *A. niger* ATCC 11414 en los medios con base en Gomas de *Cercidium praecox* (EGCP) □, *Cedrela odorata* (EGCO) △, Sabouraud Dextrosa Agar ⊕



desarrollo del *A. niger*, especie de amplia aplicación en biotecnología.

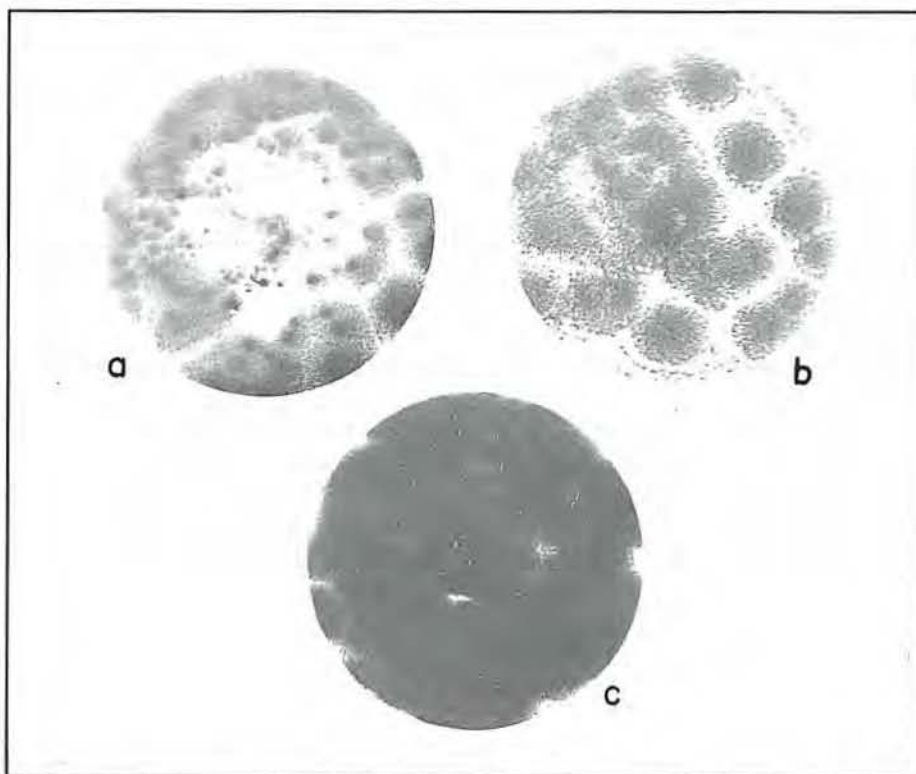


Figura 1: *Aspergillus niger* ATCC 11414. Características macroscópicas en los medios a. EGCO; b. EGCP; c. SDA; a los 7 días de incubación.

REFERENCIAS

- Anderson, D. & Pinto, G.** (1974). Variations in the composition and properties of the gum exuded by *Acacia Karroo* Hayne, in different african locations. Botanical of Journal of the Linnean Societies 80:85-89
- Aspinell, G. O.** (1970). In : The carbohydrates, W. Pigman & D.Horton (Eds). Vol. IIB. Academic Press, New York. pp. 515-536
- Borelli, D.** (1954). Nota teórica sobre cultivo en lámina de los hongos frágiles. Rev. Policlínica de Caracas 131:285-290
- Costa, F. M.; Dias A. Máximo, C.; Morgado, M. J.; Senna-Martins G.; Duarte, J. C.** (1994). Xilanolytic enzyme production by *Aspergillus niger* isolated. Appl. Biochem. Biotechnol. 44: 231- 242
- French, E. & Hebert, F.** (1980). Métodos de investigación Fitopatológica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. pp. 51-53
- León-Pinto, G.; Rodríguez, O.; and Martínez, M.** (1993). Composition of *Cercidium praecox* gum exudates. Biochem. System. and Ecology 21: 297-300
- León-Pinto, G.; Martínez, M.; Rivas, C.** (1994). Chemical and spectroscopic studies of *Cercidium praecox* gum exudates. Carbohydrate Res. 260:17-25.
- León-Pinto, G.; Gonzalez-Troconis, N.; Martínez, M.; Clamens, C. Vera, A.; Rivas, C.; Ocando, E.** (1996). Composition of three Miliaceae gum exudates. Ciencia 4:47-52
- Lerouge, P.; O'Neill, M.; Darvilland, A. & Albershein, P.** (1993). The purification of commercially available endo-alfa-L-arabinoses and alfa-L-arabinosidase for use in the structural analysis of pectic polysaccharides. Carbohydr. Res. 243:373-378
- Mesa, C.L y León-Pinto, G.** (1993). Exudado gomoso de *Laguncularia racemosa* como medio de cultivo para hongos. Investigación Clínica 34: 85-98
- Pellerin, P. & Billoulet, J.** (1994). Purification and properties of an exo (1-3)- β -D-Galactanase from *Aspergillus niger*. Carbohydr. Res. 264:281-291
- Pirt, S. J.** (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications. London.
- Pócsi, I.; Tailor, S.; Richardson, A.; Smith, B. ; Price, R.** (1993). Comparison of several new chromogenic galactosidases and substrates for various Beta-D-Galactosidases. Biochem. Biophys. Acta. 1163:54-60
- Raper, K. & Fennel, D.** (1965). The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilking Company. Baltimore.
- Rhodes, A. and Perek, L.** (1969). Principios de Microbiología Industrial. Traducido al español por Eduardo Cárdenas. Bergua, Zaragoza. Acribia. pp. 103-105
- Robinson, P.M.** (1978). Practical fungal physiology. John Wiley & Sons. Chischster. New York. pp. 79-82
- Rodriguez-Valero, S; Mesa, L; Páez-Fernandez, G; Gladys León-Pinto.** (1997). Comportamiento de *Sporothrix schenckii* y *Cladosporium carrionii* en medios a base de exudados gomosos. Kasmera. 25:1-7