

ASPECTOS NUTRICIONALES DE *NECTRIA CATALINENSIS*. (FUNGI, ASCOMYCETES)

Por ALEJANDRO G. PARDO* y FLAVIA FORCHIASSIN*

Summary *Nutritional aspects of Nectria catalinensis* (Fungi, Ascomycetes). A synthetic medium for vegetative growth of *Nectria catalinensis* Lima was improved. Thiamine was the only vitamin required for growth. The addition of calcium enhanced development while cobalt was completely inhibitory. Shaken cultures gave more biomass production than static ones. Under the conditions developed, the vegetative growth of *Nectria catalinensis* was enhanced more than twice over previous conditions, and maximal growth was achieved several days before.

INTRODUCCION

Nectria catalinensis es un Ascomycete perteneciente al orden *Hypocreales*, que vive sobre troncos muertos de *Gleditsia triacanthos* (Lima *et al.*, 1988). El hecho de que crezca sobre madera, y además estudios preliminares (método de screening para hongos celulolíticos, Mercuri, 1987) muestran una potencial actividad celulolítica.

Dado que hasta el momento no existen antecedentes acerca de la fisiología de este hongo, el objetivo del presente trabajo es determinar algunas condiciones nutricionales que influyen en su crecimiento. Este es un prerrequisito para profundizar en el conocimiento de su fisiología, con el objetivo final de optimizar las condiciones de cultivo para una eficiente producción del sistema celulolítico y degradación de celulosa *in vitro*.

El estudio se centra en los requerimientos vitamínicos y la posible influencia del calcio y el cobalto para el crecimiento vegetativo. En los hongos, el calcio está involucrado en diversas funciones y ocupa un papel central en la regulación celular (Pitt y Ugalde, 1984). Sus principales efectos se manifiestan en la promoción del desarrollo reproductivo (Ugalde y Pitt, 1983), el control del patrón de ramificación de hifas (Elliott, 1972), la incorporación de aminoácidos y síntesis de algunas proteínas (Griffin, 1966), y la incorporación y metabolismo de hidratos de carbono (Pitt *et al.*, 1983). El cobalto es esencial para algunos hongos (Ross, 1975), pero tóxico a

altas concentraciones, debiéndose este efecto a la inhibición de la síntesis del grupo hemo (Padmanaban y Sarma, 1966) o a la interferencia con la absorción de otros cationes (Fuhrmann y Rothstein, 1968). No existe referencia expresa con respecto al posible papel del cobalto en hongos celulolíticos, a pesar de que está presente, entre otros micronutrientes, en medios de cultivo (Theodorou *et al.*, 1983). En *Ascobolus furfuraceus* se ha determinado que si bien ni calcio ni cobalto son esenciales para el crecimiento, éste se incrementa y también hay mayor consumo de celulosa en presencia de ambos cationes (Mercuri, *op. cit.*).

Las condiciones de incubación, estáticas o de agitación, pueden alterar el patrón de crecimiento del micelio. Las condiciones de agitación promueven mayor aireación, pero no necesariamente aumentan el crecimiento vegetativo y en muchos casos disminuyen la producción de enzimas extracelulares como celulasas (Sandhu y Kalra, 1985) o ligninasas (Kirk *et al.*, 1978).

MATERIALES Y METODOS

Organismo: Nectria catalinensis Lima. BAFC 30700.

Los cultivos se mantuvieron a 5°C en medio APG (Agar-papa-glucosado).

Medio de cultivo líquido basal: SO₄Mg · 7H₂O, 0,5 g; PO₄H₂K, 0,5 g; PO₄HK₂, 0,6 g; SO₄Cu · 5H₂O, 0,4 mg; Cl₂Mn · 4H₂O, 0,09 mg; BO₄H₂, 0,07 mg; MoO₄Na₂, 0,02 mg; Cl₃Fe, 1 mg; Cl₂Zn, 10 mg; glucosa (G), 15 g; urea (U), 0,5 g; agua bidestilada, hasta 1000 ml.

En la experiencia realizada para determinar requerimientos vitamínicos, se realizaron los siguientes ocho tratamientos: medio basal sólo (control); medio basal adicionado con biotina, 10⁻⁸M (B); me-

* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Buenos Aires, 1428 Buenos Aires. Argentina. A.G.P.: Becario CONICET. F.F.: Investigadora CONICET.

dio basal con tiamina, 10^{-6} M (T); medio basal con biotina 10^{-8} M y tiamina 10^{-6} M (BT); medio basal más una mezcla de vitaminas con la siguiente composición final: piridoxina, 10^{-7} M; riboflavina, 10^{-5} M; ácido nicotínico, 10^{-7} M; ácido p-aminobenzoico, 10^{-6} M; ácido pantoténico, 10^{-7} M; cianocobalamina, 10^{-6} M; inositol, 10^{-5} M, (Vit); medio basal suplementado con la mezcla de vitaminas y biotina (Vit+B); mezcla de vitaminas y tiamina, (Vit+T); mezcla de vitaminas con biotina y tiamina, (Vit+BT).

En los casos en que se utilizaron Cl_2Ca y/o Cl_2Co , estos fueron adicionados al medio basal ya sea juntos o separados, a una concentración 1 mM.

La solución salina y la glucosa fueron autoclavados por separado, a $121^\circ C$ y 1,2 atm. durante 20 minutos. La urea y las soluciones stock de vitaminas fueron esterilizadas separadamente por filtración a través de membrana nitrocelulósica y todos los componentes mezclados en condiciones estériles. Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 125 ml, con 50 ml de medio en el caso de cultivos en agitación o 25 ml de medio en el caso de cultivos estáticos. La incubación tuvo lugar en cámara de cultivo New Brunswick G-27 a $23^\circ C$ con agitación rotativa constante de 125 rpm, en el caso de cultivos en agitación. Excepto la última, las mismas condiciones de incubación se mantuvieron para los cultivos estáticos. La cosecha del micelio fue realizada en los días prefijados en el caso de las curvas de crecimiento y al vigésimo día de cultivo para los demás experimentos. El micelio fue cosechado por filtración en embudo Buchner a presión reducida a través de papel de filtro. El micelio retenido fue lavado con agua bidestilada, secado en estufa a $70^\circ C$ durante 18 hs., pesado, molido y guardado a $-20^\circ C$.

Estimación del crecimiento: se utilizaron como estimadores el peso seco y la cantidad de proteínas totales de micelio.

Peso seco: se realizó por pesaje del micelio retenido en el filtro, previamente lavado y secado.

Proteínas de micelio: Se tomaron 100 mg de micelio molido y se hidrolizaron durante 30 minutos a $100^\circ C$ con NaOH 1N. Las muestras se centrifugaron 20 minutos a $1000 \times g$ y las proteínas extraídas fueron dosadas en el sobrenadante por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando seroalbúmina bovina 1 mg/ml en NaOH 1N como estándar.

Los resultados presentados son el promedio de tres experimentos realizados por triplicado, con un error estándar menor al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Vitaminas

Debido a que cuando existe auxotrofia para vitaminas en los hongos filamentosos, este requerimiento, es en general para tiamina y/o biotina, en el diseño experimental se dio mayor importancia a estos dos factores de crecimiento. En los resultados mostrados en la Fig. 1 se observa claramente que *Nectria catalinensis* presenta auxotrofia sólo para tiamina, ya que no pudo crecer en ninguno de los medios carentes de esta vitamina.

El hecho de que se observe mayor crecimiento en el medio suplementado sólo con tiamina (T), seguido por BT, Vit+T y finalmente Vit+BT sugiere que, si bien la auxotrofia es sólo para tiamina, el agregado de las otras vitaminas podría acelerar la cinética de crecimiento del hongo y, por lo tanto, en los medios BT, Vit+T y Vit+BT ya estaría en fase de autólisis y, debido a esto, tendría menor peso seco y proteínas de micelio.

Vitaminas

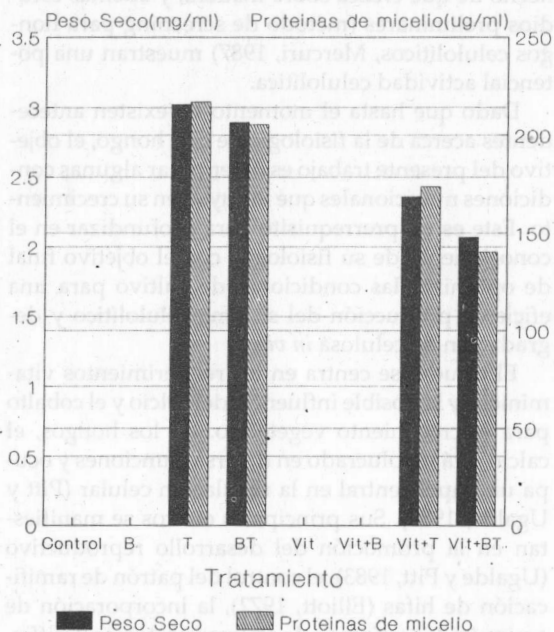


Fig. 1.— Crecimiento de *Nectria catalinensis*, medido como peso seco y como proteínas totales de micelio, en medio adicionado con distintas vitaminas. Control: sin vitaminas; B: biotina; T: tiamina; BT: biotina + tiamina; Vit: complejo vitamínico (ver M & M); Vit+B: complejo vitamínico + biotina; Vit+T: complejo vitamínico + tiamina; Vit+BT: complejo vitamínico + biotina + tiamina.

2. Curvas de crecimiento

Para estudiar la cinética de crecimiento se utilizó medio de cultivo basal, suplementado con tiamina, 10^{-6} M. Se realizó una curva de crecimiento en agitación y otra en condiciones de cultivo estático.

En la Fig. 2 se observa que entre las dos condiciones de cultivo existe un desfase en el tiempo y diferencias en cuanto al crecimiento. Se observó un mayor crecimiento vegetativo y una cinética de crecimiento más rápida, alcanzándose el pico de crecimiento diez días antes en condiciones de agitación, mientras que en condiciones estáticas se observa una prolongada fase lag. Se evidencia la necesidad de una buena aireación para el crecimiento vegetativo de *Nectria catalinensis*, aunque es de destacar su capacidad de crecimiento aún en condiciones estáticas.

Curvas de crecimiento

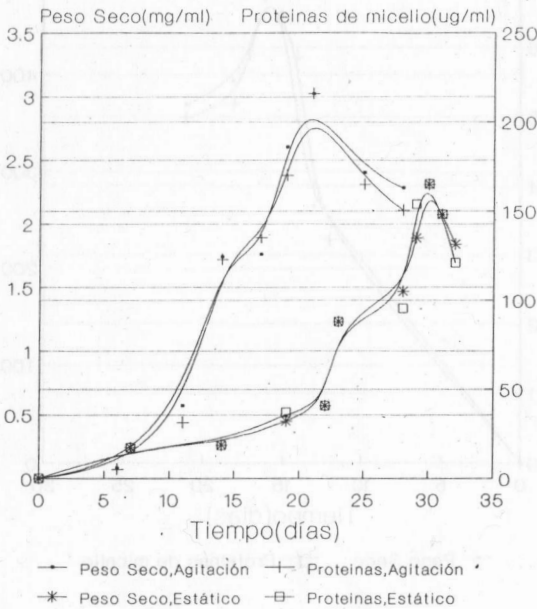


Fig. 2.— Curvas de crecimiento de *Nectria catalinensis* en medio sintético basal con tiamina en condiciones estáticas y con agitación. En ambos casos el crecimiento se estimó como peso seco (mg/ml de medio de cultivo) y como proteínas totales de micelio (µg/ml de medio de cultivo).

3. Efecto del Ca y el Co sobre el crecimiento vegetativo

Dado que *N. catalinensis* pudo crecer en medios de cultivo sin calcio, nos interesó determinar si el

agregado de éste tenía algún efecto sobre el crecimiento, ya que en muchas especies fúngicas, si bien dicho elemento no es esencial, el crecimiento y la reproducción son aumentados por el agregado de este elemento al medio de cultivo. Se ensayó el efecto del cobalto sobre el crecimiento vegetativo, ya que es incierto cuan esencial es este elemento para los hongos (Garraway y Evans, 1984).

En la Fig. 3 se muestran los resultados obtenidos en estas experiencias y se observa claramente que el Ca estimuló el crecimiento de *N. catalinensis*, mientras que el Co fue totalmente inhibitorio. Esto último puede deberse a que el Co sea un inhibidor competitivo para el transporte de cationes esenciales. Se sabe que en *Saccharomyces cerevisiae* y en *Neurospora crassa* el Co es transportado vía el sistema general de absorción de cationes (Fuhrmann y Rothstein, *op. cit.*; Venkateswerlu y Sastry, 1970). Si este fuera el caso para *N. catalinensis*, el Co podría estar bloqueando el sistema general de transporte de cationes. Otra posibilidad sería el bloqueo de la síntesis del grupo hemo (Padmanaban y Sarma, *op. cit.*).

Con respecto al Ca, se sabe que su mecanismo de acción a nivel molecular es el de ayudar a mantener

Efecto del Ca y el Co

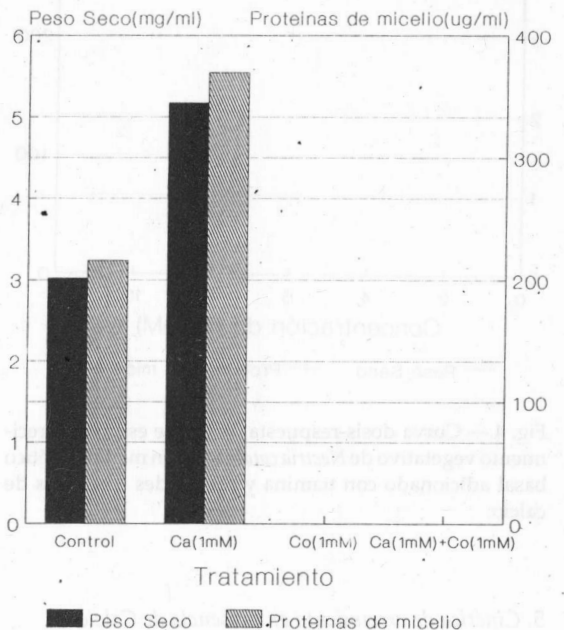


Fig. 3.— Efecto del Ca y el Co sobre el crecimiento vegetativo de *Nectria catalinensis*. Control: medio basal con tiamina pero sin agregado de calcio ni de cobalto.

la estructura de membranas y el de activador enzimático (Griffin, 1981) y está involucrado en mecanismos de transducción de estímulos (Ruiz Herrera *et al.*, 1990).

4. Dosis-respuesta de Ca

Dados los resultados obtenidos en el experimento precedente, se realizó una curva dosis-respuesta de Ca, utilizándose para tal efecto medio de cultivo basal más tiamina, 10^{-6} M, con diferentes concentraciones de Cl_2Ca (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM y 10 mM).

En la Fig. 4 se muestran los resultados obtenidos y puede apreciarse que la biomasa fúngica se va incrementando hasta una concentración de Cl_2Ca 1 mM; por sobre la cual se observa un plateau.

Dois-respuesta de Ca

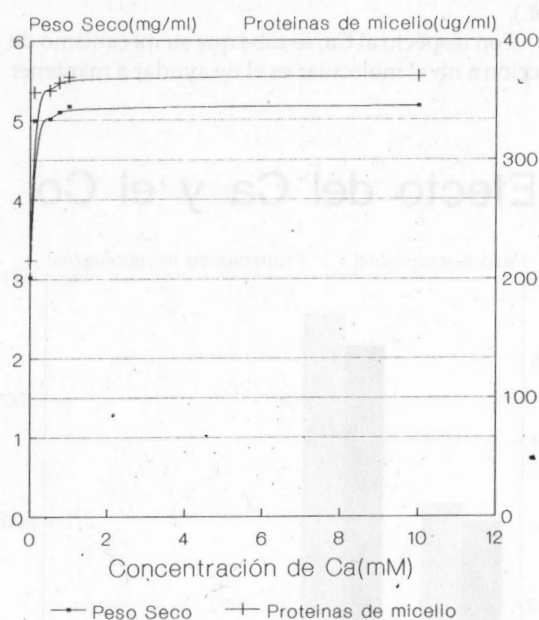


Fig. 4.— Curva dosis-respuesta de Ca. Se estimó el crecimiento vegetativo de *Nectria catalinensis* en medio sintético basal adicionado con tiamina y cantidades crecientes de calcio.

5. Cinética de crecimiento en presencia de Calcio

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos hasta aquí, se realizó una curva de crecimiento utilizando un medio de cultivo con la siguiente

composición: medio basal más tiamina 10^{-6} M y Cl_2Ca 1 mM.

En la Fig. 5 se muestran los resultados obtenidos y se observa una cinética de crecimiento más rápida (máximo crecimiento al día 16) respecto de las curvas de crecimiento realizadas previamente y mayor biomasa que en todos los tratamientos anteriores sin calcio.

En todos los experimentos realizados se observó una muy buena correlación entre los valores de peso seco y los correspondientes de proteínas totales de micelio. Este dato es de gran importancia ya que indica que en *Nectria catalinensis* es válido usar este estimador para determinar crecimiento en sistemas que no permitan la medición directa de peso seco.

Cinética de crecimiento

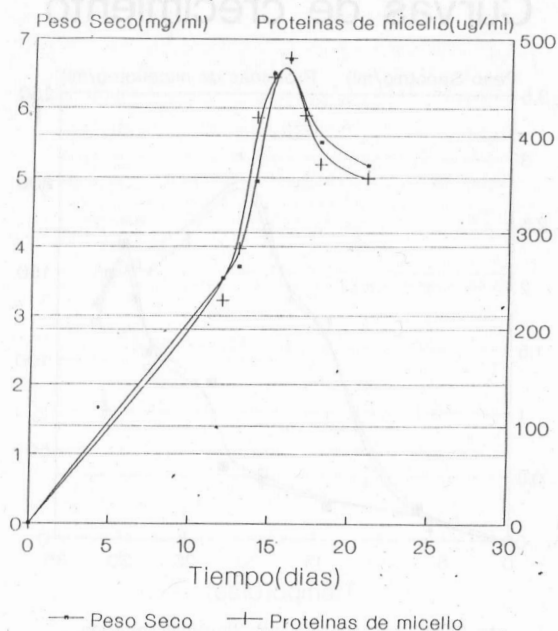


Fig. 5.— Cinética de crecimiento de *Nectria catalinensis* en medio conteniendo tiamina 10^{-6} M y Cl_2Ca 1 mM, incubándose en condiciones de agitación.

CONCLUSIONES

Se demostró que *Nectria catalinensis* sólo presenta auxotrofia para tiamina.

Las condiciones de cultivo estático permitieron el crecimiento de *Nectria catalinensis* aunque retrasaron y disminuyeron la producción de biomasa con

respecto a condiciones de agitación. Si bien el Ca no fue esencial para el crecimiento, éste aumentó notablemente, con la adición del catión al medio de cultivo. De acuerdo con la curva dosis-respuesta, el óptimo se alcanzó a una concentración 1 mM, no observándose inhibición del crecimiento a concentraciones mayores.

El Co inhibió por completo el crecimiento vegetativo de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET, por la financiación parcial de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- ELLIOTT, G. C. 1972. Calcium chloride and growth and reproduction in *Phytophthora cactorum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 76: 219-230.
- FUHRMANN, G. F. & A. ROTHSTEIN. 1968. The transport of Zn^{+2} , Co^{+2} , and Ni^{+2} into yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 463: 325-330.
- GARRAWAY, M. O. & R. C. EVANS. 1984. *Fungal nutrition and physiology*. Wiley & Sons, N. Y. 401 pp.
- GRIFFIN, D. H. 1966. Effect of electrolytes on differentiation in *Achlya sp.* *Plant. Physiol.* 41: 1254-1256.
- 1981. *Fungal physiology*. Wiley & Sons, N. Y. 383 pp.
- KIRK, T. K., E. SCHULTZ, W. J. CONNORS, L. F. LORENZ & J. G. ZEIKUS. 1978. Influence of cultural parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117: 277-285.
- LIMA, C. E., F. FORCHIASSIN & M. E. RANALLI. 1988. Systematic and biological study of *Hypocreales* of Argentina. IV. *Nectria catalinensis* sp. nov. *Nova Hedwigia*, 46: 149-156.
- MERCURI, O. A. 1987. Degradación biológica de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Tesis Doctoral. FCEN, UBA. 303 pp.
- PADMANABAN, G. & P. S. SARMA. 1966. Cobalt toxicity and iron metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 118: 497-503.
- PITT, D., M. J. MOSLEY & J. C. BARNES. 1983. Glucose oxidase activity and gluconate production during calcium induced conidiation of *Penicillium notatum* in submerged culture. *Trans. Br. mycol. Soc.* 81: 21-27.
- & U. O. UGALDE. 1984. Calcium in fungi. *Plant, Cell Environ.*, 7: 467-475.
- ROSS, I. S. 1975. Some effects of heavy metals on fungal cells. *Trans. Br. mycol. Soc.* 64: 175-193.
- 1990. Possible roles of calcium and calmodulin in the light-stimulation of wall biosynthesis in *Phycomyces*. *Photochem. Photobiol.* 52: 217-221.
- SANDHU, D. K. & M. K. KALRA. 1985. Effect of cultural conditions on production of cellulases in *Trichoderma longibrachiatum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 84: 251-258.
- THEODOROU, M. K., M. J. BAZIĆ & A. P. J. TRINCI. 1983. Growth of *Trichoderma reesei* on glucose-mineral salts media containing ammonium sulphate or urea as the sole source of nitrogen. *Microbios*, 36: 157-167.
- UGALDE, U. O. & D. PITT. 1983. Morphology and calcium-induced conidiation of *Penicillium cyclopium* in submerged culture. *Trans. Br. mycol. Soc.* 80: 319-325.
- VENKATESWERLU, G. y K. S. SASTRY. 1970. The mechanism of uptake of cobalt ions by *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 118: 497-503.