

## ESTUDIOS NUTRICIONALES EN *ASCOBOLUS BIGUTTULATUS* (FUNGI, ASCOMYCETES). CRECIMIENTO VEGETATIVO

Por ALEJANDRO G. PARDO y FLAVIA FORCHIASSIN\*

**Summary** *Nutritional studies in Ascobolus biguttulatus. Vegetative growth.* Vegetative growth of two compatible strains of *Ascobolus biguttulatus* Ranalli et Gamundí was investigated, in liquid synthetic media with different carbon and nitrogen sources. Maximum growth was obtained with a high concentrated glucose-urea medium (C: 1.66%; N: 0.14%). pH variation of the culture medium suggests the extracellular hydrolysis of urea. Besides glucose, the best carbon sources for growth were fructose, maltose and cellobiose. among the nitrogen sources tested, asparagine produced a good growth while the inorganic sources were only utilized at low concentrations. The two strains showed a similar behaviour, but one of them always grew more vigorously.

### INTRODUCCION

*Ascobolus biguttulatus* Ranalli et Gamundí es un Ascomycete coprófilo y heterotálico descrito por Ranalli y Gamundí (1975) quienes también realizaron estudios acerca de su ciclo biológico y su citología. Los estudios de nutrición en los hongos son la base del conocimiento de su fisiología ya que permiten comprender la influencia de determinados factores sobre sus funciones, como primer paso a la elucidación de procesos fundamentales, tales como caminos metabólicos, producción y utilización de energía, incorporación de nutrientes y regulación génica.

Varios estudios nutricionales se han realizado en miembros del género *Ascobolus*: *A. immersus* (Yu-sun, 1964), *A. crenulatus* (Galvagno, 1976), *A. furfuraceus* (Lima y Mercuri, 1984; Cinto et al, 1986). En *A. biguttulatus* se ha determinado el crecimiento en función de distintas concentraciones de glucosa, asparagina y vitaminas (Cinto et al, 1977; 1978), sugiriéndose un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de este hongo.

El objetivo del presente trabajo fue profundizar estos estudios, determinando la influencia de distintas fuentes carbonadas y nitrogenadas, así como la concentración de carbono y de nitrógeno sobre el crecimiento vegetativo de *A. biguttulatus*. Dado que esta especie es heterotálica, dos cepas compatibles para la reproducción sexual fueron utilizadas como

organismos experimentales, con el propósito de investigar si entre ambas existían diferencias en su comportamiento frente a iguales tratamientos nutricionales.

### MATERIALES Y METODOS

**Organismo:** Para todas las experiencias se utilizaron las cepas 7 y 8 de *Ascobolus biguttulatus* (BAFC 23346), correspondientes a un par compatible para la reproducción sexual. Los cultivos se conservaron a 4°C en tubos de ensayo con medio de cultivo PF en pico de flauta (Gamundí y Ranalli, 1966).

**Medios de cultivo:** El medio de cultivo basal consistió, por litro de agua bidestilada, de:  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,6 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,4 mg;  $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,09 mg;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 0,07 mg;  $\text{MoO}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 mg;  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , 1 mg;  $\text{Cl}_2\text{Zn}$ , 10 mg; C1H-Tiamina, 0,1 mg; Biotina, 5 µg.

Las fuentes de carbono y de nitrógeno se variaron y se adicionaron a las concentraciones indicadas en cada experimento.

**Fuentes de carbono:** Glucosa (G), fructosa (F), sacarosa (S), maltosa (M), celobiosa (C), almidón (Al), carboximetilcelulosa (CMC).

**Fuentes de nitrógeno:** Urea (U), asparagina (A), glicina,  $\text{NO}_3\text{Na}$ ,  $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ .

Para determinar la relación carbono/nitrógeno del medio de cultivo más favorable para el crecimiento vegetativo se realizaron las combinaciones de cinco concentraciones de glucosa y cuatro de urea (Tabla I).

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico. Las soluciones stock de las vitaminas y las

\* Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, pabellón II, 4° piso.

Tabla I.— Relaciones C/N utilizadas. Relaciones C/N obtenidas al combinar las concentraciones indicadas de glucosa y de urea en los medios de cultivo

Glucosa (%)	Urea (%)			
	0,05	0,1	0,2	0,3
0,5	8,7	4,3	2,2	1,4
1	17,4	8,7	4,3	2,9
2	34,8	17,4	8,7	5,8
3	52,2	26,1	13,0	8,7
4	69,6	34,8	17,4	11,6

fuentes de nitrógeno fueron esterilizadas por filtración. El medio basal y las fuentes de carbono fueron autoclavadas por separado y todos los componentes mezclados estérilmente. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers de 125 ml con 50 ml de medio que se inocularon con un disco de 3 mm de diámetro tomado de la parte externa de una colonia de cinco días de crecimiento sobre Bacto-agar 2%. La incubación tuvo lugar en cámara termostata a 23° C bajo iluminación continua de 4700 lux y agitación rotativa constante de 125 rpm. La cosecha del micelio fue realizada en los días prefijados para el caso de la curva de crecimiento en el medio glucosa-urea (G-U). En el

peso seco (mg/ml)

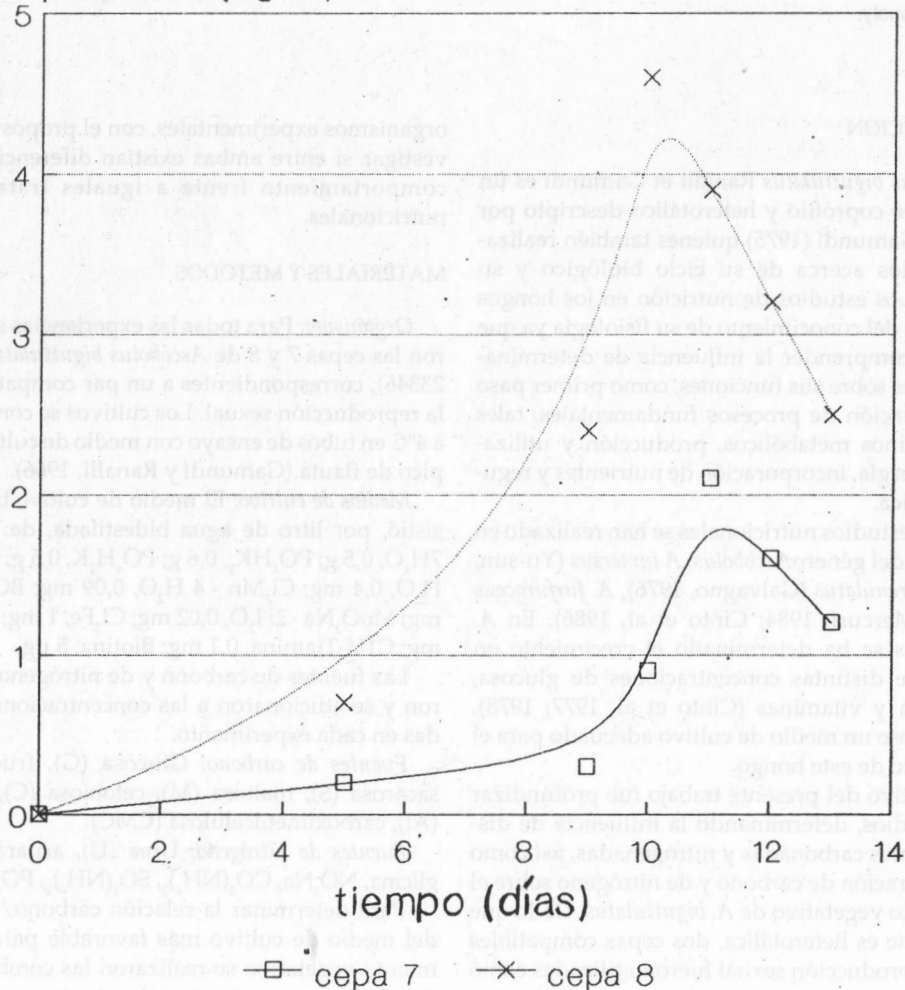


Fig. 1.— Curvas de crecimiento, medido como peso seco del micelio, de las dos cepas de *Ascobolus biguttulatus* creciendo en medio G-U (glucosa-urea).

resto de las experiencias la cosecha fue establecida en base a la curva de crecimiento correspondiente.

El micelio fue separado por filtración a través de papel de filtro en embudo Buchner a presión reducida. La estimación del crecimiento vegetativo se realizó por determinación del peso seco del micelio secado en estufa a 70°C durante 18 hs. Se determinó el pH inicial y final de los medios de cultivo con un pH-metro Photovolt.

Los resultados son el promedio de tres experiencias realizadas por triplicado, con un error standard en todos los casos menor al 5%.

## RESULTADOS

### Curvas de crecimiento

Al realizar las curvas de crecimiento en medio G-U (glucosa 1%, urea 0,05%) se observó una marcada diferencia en el crecimiento entre ambas cepas, siendo mucho mayor el de la cepa 8 (Fig. 1). La cepa 7 presentó un período lag más prolongado, alcanzando el máximo crecimiento un día después que la cepa 8, aunque notablemente menor.

En base a las curvas realizadas se fijaron como días de cosecha para los experimentos posteriores el décimo día para la cepa 8 y el onceavo para la 7.

### Efecto de la relación carbono/nitrógeno

El comportamiento de las dos cepas, crecidas en los medios con distintas concentraciones de glucosa y urea, fue similar, pero siempre con mayor nivel de crecimiento en la cepa 8.

Para concentraciones de glucosa relativamente bajas (1 y 2%) se observó que el crecimiento era favorecido por bajas concentraciones de urea (0,05% y 0,1%), mientras que al aumentar la cantidad de glucosa el crecimiento disminuyó con las mismas concentraciones de urea (Figs. 2 y 3). En cambio altas concentraciones de glucosa produjeron mayor crecimiento cuando se combinaron con altas concentraciones de urea, obteniéndose el máximo crecimiento con las concentraciones más elevadas de glucosa y urea ensayadas (4% de glucosa y 0,3% de urea), equivalentes a 16 g C/l y 1,4 g N/l.

Se observó una variación del pH inicial de los medios de cultivo (pH = 6) al final del período de crecimiento (Tabla 2). A altas relaciones C/N se observó acidificación del medio de cultivo, mientras que bajas relaciones C/N provocaron una alcalinización del medio. Para la cepa 7 la relación C/N límite entre estos comportamientos sería aproximadamente 15, mientras que para la cepa 8 la misma sería 12.

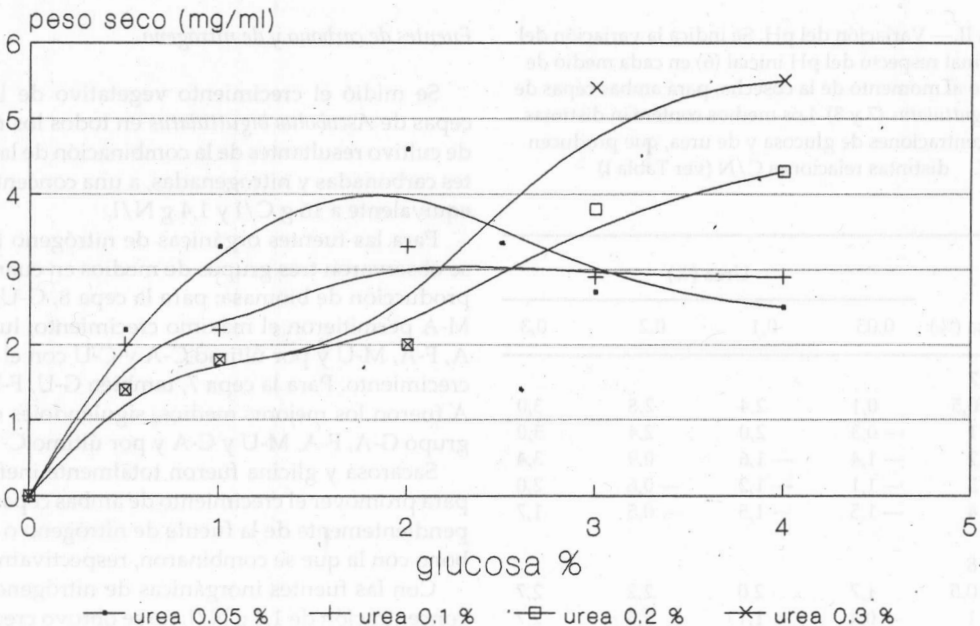


Fig. 2.— Crecimiento de la cepa 7 de *Ascobolus biguttulatus* con concentraciones variables de glucosa. Las curvas representan el crecimiento con distintas concentraciones de urea.

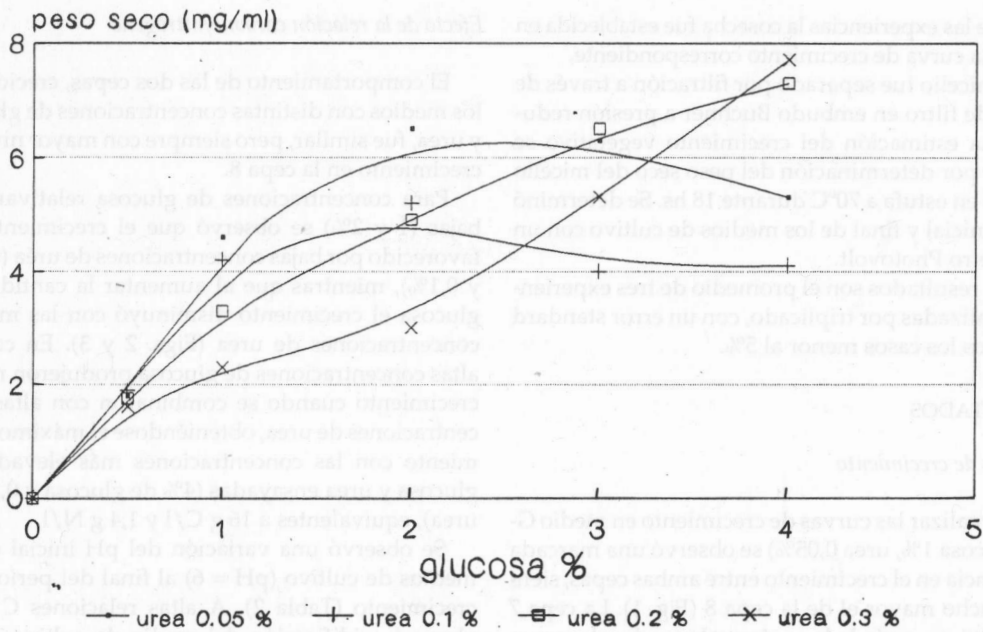


Fig. 3.— Crecimiento de la cepa 8 de *A. biguttulatus* con concentraciones variables de glucosa. Las distintas curvas representan el crecimiento con distintas concentraciones de urea.

Tabla II.— Variación del pH. Se indica la variación del pH final respecto del pH inicial (6) en cada medio de cultivo al momento de la cosecha, para ambas cepas de *A. biguttulatus* (7 y 8). Los medios contenían distintas concentraciones de glucosa y de urea, que producen distintas relaciones C/N (ver Tabla I)

Cepa	Glucosa (%)	Urea (%)			
		0,05	0,1	0,2	0,3
cepa 7	0,5	0,1	2,4	2,8	3,0
	1	-0,3	2,0	2,4	3,0
	2	-1,4	-1,6	0,9	3,4
	3	-1,1	-1,2	-0,6	2,0
	4	-1,5	-1,5	-0,5	1,7
cepa 8	0,5	1,7	2,0	2,2	2,7
	1	-0,4	1,1	2,5	2,7
	2	-0,7	-0,2	2,6	3,1
	3	-0,8	-1,9	0,8	2,1
	4	-0,6	-1,8	-0,4	2,2

Fuentes de carbono y de nitrógeno

Se midió el crecimiento vegetativo de las dos cepas de *Ascobolus biguttulatus* en todos los medios de cultivo resultantes de la combinación de las fuentes carbonadas y nitrogenadas, a una concentración equivalente a 16 g C/l y 1,4 g N/l.

Para las fuentes orgánicas de nitrógeno (Fig. 4) se observaron tres grupos de medios en cuanto a la producción de biomasa: para la cepa 8, G-U, F-U y M-A permitieron el máximo crecimiento; luego G-A, F-A, M-U y por último C-A y C-U con el menor crecimiento. Para la cepa 7, también G-U, F-U y M-A fueron los mejores medios, siguiéndoles en otro grupo G-A, F-A, M-U y C-A y por último C-U.

Sacarosa y glicina fueron totalmente inefectivas para promover el crecimiento de ambas cepas, independientemente de la fuente de nitrógeno o de carbono con la que se combinaron, respectivamente.

Con las fuentes inorgánicas de nitrógeno a una concentración de 1,4 g N/l, no se obtuvo crecimiento, independientemente de la fuente de carbono utilizada. A menores concentraciones, con glucosa como fuente carbonada, se comprobó que el

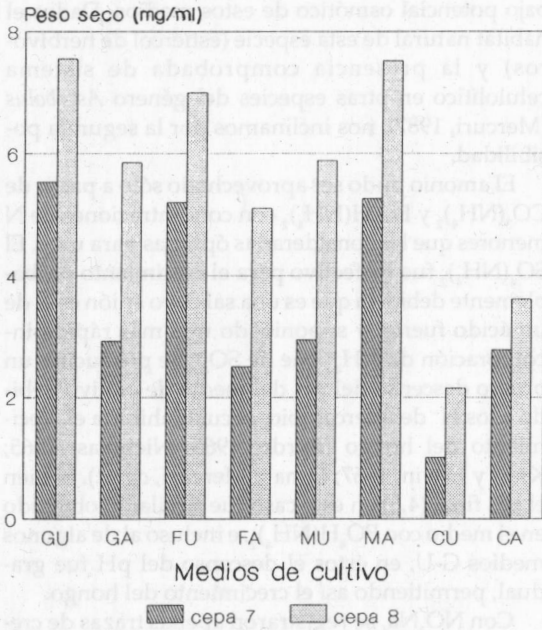


Fig. 4.—Crecimiento de ambas cepas de *A. biguttulatus* (7 y 8), en medios conteniendo distintas fuentes carbonadas y nitrogenadas. GU: glucosa-urea; GA: glucosa-asparagina; FU: fructosa-urea; FA: fructosa-asparagina; MU: maltosa-urea; MA: maltosa asparagina; CU: celobiosa-urea; CA: celobiosa-asparagina.

$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$  y el  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  pudieron ser utilizados para el crecimiento vegetativo (Tabla III), siendo la concentración más efectiva 0,7 g N/l en ambos casos y para las dos cepas; mientras que el  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  y el  $\text{NO}_3\text{Na}$  fueron inefectivos ya que sólo hubo trazas de crecimiento en todas las concentraciones de N ensayadas.

El almidón y la CMC no pudieron ser probados en la misma concentración de C que el resto de las fuentes, debido a su insolubilidad a esa concentración; por lo tanto se determinó el crecimiento vegetativo de las dos cepas en los medios Al-U, Al-A, CMC-U y CMC-A con concentraciones de C y N inferiores (4 g C/l y 0,46 g N/l). Los medios Al-U y Al-A fueron tan efectivos como el medio G-U correspondiente, para ambas cepas, mientras que con CMC sólo hubo trazas de crecimiento (Fig. 5).

DISCUSION

Las dos cepas compatibles de *Ascobolus biguttulatus* presentaron un comportamiento similar, ya sea respecto al tipo de fuente utilizada como

Tabla III.—Crecimiento con fuentes inorgánicas de nitrógeno. Crecimiento, expresado como mg de peso seco de micelio/ml de medio de cultivo, de ambas cepas de *A. biguttulatus* (7 y 8), con distintas concentraciones de fuentes inorgánicas de nitrógeno, utilizando en todos los casos glucosa como fuente de carbono

Fuente Nitrogenada	Concentración (g N/l)		
	0,35	0,7	1,4
cepa 7			
$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$	0,94	1,39	0
$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	1,29	1,62	0,41
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,11	0,42	0,09
$\text{NO}_3\text{Na}$	0,08	0,12	0,31
cepa 8			
$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$	0,78	1,18	0
$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$	1,16	2,66	0,71
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,18	0,30	0,04
$\text{NO}_3\text{Na}$	0,12	0,13	0,10

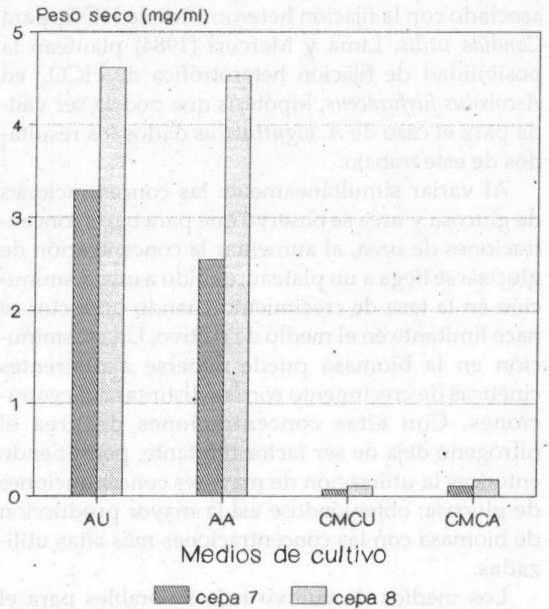


Fig. 5.—Crecimiento de ambas cepas de *A. biguttulatus*, en medios conteniendo almidón y celulosa: AU: almidón-urea; AA: almidón-asparagina; CMCU: carboximetilcelulosa-urea; CMCA: carboximetilcelulosa-asparagina.

a su concentración. Sin embargo en todos los casos la cepa 8 presentó un crecimiento mucho más vigoroso que la 7, siendo, según el medio utilizado hasta un 100% mayor. Por lo tanto consideramos válida, la utilización de una cepa de *Ascobolus biguttulatus* como modelo experimental, ya que las diferencias observadas fueron cuantitativas y no cualitativas.

El crecimiento vegetativo fue favorecido por altas concentraciones de carbono y de nitrógeno.

Sobre la base de las variaciones de pH observadas se propone como hipótesis un mecanismo de hidrólisis extracelular de la urea asociado a la fijación heterotrófica de  $\text{HCO}_3^-$ . La urea sería hidrolizada extracelularmente en  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ; a bajas relaciones C/N (menor a 12 para la cepa 8 y menor a 15 para la cepa 7) se produciría una absorción más rápida de  $\text{HCO}_3^-$  que de  $\text{NH}_4^+$ , elevándose el pH del medio debido a los  $\text{OH}^-$  de intercambio. En cambio cuando la relación C/N es mayor a las citadas, y dado que el C no sería limitante en este caso, la absorción de  $\text{NH}_4^+$  sería mayor que la de  $\text{HCO}_3^-$ , produciéndose una acidificación del medio de cultivo debida a los  $\text{H}^+$  de intercambio. La utilización de carbono inorgánico ( $\text{HCO}_3^-$ ) ha sido citada para varios hongos (Cantino, 1949; Robinson, 1978; Parkinson et al., 1990). Roon y Levenberg (1970) postularon un patrón de hidrólisis de urea, asociado con la fijación heterotrófica de  $\text{HCO}_3^-$  para *Candida utilis*. Lima y Mercuri (1984) plantean la posibilidad de fijación heterotrófica de  $\text{HCO}_3^-$  en *Ascobolus furfuraceus*, hipótesis que podría ser válida para el caso de *A. biguttulatus* dados los resultados de este trabajo.

Al variar simultáneamente las concentraciones de glucosa y urea se observó que para bajas concentraciones de urea, al aumentar la concentración de glucosa se llega a un plateau, debido a una disminución en la tasa de crecimiento cuando un factor se hace limitante en el medio de cultivo. Una disminución en la biomasa puede deberse a diferentes cinéticas de crecimiento con las distintas concentraciones. Con altas concentraciones de urea el nitrógeno deja de ser factor limitante, permitiendo entonces la utilización de mayores concentraciones de glucosa; obteniéndose así la mayor producción de biomasa con las concentraciones más altas utilizadas.

Los medios de cultivo más favorables para el crecimiento de ambas cepas fueron los que contenían glucosa o fructosa en combinación con urea, y maltosa en combinación con asparagina.

En las condiciones experimentales ensayadas la sacarosa, la carboximetilcelulosa y la glicina no fueron aprovechadas para el crecimiento. La incapacidad de *A. biguttulatus* de utilizar CMC podría deberse a la ausencia del sistema celulolítico o bien al

bajo potencial osmótico de estos medios. Dados el hábitat natural de esta especie (estiércol de herbívoros) y la presencia comprobada de sistema celulolítico en otras especies del género *Ascobolus* (Mercuri, 1987), nos inclinamos por la segunda posibilidad.

El amonio pudo ser aprovechado sólo a partir de  $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$  y  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$  con concentraciones de N menores que las consideradas óptimas para urea. El  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  fue inefectivo para el crecimiento probablemente debido a que es una sal cuyo anión es el de un ácido fuerte, y suponiendo una más rápida incorporación de  $\text{NH}_4^+$  que de  $\text{SO}_4^-$ , se produciría un brusco descenso del pH del medio de cultivo debido a los  $\text{H}^+$  de intercambio, el cual inhibiría el crecimiento del hongo (Byrde, 1965; Nicholas, 1965; Kraft y Erwin, 1967; Lima y Mercuri, *op cit.*). Si bien el pH final (4,5) en este caso fue similar al obtenido en el medio con  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ , e incluso al de algunos medios G-U, en éstos el descenso del pH fue gradual, permitiendo así el crecimiento del hongo.

Con  $\text{NO}_3\text{Na}$ , se registraron apenas trazas de crecimiento independientemente de la concentración utilizada. Algunos autores (Lima y Mercuri, *op. cit.*; Morton y Mac Millan, 1954) han citado una fuerte alcalinización del medio de cultivo al utilizar esta fuente de nitrógeno, lo que inhibiría el crecimiento de los hongos estudiados. Para *A. biguttulatus* descartamos esta posibilidad, ya que no se observó aumento del pH en el medio de cultivo. Por otra parte *A. crenulatus* es capaz de crecer con nitrato, sin que se observe alcalinización del medio de cultivo (Galvagno, 1976). Tampoco podemos atribuir el resultado obtenido a la incapacidad de *A. biguttulatus* de sintetizar nitrato reductasa, ya que en medios sólidos con esa fuente nitrogenada se produjo un leve crecimiento e incluso formación de cuerpos fructíferos (Pardo y Forchiasin, 1993), sin embargo, al cambiar las condiciones experimentales (medio líquido) es posible que se vea alterado el patrón de producción o de activación de dicha enzima.

#### AGRADECIMIENTOS

Al CONICET, por la financiación parcial de este trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

- BYRDE, R. J. W. 1965. The chemical environment for fungal growth. En Ainsworth & Sussman (Eds.) "The fungi", vol. 1, 525-537 pp. Academic Press, N.Y.
- CANTINO, E.C. 1949. The physiology of the aquatic Phycomycete *Blastocladiella pringsheimii*. *Am. J. Bot.*, 36: 95-112.
- CINTO, R. O., F. FORCHIASSIN, M. E. RANALLI y M. A. GALVAGNO. 1986. Relación entre las concentraciones

- nes de zinc, hierro y cobre y el crecimiento vegetativo de *Ascobolus furfuraceus* (Fungi-Ascomycetes). *Physis, Secc. C. B. Aires*, 44 (106): 7-18.
- CINTO, R. O., M. A. GALVAGNO, F. FORCHIASSIN y M. E. RANALLI. 1977. Estudio de la relación entre la concentración de biotina, tiamina, D-glucosa, L-(-)-asparagina y el desarrollo vegetativo de *Ascobolus biguttulatus* (Fungi-Ascomycetes), usando técnicas de superficie de respuesta. I. *Physis, Secc. C. B. Aires*, 37 (93): 281-302.
- 1978. Estudio de la relación entre la concentración de biotina, tiamina, D-glucosa, L-(-)-asparagina y el desarrollo vegetativo de *Ascobolus biguttulatus* (Fungi-Ascomycetes), usando técnicas de superficie de respuesta. II. *Physis, Secc. C. B. Aires*, 38 (94): 7-32.
- GALVAGNO, M. A. 1976. Ensayos de nutrición en *Ascobolus crenulatus* P. Karst. (Fungi: Ascomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 17: 95-118.
- GAMUNDI, I. J. y M. E. RANALI. 1966. Estudio sistemático y biológico de las Ascoboláceas de la Argentina. II. *Notulae Hedwigia*, 10: 339-366.
- KRAFT, J. M. y D. C. ERWIN. 1967. Effects of nitrogen source on growth of *Phytium ultimum* and *P. aphanidermatum*. *Phytopathology*, 57: 374-376.
- LIMA, C. E. y O. A. MERCURI. 1984. Ensayos de nutrición en *Ascobolus furfuraceus*. Fuentes de nitrógeno. *Revista Argentina de Microbiología*, 16 (4): 177-186.
- MERCURI, O. A. 1987. Degradación biológica de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Tesis doctoral. U.B.A. 303 p.
- MORTON, A. G. y A. MacMILLAN. 1954. The assimilation of nitrogen from ammonium salt and nitrate by fungi. *J. Exper. Bot.*, 5: 232-252.
- NICHOLAS, D. J. D. 1965. Utilization of inorganic nitrogen compounds and aminoacids by fungi. En Ainsworth & Sussman (Eds.) "*The Fungi*", vol 1, 349-376 Academic Press, N.Y.
- PARDO, A. G. y F. FORCHIASSIN. 1993. Effect of light and nutrition on fruiting of *Ascobolus biguttulatus*. *Curr. Microbiol.*, 27: 69-72.
- PARKINSON, S. M., K. KILLHAM y M. WAINWRIGHT. 1990. Assimilation of CO<sub>2</sub> by *Fusarium oxysporum* grown under oligotrophic conditions. *Mycol. Res.*, 94 (7): 959-964.
- RANALLI, M. E. y I. J. GAMUNDI. 1975. *Ascobolus biguttulatus* sp. nov. Estudios de cultivo y citología. *Physis, Secc. C. B. Aires*, 34: 1-15.
- ROBINSON, P. M. 1978. *Practical fungal physiology*. Wiley & Sons, Chichester.
- ROON, R. J. y B. LEVENBERG. 1970. CO<sub>2</sub> fixation and the involvement of allophanate in the biotin-enzyme-catalyzed cleavage of urea. *J. Biol. Chem.*, 245: 4593-4595.
- YU-SUN, C. C. 1964. Nutritional studies of *Ascobolus immersus*. *Am. J. Bot.*, 51: 231-237.