

## 4. Crecimiento

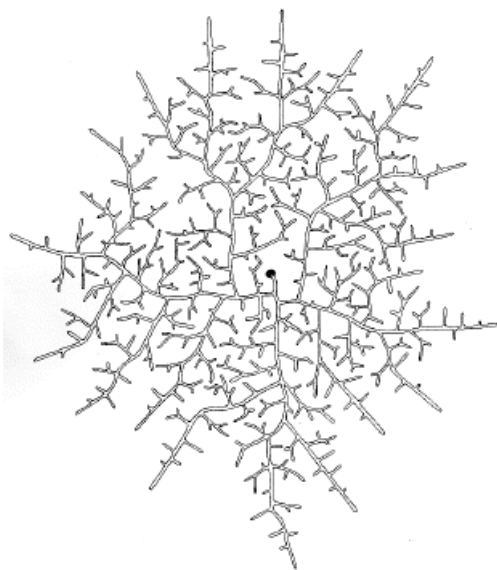
Es definido a veces como el aumento irreversible del volumen e implica cambios en los componentes, metabolismo, forma y funciones. Las etapas son germinación de la espora, desarrollo somático y esporulación. El micelio se extiende en todas direcciones. Las hifas sólo se alargan y ramifican por sus extremos, siendo medido el crecimiento por el diámetro de la colonia, el peso húmedo (aunque éste varía con la cantidad de agua remanente) o el contenido de proteínas. En las levaduras se suele medir por el número de células, las que tienen distinto tamaño según la edad (1). Al crecer, el micelio mantiene una organización celular interna muy polarizada para permitir la extensión del ápice de los filamentos. Las hifas exploran el sustrato buscando recursos y esto requiere un sistema de transporte interno bidireccional que provee al extremo hifal de suficientes nutrientes para continuar su crecimiento y envía los recursos recién hallados a la colonia (2).

Los esclerocios son el resultado de la repetida ramificación dicotómica de una hifa acompañada de la formación de numerosos septos, que comienza cuando el ambiente es desfavorable para el crecimiento normal de la colonia (3).

Algunos hongos pueden crecer como levadura o micelio ramificado, dependiendo de las condiciones ambientales. Este dimorfismo se observa tanto en patógenos animales (*Histoplasma*, *Paracoccidioides*) como vegetales (*Ustilago*, *Rhodosporidium*) (4).

Comúnmente una fase de dormición precede a la germinación de las esporas hasta que las condiciones ambientales son favorables. Algunas requieren factores tales como refrigeración o temperaturas altas. Las esporas de los hongos coprófilos brotan a la temperatura del intestino animal y las de ciertos parásitos vegetales germinan bajo la nieve. También se observa autoinhibición en la proximidad del micelio que le dio origen, como en el caso de las esporas de algunas royas. Las esporas de los parásitos sólo requieren agua y oxígeno para germinar, pero las de

los saprobios necesitan de otros factores, tales como una fuente orgánica de carbono y algunas sales (3).

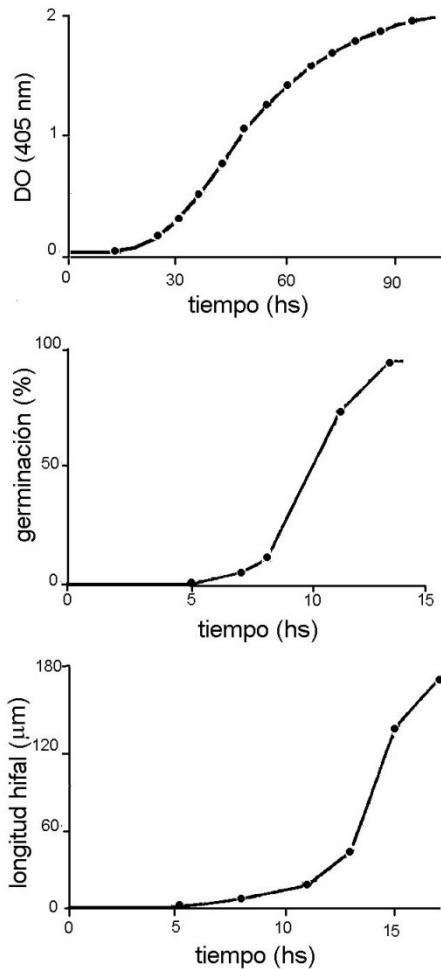


**Figura 4.1.** Formación de una colonia a partir de una espora (1).

Muchas esporas tienen un área delgada (rajadura o poro germinativo) por donde se produce la germinación. El crecimiento implica el alargamiento de la hifa joven (tubo germinativo), la que luego se ramifica, creciendo en todas direcciones para explorar el sustrato y formar una colonia. A medida que la colonia madura, se generan en el margen unas hifas "guía" de crecimiento rápido.

La pared de las hiposporas y la de las hifas son diferentes, la primera es impermeable y la segunda permeable y con poros. Cuando una hipospora está lista para germinar, las enzimas internas vuelven a la pared permeable, permitiendo recibir los estímulos externos.

La pared hifal reduce, pero no previene, la pérdida de agua en condiciones de sequedad y el ingreso de sustancias nocivas, e impide el pasaje de enzimas, sin embargo las exoenzimas son excretadas por el ápice. La turgencia de las hifas se debe a que la concentración interna de solutos es más alta que en el entorno, por la alta eficiencia de absorción que presentan las mismas. La exposición del micelio en crecimiento a un brusco cambio osmótico, produce anomalías solamente en los ápices hifales (5).



**Figura 4.2.** Curvas del crecimiento de *Aspergillus fumigatus* en medio de Sabouraud (6).

Generalmente la distancia entre el extremo de una hifa y la primera rama es constante en una colonia, pero se ve afectada por el agotamiento de los nutrientes. Al envejecer la hifa, aumenta la vacuolización, se acumulan lípidos y se reduce el citoplasma (5).

Cuando la fase asimilativa del hongo recibe señales ambientales específicas, tal el caso de la reducción de los nutrientes, el hongo pasa a la fase reproductiva. Algunos hongos producen esporas directamente sobre la hifa somática, otros forman estructuras especializadas simples o complejas (1).

La figura 4.2 muestra las curvas de crecimiento en medio líquido con agitación, expresado como: a) variación de la densidad óptica del sustrato, b) porcentaje de germinación de las esporas, c) variación en la longitud de

las hifas. En los estudios de la cinética del crecimiento individual de los mohos, se observa que:

- la velocidad de extensión de las hifas cortas es proporcional a la longitud de las mismas y a la velocidad específica de crecimiento, es decir que estas hifas pueden crecer exponencialmente;
- cada ápice hifal puede extenderse a una velocidad independiente de la velocidad de aumento de la biomasa;
- cuando la capacidad de la hifa para extenderse supera las posibilidades brindadas por los puntos de crecimiento existentes, se generan otros nuevos (ramificación) (7).

La cantidad de ARN y enzimas miceliales alcanza un máximo durante la fase lag y decrece al envejecer el hongo. La proporción de ADN y carbohidratos es menor en la primera fase de crecimiento y aumenta luego hasta un valor estacionario antes de la muerte. El porcentaje de ADN es mayor en las esporas que en el micelio, a la inversa que la concentración de carbohidratos y lípidos (8).

Algunas vitaminas son imprescindibles para los hongos que deterioran las frutas, tal es el caso de *Gloeosporium*, *Nigrospora*, *Verticillium* y *Fusarium*, los cuales requieren biotina, *Thielaviopsis* también necesita tiamina. Sin embargo otros, como *Botryodiplodia*, son independientes de las fuentes exógenas (9).

**Cuadro 4.1.** Comparación de los parámetros de crecimiento de algunos hongos meso y termófilos (10).

Especies	°C	Velocidad específica de crecimiento 1/hs
<i>Neurospora crassa</i>	30	0,37
<i>Trichoderma reesei</i>		0,20
<i>Aspergillus niger</i>		0,24
<i>Trichoderma viride</i>		0,16
<i>Myceliophthora thermophila</i>	50	0,23
	30	0,11
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	50	0,23
	30	0,06

## Factores ambientales

### Temperatura

La mayoría de los hongos mesófilos tienen una temperatura mínima de crecimiento entre 5 y 10°C y una máxima entre 30 y 40°C. Los psicrófilos muestran una temperatura óptima entre 0 y 15°C, y los termófilos entre 40 y 50°C.

La termofilia de los hongos es moderada respecto a las bacterias pues el valor máximo tolerado es 60°C. Las especies termófilas se observan en los desechos vegetales autocalentados y dado que la concentración de dióxido de carbono suele ser de 10 a 15% influye en la nutrición y morfología de las mismas. Aunque las reacciones biocatalíticas a temperaturas elevadas son más rápidas que en condiciones mesofílicas, la velocidad de crecimiento de los mohos termófilos suele ser mucho más bajas que en los mesófilos y por lo tanto el tiempo de generación mayor.

La reducción en la velocidad de captación de nutrientes restringe el crecimiento de los mohos termófilos a la temperatura ordinaria y algunos requieren, por debajo de 30°C, los factores orgánicos de crecimiento que no pueden sintetizar en esas condiciones. Muchos organismos varían la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos en función de la temperatura, de tal manera que la fluidez de la membrana se mantenga constante para el funcionamiento óptimo de los transportadores y enzimas localizados en la misma. Por otra parte, la degradación que sufren las proteínas solubles a una temperatura elevada es compensada por la rápida resíntesis.

La velocidad de captación del oxígeno de un hongo termófilo depende de la temperatura, pero no en uno mesófilo. Tanto *Thermoascus aurantiacus* (termófilo) como *Aspergillus niger* (mesófilo) utilizan el 55% de los carbohidratos en la síntesis de la biomasa fúngica y el 45% en el metabolismo energético (10).

El rango óptimo de temperatura para el desarrollo de las especies mesófilas de

*Fusarium* es 8-15°C, para las de *Penicillium* 25-30°C y para las de *Aspergillus* 30-40°C.

El rango de temperatura que permite la esporulación es más estrecho que aquél en el cual crecen las hifas, así algunas especies de *Penicillium* el micelio desarrolla entre 2 y 43°C pero la esporulación ocurre entre 3 y 40°C (11). *Malbranchea cinnamomea* crece bien a 45 y 55 °C, pero no a 22°C (20).

La temperatura del rumen está entre 39 y 40,5°C, rango óptimo para la formación de las zoosporas de los quitridiomycetos anaeróbicos. Éstos no crecen por debajo de 33°C ni sobre 41°C (12).

Entre los hongos termófilos comunes están especies de *Chaetomium*, *Malbranchea*, *Paecilomyces*, *Rhizomucor*, *Thermoascus* y *Thermomyces*, mientras que *Aspergillus fumigatus* y *Sordaria thermophila* son termotolerantes (10). Las ascosporas de algunas especies de *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* y *Eupenicillium* son resistentes al tratamiento térmico de frutas procesadas, pero los micelios son mesófilos (13). También

Algunos hongos de diferentes géneros, tales como *Fusarium*, *Sclerotinia* y *Typhula* son conocidos como los mohos de la nieve porque causan enfermedades en pasturas, cereales y hortalizas que crecen a bajas temperaturas. Son favorecidos por las condiciones de frío y humedad prolongados cuando una capa de nieve cubre el suelo no congelado. *Monographella nivalis* crece entre 2 y 32°C con un óptimo a 20°C y causa enfermedades de las gramíneas por debajo de 5°C. Además, en ambas regiones polares desarrollan hongos y líquenes.

Varios hongos psicrófilos forman esclerocios que sobreviven a temperaturas relativamente altas. Si un cultivo del organismo psicrófilo se lleva a 20-30°C, cuando retornan al valor inicial muestran un período lag proporcional a la duración y grado de elevación de la temperatura antes de continuar el crecimiento. En la levadura *Candida gelida* el mecanismo de síntesis de proteínas es sensible al calor, y en un grupo de Mucorales los lípidos de las especies psicrófilas y mesófilas tienen un grado de

saturación similar, pero son más insaturados que los de las especies termófilas (11).

Entre los mohos que desarrollan a temperatura de refrigeración sobre productos alimenticios (carnes diversas, hortalizas, frutas, pan) se encuentran especies psicrófilas y mesófilas tolerantes al frío, de los mohos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thamnidium* y *Xeromyces*, y de las levaduras *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon* y *Yarrowia*.

Algunos mohos crecen sobre carnes congeladas como *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Thamnidium*, y levaduras de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y *Trichosporum* (13).

### Luz

La luz influye en el desarrollo de muchos hongos. Si se siembra *Sordaria* u otro moho caprófilo sobre agar-estiércol de conejo y se envuelve la caja con papel grueso oscuro, dejando un agujero de cerca de 1 cm de diámetro sobre la tapa, se observará en el vidrio la masa de ascosporas disparadas hacia esa abertura.

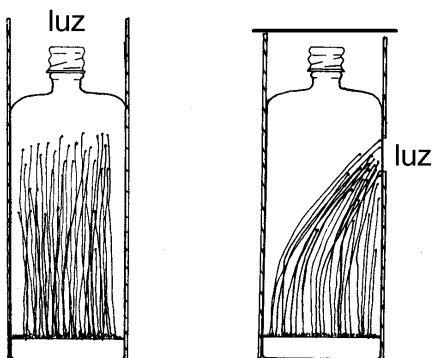


Figura 4.3. Fototropismo de *Phycomyces* (11)

Con el fin de mostrar el fototropismo de *Phycomyces*, se lo siembra en un frasco con medio de cultivo rodeado de papel oscuro dejando que la luz llegue por arriba, y en otro con una abertura lateral para acceder a la luz, como se muestra en la figura 4.3. Los

esporangióforos crecerán erectos en un caso e inclinados hacia la luz en el otro. Los conidióforos de *Aspergillus clavatus* responden de igual manera (114).

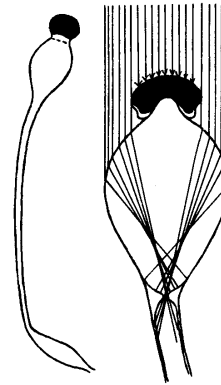


Figura 4.4. Esporangio de *Pilobolus kleinii* (11).

*Pilobolus* tiene un mecanismo expulsor del esporangio que actúa por acción de la luz y arroja las esporas a distancias de hasta dos metros. Sus esporóforos terminan en vesículas hinchadas encima de las cuales hay esporangios llenos de esporas oscuras. La vesícula hinchada, transparente y llena de líquido, es una lente que enfoca los rayos de luz y los concentra sobre la pared interior de la misma. La trayectoria de los rayos se ve en la figura 4.4. La presión del líquido dentro de la vesícula aumenta hasta que la pared exterior se rompe a lo largo de una línea que está justo debajo del esporangio y éste es lanzado con gran fuerza hacia una hoja (o la tapa de la caja de vidrio). El pigmento protege a las esporas de los efectos dañinos de los rayos ultravioleta (8).

*Podospora*, *Sordaria* y *Ascobolus* disparan sus ascosporas hacia la luz. Otros hongos, tal el caso de *Neurospora*, muestran un ritmo diario de crecimiento y esporulación en respuesta a la alternancia de luz solar indirecta y oscuridad nocturna, que se manifiesta en la colonia como anillos morfológicamente distintos (1).

Las manzanas y peras invadidas por *Monilinia fructigena* producen pústulas de color pardo claro con frecuencia en zonas

concéntricas correspondientes a los períodos de iluminación diurna (13).

Otras especies cuya esporulación es favorecida por la exposición a la luz son: *Botrytis cinerea* (uv), *Cylindrocladium citri* (azul a rojo lejano), *Cylindrocladium* spp. (azul a uv), *Dendrophoma obscurans* (azul), *Epicoccum nigrum* (uv), *Helminthosporium vagans* (uv cercana) y *Trichoderma lignorum* (azul). Una larga exposición a la luz ultravioleta es letal para el micelio. La intensidad de la luz blanca requerida para inducir la esporulación de *Epicoccum nigrum* varía inversamente con la duración (14).

El ritmo circadiano controla una variedad de actividades fisiológicas y moleculares de la mayoría de los organismos eucarióticos y algunos procarióticos. Este ritmo persiste bajo condiciones constantes con un período de 24 horas e interactúa con las condiciones de luz y temperatura (15).

### Atmósfera

Los organismos aerobios estrictos dependen de la respiración aeróbica. Los facultativos pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno molecular, así las levaduras obtienen su energía tanto de la fermentación como de la respiración. La mayoría de los hongos son aerobios, aunque los requerimientos de oxígeno varían con las especies, las condiciones de crecimiento y los diferentes estados fisiológicos del organismo. En *Aspergillus nidulans* una presión parcial de oxígeno reducida (0,02 bar) conduce a la formación de células levaduriformes, *Saccharomyces cerevisiae* disminuye la producción de etanol a una presión mayor que 0,1 bar, mientras que en *Aspergillus niger* la velocidad de producción de ácido cítrico aumenta con la presión parcial de oxígeno hasta 0,8 bar (7).

Numerosas reacciones enzimáticas son de óxido-reducción y la capacidad de un organismo para llevarlas cabo depende del potencial de reducción del medio. Este potencial indica la tendencia de un compuesto a ganar electrones y es un valor relativo con respecto al H<sub>2</sub> medido a pH 7. Los microorganismos aerobios estrictos sólo son metabólicamente activos a un potencial

de reducción positivo. Los ambientes en equilibrio con el oxígeno atmosférico poseen un potencial alrededor de +800 mV. Los potenciales de reducción negativos suelen deberse a un crecimiento exógeno de organismos heterótrofos que agotan el oxígeno disponible (16).

Una concentración de O<sub>2</sub> menor que 10% en una atmósfera de N<sub>2</sub> produce grandes cambios en las especies *Aspergillus*, *Penicillium* y *Chaetomium*, disminuyendo la producción de esporas y esclerocios. También un aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> afecta al crecimiento (8).

### pH

El pH influye en la disociación y la solubilidad de muchas moléculas, afectando a la actividad de las enzimas, la disponibilidad de los nutrientes como amonio y fosfato, y la movilidad de los metales pesados tóxicos (cobre, etc) (8). Un pH bajo reduce la solubilidad del CO<sub>2</sub> en el medio, limitando su asimilación por la enzima piruvato-carboxilasa del ciclo anaplerótico (16).

El cuadro 4.2 muestra el rango de pH que permite el crecimiento de algunos mohos. El crecimiento óptimo de la mayoría de los hongos se encuentra entre pH 5 y 7. Como toleran la acidez se los puede aislar de una mezcla con bacterias adicionando un ácido orgánico. El pH interno de la célula de *Neurospora crassa* es 7,1-7,4 creciendo medios con valores de pH entre 4,1 y 8,4 (3).

**Cuadro 4.2.** Rango del pH para el crecimiento fúngico (13).

Organismos	Límite inferior	Límite superior
<i>Aspergillus niger</i>	2,8	8,8
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,6	9,3
<i>Botrytis cinerea</i>	<2,8	7,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,8	11,1
<i>Penicillium italicum</i>	1,9	9,3
<i>Rhizoctonia solani</i>	2,5	8,5

*Sclerotinia sclerotiorum* libera gran cantidad de ácido oxálico en el tejido vegetal infectado ajustando el pH para favorecer la actividad de las enzimas que degradan la pectina,

especialmente la endo-poli-galacturonidasa (17). Los líquenes también excretan ácido oxálico que reacciona con la superficie de las rocas o la piedra caliza de los monumentos históricos degradándolos a una velocidad de 0,5 - 3 mm/siglo y 17 mm/siglo, respectivamente (8)

### Presión osmótica y actividad del agua

El agua realmente disponible para uso microbiano se expresa como actividad del agua ( $a_w$ ), la que depende del número de moles de agua, el número de moles del soluto y de los coeficientes de actividad para ambos. La  $a_w$  puede reducirse no sólo por efecto de los solutos (fuerzas osmóticas) sino también por la absorción a superficies sólidas (fuerzas matrices). Por definición, la actividad del agua recién destilada es 1,0. Las fuerzas osmóticas y matrices reducen este valor. La  $a_w$  es numéricamente igual a la humedad relativa en equilibrio/ 100 (13).

La mayoría de los mohos tienen una  $a_w$  óptima entre 0,98 - 0,96, pero algunos hongos y líquenes xerófilos desarrollan incluso a un valor de 0,61. Los hongos xerófilos, como *Eurotium* y *Wallemia*, no crecen a una  $a_w = 0,96$  (11). El cuadro 4.3 indica los valores mínimos de  $a_w$  que permiten el crecimiento de algunos hongos, en ciertos casos la incubación duró varios meses (13).

El mantenimiento interno de la presión de turgor hifal por el movimiento del agua, está relacionado con el transporte de iones a través de la membrana, principalmente  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$ , también contribuyen solutos orgánicos (8).

Pocos hongos pueden resistir la elevada presión osmótica de soluciones concentradas, se los llama osmo-tolerantes y osmófilos según toleren o prefieran altas concentraciones de azúcares u otros solutos. La miel, la savia, el néctar de las flores, las melazas y otros jarabes azucarados son ambientes adecuados para los mismos. Pueden estropear las conservas de frutas, jarabes y otros alimentos normalmente estabilizados por su alta concentración de azúcar. *Debaryomyces hansenii* y

*Zygosaccharomyces rouxii* son levaduras osmófilas, *Aspergillus* y *Penicillium* son mohos osmotolerantes.

La presión osmótica de soluciones concentradas de azúcar tiende a deshidratar las células. Los micro-organismos osmotolerantes y osmófilos evitan esta situación equilibrando las concentraciones intracelulares de solutos compatibles. Éstos son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, tales como glicerol y otros polialcoholes, que equilibran la presión osmótica e impiden la pérdida de agua de la célula. Las enzimas de los organismos osmófilos están tan adaptadas que el crecimiento es óptimo a una actividad del agua por debajo de 0,9 (13).

*Aspergillus glaucus*, *A. restrictus* y especies relacionadas son mohos osmófilos pues crecen mejor y más rápido, produciendo gran cantidad de conidios y ascomas, sobre sustratos con alto contenido de azúcares, incluso a una  $a_w = 0,70$  (11). *Monascus* puede llegar a crecer en NaCl al 9% (p/v) y pH 2,2. El efecto inhibitorio del NaCl sobre este hongo aumenta a medida que baja el pH y asciende la temperatura (18).

**Cuadro 4.3.** Actividad del agua mínima para el crecimiento de varias especies de mohos y levaduras a 25°C (13)

Organismos	$a_w$ mínima
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	0,98
<i>Rhizoctonia solani</i>	0,96
<i>Thamnidium elegans</i>	0,94
<i>Rhizopus nigricans</i>	0,93
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,83
<i>Alternaria alternata</i>	0,88
<i>Fusarium verticilloides</i>	0,87
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,84
<i>Penicillium viridicatum</i>	0,80
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	0,80
<i>Pichia anomala</i>	0,75
<i>Chrysosporium xerophilum</i>	0,71
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,65
<i>Xeromyces bisporus</i>	0,61

Los mohos *Trichoderma harzianum* y *Beauveria bassiana*, usados respectivamente para biocontrol de fitopatógenos del suelo e insectos, son distribuidos como 'pellets'

donde el micelio está inmerso, en alginato con salvado de trigo y polietilenglicol, lo que les permite mantener la viabilidad durante el transporte a los lugares de aplicación (19).

Los oomicetos y los quitridiomycetos dependen de las condiciones de humedad para la dispersión de las zoosporas y muchas especies se encuentran en agua dulce o marina (8).

Los líquenes que habitan en las rocas tienden a mantener la humedad en equilibrio con el aire o el sustrato al que están adheridos. Algunos líquenes son endolíticos o sea crecen entre los cristales de roca, como se observa en los desiertos polares (14).

## Referencias

1. Kendrick B. 2000. The Fifth Kingdom. 3ª ed. Focus Publishing, Newburyport, MA.
2. Darrah PR *et al.* 2006. Eukaryotic Cell 5:1111.
3. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The Fungi. 2ª ed. Academic Press, San Diego.
4. Robson G. 1999. En: Molecular Fungal Biology. Oliver R, Schweizer M, eds. University Press, Cambridge.
5. Deacon JW. 1993. Introducción a la Micología Moderna. Limusa - Noriega Editores, México.
6. Meletiadis J *et al.* 2001. J Clin Microbiol 39: 478.
7. Smith JE, Berry DR, eds. 1974. The Filamentous Fungi. Vol 1. E Arnold, London.
8. Moore D, Robson GD, Trinci APJ. 2011. 21<sup>st</sup> Century Guidebook to Fungi. University Press, Cambridge.
9. Downes FP, Ito K, eds. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. APHA, Washington,
10. Maheshwari R *et al.* 2000. Microbiol Molec Biol Reviews 64: 461.
11. Hudson HJ. 1986. Fungal Biology. Edward Arnold, London, cap 6.
12. Lowe SE *et al.* 1987. Appl Environ Microbiol 53: 1210.
13. Beuchat R, ed. 1987. Food and Beverage Mycology. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 66, 599.
14. Atlas RM, Bartha R. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4º ed. Addison Wesley, Madrid, cap 8.
15. Liu Y, Bell-Pedersen D. 2006. Eucaryotic Cell 5: 1184.
16. Sacks LE *et al.* 1986. J Appl Bacteriol 61 : 235.
17. Rollins JA, Dickman MB. 2001. Appl Environ Microbiol 67: 75.
18. Panagou EZ, Skandamis PN, Nychas G-JE. 2005. Appl Environ Microbiol 71: 392
19. Knudsen GR, Eschen DJ, Dandurand LM, Wang ZG. 1991. Appl Environ Microbiol 57: 2864.
20. Morgenstern I *et al.* 2012 Fungal Biology 116: 489.