



Efecto de diferentes condiciones de estrés sobre el crecimiento vegetativo del hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum*.

Effect of different stress conditions on the vegetative growth of the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*.

Sandra Milena Aldana Bohórquez., Ramón Ovidio García-Rico

Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Departamento de Microbiología. Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.

Resúmen

El hongo filamentoso *Acremonium chrysogenum* produce una mezcla de sustancias antibióticas, entre las que destaca la cefalosporina C. Con una participación de mercado del 50% para la cefalosporina C y sus derivados semisintéticos, desempeñan un importante rol en la industria farmacéutica. Debido a su amplio espectro de efectividad contra las bacterias Gram (+) y Gram (-), la cefalosporina C es un fármaco importante, producido únicamente por *A. chrysogenum*. Las condiciones ambientales inducen adaptaciones en los seres vivos, que responden modificando sus procesos biológicos para lograr su supervivencia. Estas respuestas pueden evaluarse in vitro para dilucidar el efecto del estrés fisiológico en el desarrollo. De esta manera, en este trabajo se evaluó el efecto de diferentes osmolitos, del peróxido de hidrógeno y la luz blanca sobre el crecimiento vegetativo de *A. chrysogenum*. Se observó un incremento del crecimiento de *A. chrysogenum* en condiciones de NaCl 0,5 M, mientras que frente al KCl fue osmosensible, deduciéndose una osmoadaptación al NaCl. El glicerol solamente mostró efectos inhibidores del crecimiento a concentraciones de 1M. Por otro lado, *A. chrysogenum* presentó tolerancia al estrés oxidativo inducido por el peróxido, incluso a concentraciones de 100 mM. Finalmente, un fotoperíodo LD (12/12) estimuló el desarrollo del hongo, mientras que en condiciones LL la tasa de crecimiento fue similar a la observada en la condición de control (DD).

Palabras clave: *Acremonium chrysogenum*, estrés osmótico, estrés oxidativo, estrés lumínico.

Abstract

The filamentous fungus *Acremonium chrysogenum* produces a mixture of antibiotic substances, including the β -lactam cephalosporin C. With a market share of 50% cephalosporin C and its semisynthetic derivatives, play a major role in the pharmaceutical industry. Because of its broad spectrum effectiveness against Gram-positive and Gram-negative bacteria, cephalosporin C is an important drug, produced solely by *A. chrysogenum*. The environmental conditions induce

adaptations in living beings, which respond by modifying their biological processes to achieve their survival. These responses can be evaluated *in vitro* to elucidate the effect of physiological stress on development. In this way, the effect of different osmolytes, hydrogen peroxide and white light on the vegetative growth of *A. chrysogenum*, was evaluated in this investigation. It was observed that the growth of *A. chrysogenum* was stimulated under conditions of 0.5M NaCl, while it showed osmosensitivity to KCl, deducting an osmoadaptation to NaCl. Glycerol showed growth inhibitory effects solely at concentrations of 1M. On the other hand, *A. chrysogenum* showed tolerance to oxidative stress induced by peroxide, even at concentrations of 100mM. Finally, a photoperiod LD (12/12) stimulated the development of the fungus, whereas in LL conditions the growth rate was similar to that observed in the control condition (DD).

Palabras clave: *Acremonium chrysogenum*, osmotic stress, oxidative stress, light stress.

1. Introducción:

Los hongos filamentosos de la división Ascomycota son uno de los grupos de organismos eucariotas de mayor importancia por sus aplicaciones en diferentes campos de la actividad humana (García-Rico & Fierro, 2017). Tal vez, el sector en el que se ha conseguido el mayor impacto es el relacionado con la salud, no tanto por su capacidad patógena, sino debido a la diversidad de metabolitos secundarios que producen y que pueden producir, por lo que el estudio y búsqueda de hongos filamentosos es uno de los frentes de trabajo en la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas (Schueffler & Anke, 2014; Chávez et al., 2015; Alberti et al., 2017). En este sentido, en la clase Sordariomycetes, destaca *Acremonium chrysogenum*, ya que se trata del hongo que produce naturalmente cefalosporina C y precursores de diferentes derivados antibióticos ampliamente comercializados como el ácido 7-amino cefalosporínico (Velasco et al., 2000; Hu & Zhu, 2016). A día de hoy, la ruta de producción de cefalosporina ha sido ampliamente estudiada dando paso a la evolución de varias generaciones de cefalosporinas las cuales han sido clasificadas acorde a su espectro de acción (Ozcengiz & Demain, 2013).

En hongos filamentosos, se ha encontrado que existe un estrecho vínculo entre el desarrollo biológico del hongo y su metabolismo secundario. Como ejemplos de lo anterior, podemos citar el caso de las subunidades alfa de proteínas G heterotriméricas (García-Rico et al., 2017) y el complejo Velvet (Bayram & Braus, 2012). En *A. chrysogenum* este vínculo ha sido evidente, puesto que la formación de artrosporas en pleno proceso fermentativo ha sido asociado con la eficiencia en la producción del antibiótico (Kluge & Kück, 2018). A nivel molecular, esta relación también ha sido demostrada en *A. chrysogenum*, ya que la proteína AcVEA regula la producción del antibiótico y afecta a la fragmentación hifal en la producción de artrosporas (Dreyer et al., 2007). Adicionalmente, se ha visto como la formación de autofagosomas afecta tanto la conidiación como la producción de cefalosporina (Wang et al., 2014).

Tomando en cuenta este vínculo entre la morfogénesis y el metabolismo secundario, existe claramente un contraste en la investigación en torno a *A. chrysogenum*, ya que mientras que la ruta biosintética de las cefalosporinas ha sido ampliamente estudiada (Ozcengiz & Demain, 2013), y varios estudios han analizado la influencia de diferentes parámetros nutricionales y fisicoquímicos sobre la expresión de genes involucrados directa o indirectamente en la producción de cefalosporina

C (López-Calleja et al., 2012; Liu et al., 2018), los procesos de desarrollo biológico del hongo y sus mecanismos reguladores apenas han sido abordados.

Lo anterior adquiere una mayor relevancia si se considera que se ha reportado que algunos de los procesos relacionados con los niveles de producción del antibiótico, como la artrosporación, se ven afectados por las condiciones de estrés osmótico y oxidativo a los que se puede ver enfrentado el hongo durante su desarrollo en medios de cultivo (Kluge & Kück, 2018). A su vez, los mecanismos fisiológicos pueden verse afectados por el reloj biológico intrínseco de los hongos, que es inherente al movimiento rotacional de la tierra, derivando en ciclos circadianos dependientes de luz (Dunlap & Loros, 2017). En estos ciclos, participan proteínas capaces de detectar la luz y de activar señales de respuesta fisiológica y morfológica (Schumacher, 2017).

Por lo tanto, adicional al poco conocimiento que se tiene sobre la morfofisiología de *A. chrysogenum*, se hace necesario conocer su comportamiento ante diferentes condiciones de estrés, las cuales pueden estar determinadas por los factores abióticos que se presentan durante el cultivo del hongo en medio sólido y líquido (fermentaciones). En consecuencia, el presente estudio ofrece una descripción del efecto de agentes causantes de estrés osmótico, oxidativo y lumínico sobre la tasa de crecimiento apical del hongo en medio de cultivo sólido.

2. Materiales y Métodos

2.1. Cepa y condiciones de cultivo.

La cepa silvestre de *Acremonium chrysogenum* ATC11550 fue conservada en soluciones de glicerol al 40% a -70°C . Para preparar y ejecutar los ensayos de respuesta a estrés, *A. chrysogenum* fue cultivado en medio líquido y sólido. El medio líquido CCM, compuesto por Sacarosa 3 g/l, medio TSB (Tryptic Soy Broth) 5 g/l, extracto de carne (Difco) 1 g/l, extracto de levadura 1 g/l, Glucosa 15 g/l, NaCl 0.5 g/l, K_2HPO_4 0.5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, FeSO_4 0.018 g/l, aforado con agua destilada, fue balanceado con HCl (1M) o NaOH (1M), según el caso, hasta obtener un pH de 6,8 (adaptado de Rangel et al., 2008). Para obtener el medio sólido se añadió agar-agar hasta una concentración final de 2 %. Los medios de cultivo fueron esterilizados a 15 lbs, 121°C por 15 min, en autoclave.

Para el medio sólido, se usaron placas Petri estériles de 90X15mm, las cuales una vez servidas fueron preincubadas a 26°C por 48 horas en total oscuridad antes de ser inoculadas. En el caso del medio líquido se usaron matraces de 250ml en agitación constante a $26^{\circ}\text{C}/250$ rpm durante 7 días, conteniendo 45ml medio complejo de cultivo (CCM) inoculado con 5ml de una suspensión de conidios de 1×10^5 conidios/ml.

2.2. Obtención del inóculo

A partir de un cultivo en medio líquido se extrajo el micelio por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos, descartando el sobrenadante. El botón de micelio fue lavado tres veces consecutivamente, con 5ml de solución salina NaCl 0,85% p/v. La totalidad del micelio fue depositado en un tubo para centrifugadora de 50ml, al que se adicionaron 20 ml de solución salina y 10-15 perlas de vidrio de 4mm de diámetro. Posteriormente el micelio fue macerado por vórtex hasta obtener una suspensión

fúngica homogénea de fragmentos hifales, la cual fue lavada dos veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Antes de cada ensayo se estableció la viabilidad de los fragmentos hifales mediante tinción con rojo neutro, para esto se tomó una alícuota de 100µl que fue centrifugada a 4000 rpm/10 min, el sobrenadante fue descartado y el micelio fue lavado dos veces con agua destilada estéril, y un tercer lavado se hizo con PBS. Posteriormente el micelio fue resuspendido con 200µl de rojo neutro y la suspensión se incubó durante 1h a 26°C. La viabilidad de los fragmentos se contabilizó en cámara de Neubauer (Fukuda et al., 1996).

La suspensión micelial fue sometida a diluciones sucesivas hasta obtener una concentración de 1×10^6 fragmentos hifales viables ml⁻¹, de la cual se tomaron 10µl que fueron sembrados en masivo sobre 15ml de medio CCM sólido servido en cajas de Petri de 90mmx15mm, garantizando la misma concentración de inóculo para cada tratamiento objeto de estudio.

2.3. Análisis de la Respuesta de *A. chrysogenum* a condiciones de estrés.

El análisis de la respuesta a condiciones de estrés, se realizó en medio agar CCM, teniendo como condición control los cultivos sin ser sometidos a los tratamientos estresantes. Todos los ensayos fueron configurados por triplicado en tres experimentos independientes, incluido el control.

A partir de cultivos del hongo en medio sólido CCM incubado a 26°C por 48 horas, se extrajeron bocados de 5mm de diámetro y 2mm de alto, cubiertos de micelio sin formación de conidióforos. Estos discos de agar fueron insertados centralmente en placas Petri con 15ml de agar CCM, el cual había sido suplementado con el agente generador de estrés. En el caso del estrés osmótico, se usaron tres osmolitos: NaCl, KCl y glicerol, que fueron ensayados a concentraciones de 0,5 M y 1,0M. En la evaluación del estrés oxidativo, se empleó el agente oxidante H₂O₂ a concentraciones de 50mM y 100mM (Shin & Yu, 2013). En todos los casos, las placas Petri fueron incubadas total oscuridad a 26°C durante 15 días.

El efecto de la luz se verificó sobre cultivos en agar CCM inoculados centralmente con el disco de agar, tal como ya fue descrito. Las placas inoculadas fueron incubadas a 26°C durante 24 horas en total oscuridad (DD). Posteriormente, se dividieron en el grupo control (DD), el que fue sometido a radiación de luz blanca en un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad (LD) y el grupo que sufrió la radiación de luz blanca de manera constante (LL). La temperatura de incubación se mantuvo en 26°C.

2.4. Toma y análisis de datos.

Para todos los tratamientos, luego de 24 horas, se demarcó el crecimiento de las colonias y posteriormente se siguió la demarcación en anillos concéntricos del crecimiento del micelio tomando como referencia el reverso de la colonia. Las mediciones fueron registradas fotográficamente y mediante el uso del software ImageJ se estimó la extensión radial diferencial entre los tiempos de medición, que obedecieron a intervalos de 48 horas. Finalmente, se procedió a analizar la cinética de crecimiento y determinar la tasa de extensión apical en mm/h (Torrent et al., 2017).

Los resultados obtenidos fueron analizados con el software estadístico SPSS vs 21 de IBM. Teniendo en cuenta la distribución de los datos y las medidas de tendencia central, se llevaron a cabo análisis

paramétricos y no paramétricos, así como análisis de comparación múltiple de muestras con un nivel de confianza del 95,0% ($p > 0,05$).

3. Resultados y Discusión.

3.1. *A. chrysogenum* tolera condiciones de estrés oxidativo generadas por peróxido de hidrógeno.

El conjunto de los datos mostraron unas medias con unas desviaciones estándar similares entre sí, por lo que con base en su análisis (ANOVA) podemos decir que la exposición de *A. chrysogenum* a un agente oxidante fuerte como el peróxido de hidrógeno, en concentraciones de 50 mM y 100 mM, no tuvo un efecto estadísticamente significativo, sobre la tasa de crecimiento apical (Fig. 1). Adicionalmente, tampoco se observaron alteraciones fenotípicas fuera de lo común, que pudieran relacionarse con este tipo de estrés. Estos resultados sugieren que *A. chrysogenum* debe presentar una maquinaria intracelular capaz de mantener el balance redox frente a agentes oxidantes fuertes, lo que le permite soportar el estrés oxidativo sin tener afectaciones graves en su desarrollo vegetativo.

Este hallazgo tiene soporte en la poca literatura que existe al respecto, puesto que en *A. chrysogenum*, los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo están mediados por especies antioxidantes, entre las que se encuentran proteínas altamente conservadas en eucariotas como: catalasas, tioredoxinas, glutaredoxinas, peroxiredoxinas, superóxido dismutasas (Long et al., 2012; Liu et al., 2013; Wang et al., 2014). Lo interesante en este hongo, es que estudios moleculares han podido establecer que en respuesta a las condiciones oxidantes del medio, participan proteínas que son claves en procesos básicos de su desarrollo, como la autofagia y la artrosporación (Wang et al., 2014; Kluge & Kück, 2018). Se ha reportado como la ausencia de una proteína que promueve el desarrollo de artrosporas (Acmst1), produjo un fenotipo sensible al estrés oxidativo (Kluge & Kück, 2018), mientras que la ausencia de la proteína clave en la formación de autofagosomas, Acatg1, generó un fenotipo fuertemente resistente al estrés oxidativo (Wang et al., 2014). Teniendo en cuenta que la formación de artrosporas es un proceso habitual que sucede en el desarrollo del hongo, bajo condiciones nutricionales normales, y que la autofagia es un recurso de supervivencia del hongo frente a condiciones de escasas nutrición, en la que se recurre a la degradación de componentes celulares para reciclar nutrientes, resulta lógico considerar que mientras el proceso autofágico permanezca reprimido y las condiciones del entorno permitan la artrosporación, el hongo muestre resistencia al estrés oxidativo. Lo anterior concuerda con lo observado, ya que las mediciones se hicieron en condiciones nutricionales normales, sin someter al hongo a estrés nutricional.

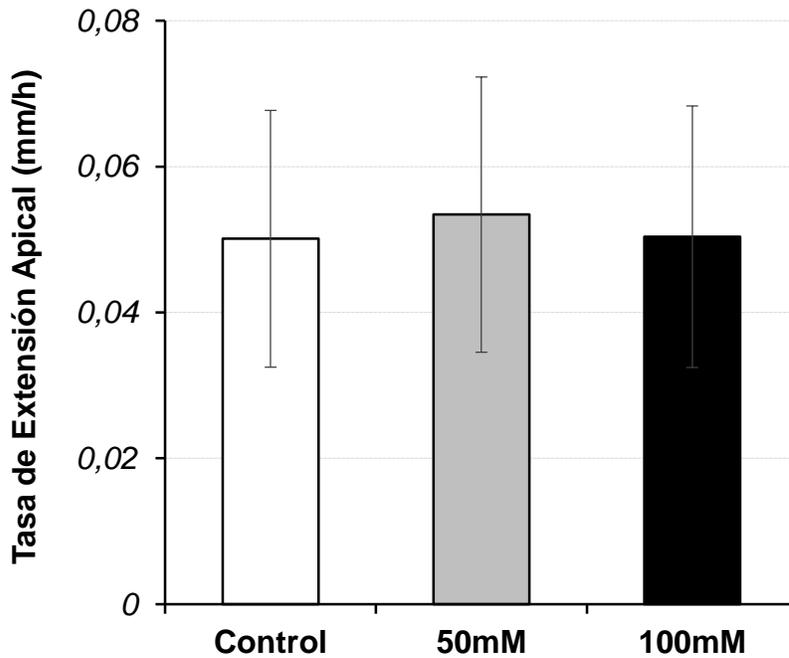


Figura 1. Comparación del crecimiento apical de *A. chrysogenum* en medio sólido bajo condiciones de estrés oxidativo. Se muestran las tasas de extensión apical (mm/h) en medio CCM con concentraciones de 50mM y 100mM de H₂O₂, en comparación con la condición control (CCM sin H₂O₂). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas en tres experimentos independientes.

3.2. La respuesta de *A. chrysogenum* frente a estrés osmótico, depende de la naturaleza del osmolito empleado.

Uno de los factores que no solo afecta el ciclo de vida de los hongos, sino que puede conducirlos a la muerte, es el aumento de la osmolaridad externa en un rango mayor a la fisiológica, condición que deriva en estrés hiperosmótico. Frente a esta condición medioambiental los hongos han desarrollado un mecanismo protector mediante la movilización de solutos compatibles, que conduce a su acumulación. Los solutos compatibles son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, altamente solubles, como azúcares, polioles y aminoácidos, empleados por el hongo para balancear la osmolaridad previniendo la pérdida de agua (Duran et al., 2010; Boudreau et al., 2013). Esta capacidad de osmoadaptación es crucial en las rutas de biosíntesis de metabolitos, siendo el estrés osmótico un factor crítico en la producción de enzimas de interés en fermentaciones industriales (Duran et al., 2010).

Al someter al hongo a condiciones de estrés osmótico, la respuesta del mismo estuvo influenciada por el osmolito utilizado. Cuando se empleó NaCl se observó que una concentración de 0,5 M propició un incremento de alrededor del 50% en su velocidad de crecimiento sobre medio sólido. Este llamativo resultado contrasta con lo observado al usar la misma concentración de KCl, condición en la que el hongo disminuyó su crecimiento, logrando una tasa cercana al 75% de la tasa presentada en condiciones control. Si continuamos con la comparación, podemos destacar que al someter a *A.*



chrysogenum a una concentración de 1 M de KCl, el efecto represor del crecimiento fue muy notorio, ya que apenas alcanzó un 18% de la tasa registrada para el mismo hongo sin el osmolito; mientras que por su parte, una concentración de 1 M de NaCl produjo una leve afectación del crecimiento (Fig. 2A). Lo anterior nos indica un comportamiento osmotolerante cuando el osmolito usado es el NaCl, mientras que hay osmosensibilidad cuando el osmolito es el KCl (Fig. 2B).

La osmoadaptación frente a elementos usualmente tóxicos como el sodio, en especial cuando en su hábitat se presentan constantemente concentraciones altas de sales, explican el efecto observado por el NaCl sobre la tasa de crecimiento de *A. chrysogenum*, puesto que se trata de un hongo filamentoso de origen marino, que fue aislado en 1945 (Brotzu, 1948) de aguas del mar mediterráneo de la isla de Cerdeña (Italia). Esta osmotolerancia es un comportamiento observado en hongos de origen marino, mientras que la osmosensibilidad se ha registrado en hongos de origen terrestre como *Fusarium graminearum*, *Penicillium roqueforti* y *Aspergillus niger* donde el NaCl a bajas concentraciones es tolerado, mientras que a concentraciones superiores al 0,2M NaCl causan una disminución en la tasa de crecimiento apical (Ochiai et al., 2007; Samapundo et al., 2010).

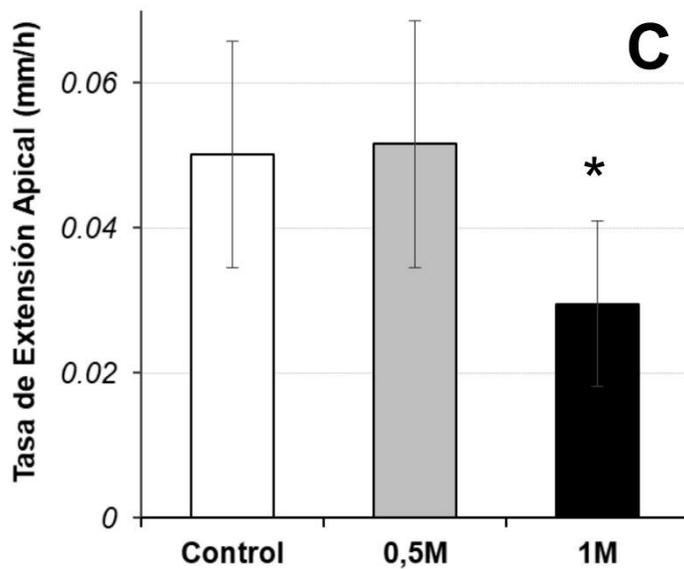
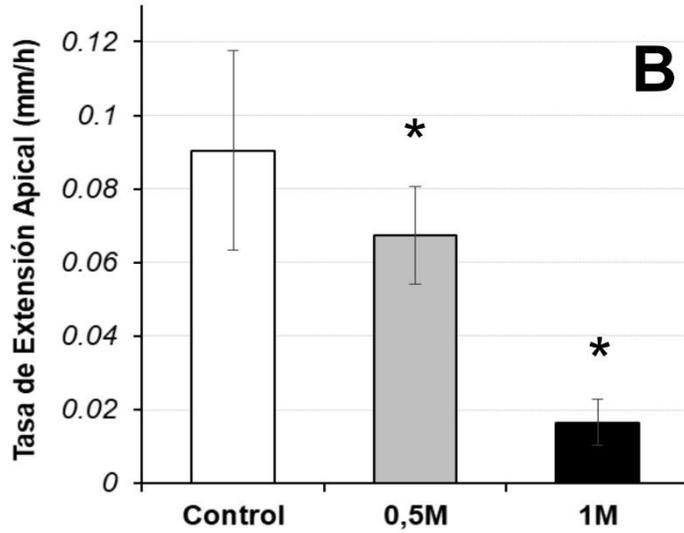
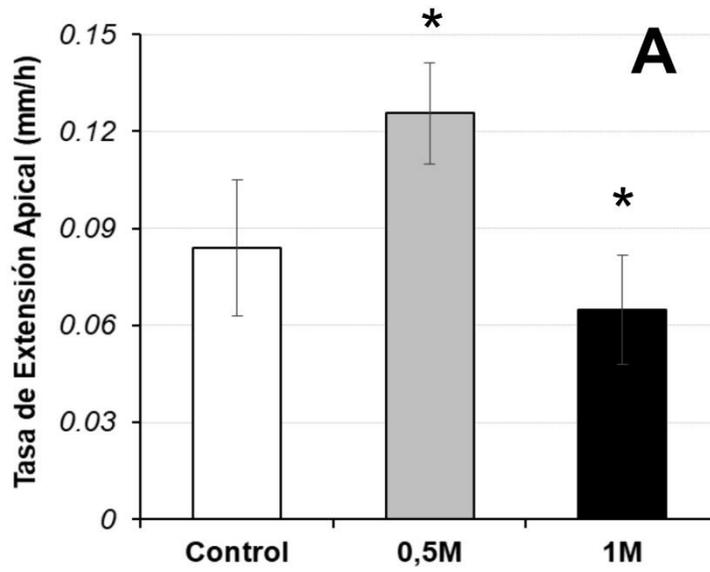


Figura 2. Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de *A. chrysogenum* en medio sólido. Se calcularon las tasas de extensión apical (mm/h) en medio CCM suplementado con (A) NaCl, (B) KCl y (C) Glicerol, a concentraciones finales de 0,5M y 1M, en comparación con la condición control (CCM sin osmolito). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas en tres experimentos independientes. El símbolo * indica que el incremento o disminución en la tasa de la condición evaluada fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$ ANOVA test) en comparación con la condición control.

La alcalinización del medio de cultivo por la presencia de potasio, conlleva a la salida de calcio y un posterior ingreso de potasio al interior celular. Este ingreso de potasio ocurre por intercambio de un protón H^+ que acidifica el medio externo. Si la salida de calcio, es alta, es probable que el requerimiento mínimo de calcio necesario para la extensión apical del hongo no se cumpla, y sea la causal del drástico decrecimiento observado en *A. chrysogenum* en un ensayo realizado en medio CCM, que no ofrece fuente de calcio extracelular.

De otra parte, en presencia de glicerol no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las tasas de crecimiento de las colonias sometidas a un entorno con 0,5 M del osmolito y las colonias de los controles (Fig. 2C). Sin embargo, a una concentración de 1M la velocidad de crecimiento fluctuó en torno al 60% de la velocidad registrada en la condición control. En este caso, debemos considerar que la respuesta a diversos tipos de estrés involucra la ruta de señalización HOG, que es bien conservada en hongos aun cuando no sea idéntica para todas las especies, (Duran, et al., 2010). La ruta HOG es responsable de mantener un balance de agua en condiciones hiperosmóticas e hiposmóticas, e induce la síntesis y acumulación de glicerol, que es un “osmolito compatible”.

Los osmolitos compatibles son acumulados en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación generada por estrés osmótico y tienen la característica de acumularse en grandes cantidades sin afectar el funcionamiento de la célula. El glicerol es también utilizado como fuente de carbono y como agente de protección frente a estrés térmico, y es acumulado intracelularmente cuando hay una alta ósmosis externa (Bahn & Jung, 2013). Debido a su condición de osmolito orgánico y compatible, y según los resultados obtenidos, se hacen necesarias concentraciones de 1M o superiores para conseguir un efecto negativo sobre el crecimiento vegetativo de *A. chrysogenum*.

3.2. El fotoperiodo 12/12 promueve el crecimiento de *A. chrysogenum*.

Cuando *A. chrysogenum* fue sometido a condiciones de oscuridad permanente (DD), usada como condición control, se registró una tasa de extensión apical en torno a 0,07 mm/h (Fig. 3). Este resultado fue similar al observado cuando las condiciones de crecimiento fueron de iluminación permanente (LL) con luz blanca. De manera que la total oscuridad o la constante iluminación no afectaron significativamente la tasa de crecimiento vegetativo del hongo (Fig. 3). Sin embargo, cuando el hongo fue expuesto a condiciones cambiantes de luz y oscuridad, usando una fotoperiodicidad de 12 h de luz blanca vs. 12 h de oscuridad (LD), se observó un efecto estimulador del crecimiento, consiguiendo un incremento de alrededor de un 35% en la tasa de extensión apical.

El movimiento de rotación del planeta, determina periodos de exposición a la radiación lumínica, que comprende un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad diariamente, frente al cual los hongos



han desarrollado diversos fotoreceptores que le permiten obtener información sobre el medio (Cockrell et al., 2015; Dunlap & Loros, 2017; Schumacher et al., 2017). En diversos hongos filamentosos de los géneros *Neurospora*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Trichoderma*, entre otros, han sido observados patrones de respuesta en los cambios fenotípicos de las colonias expuestas a la luz, indicando la presencia de un ritmo circadiano, el cual también afecta el metabolismo secundario (Greene et al., 2003; Salichos & Rokas, 2010; Castrillo & Avalos, 2014; Cockrell et al., 2015; Schumacher et al., 2017). Por su parte, en hongos como *Cryptococcus neoformans*, *Neurospora crassa*, *Monascus purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* y *Penicillium purpurogenum* se ha observado que la exposición a la luz LD reduce el crecimiento vegetativo y promueve el desarrollo de hifas aéreas y la conidiogénesis (Idnurm & Heitman, 2005; Velmurugan et al., 2010), comportamiento que resulta opuesto a lo observado en *A. chrysogenum*, donde la exposición a un fotoperiodo de luz blanca LD, tuvo un efecto estimulante del desarrollo hifal.

Los hongos reaccionan a la iluminación de diferentes formas, generando cambios en el crecimiento en presencia de luz, o por efecto de pulsos de iluminación, que tienen un papel regulador del estado sexual/asexual del hongo (Idnurm & Heitman, 2005; Brandhoff et al., 2017). Por ejemplo, en *N. crassa* y *Trichoderma atroviride*, la exposición a la luz da paso a la conidiogénesis, observándose la formación de anillos concéntricos de micelio aéreo y conidios, alternando con anillos concéntricos de micelio vegetativo (Yoshida et al., 2008). Al analizar el fenotipo macroscópico de *A. chrysogenum* no se observó la formación de bandas de conidiación e interbandas sin formación de hifas aéreas, que son típicas del ritmo circadiano (Dunlap & Loros, 2017). Incluso *A. chrysogenum*, luego de 48 horas de crecimiento, desarrolló conidióforos de manera independiente al tiempo de exposición a la luz, distribuidos principalmente hacia el centro de la colonia. Es decir, que *A. chrysogenum* no mostró indicios de ritmicidad asociada al crecimiento hifal, para los fotoperiodos empleados, por lo que es posible que carezca de ritmo circadiano. La ausencia de ritmos circadianos en hongos se relaciona con la autosostenibilidad y estabilidad de los estados metabólicos (Cockrell et al., 2015), una característica deseable en organismos de uso industrial y un hallazgo que podría explicar la capacidad de *A. chrysogenum* para adaptarse a nuevos ambientes (Karaffa, et al., 2003) y para desarrollar hifas de crecimiento rápido que fueron observadas en la macromorfología de las colonias en condiciones de crecimiento normales y bajo condiciones de estrés.

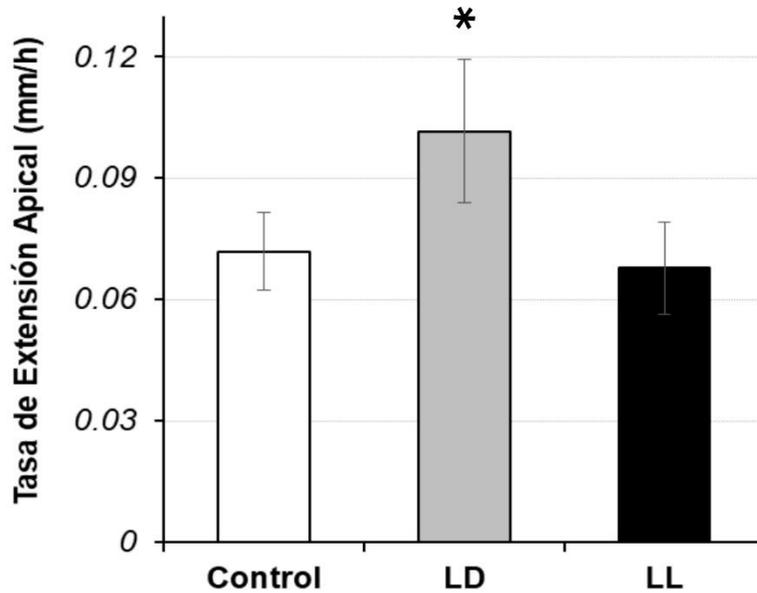


Figura 3. Crecimiento de *A. chrysogenum* en diferentes condiciones de fotoperiodicidad. Se indican las tasas de extensión apical (mm/h) del hongo en condiciones de radiación de luz blanca en un fotoperiodo diario de 12 horas luz/12 horas oscuridad (LD), de 24 h/día (LL), en comparación con la condición control (oscuridad permanente DD). Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas en tres experimentos independientes. El símbolo * indica que el incremento en la condición evaluada fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$ ANOVA test) en comparación con la condición control.

Conclusiones

El estrés oxidativo generado por el uso de peróxido de hidrogeno, como agente oxidante, en concentraciones de hasta 100mM, fue tolerado muy bien por el hongo filamentoso *A. chrysogenum*, ya que no afectó ni su fenotipo, ni su tasa de crecimiento en medio de cultivo sólido.

La tolerancia del hongo a condiciones de estrés osmótico fue variada dependiendo del osmolito utilizado. El uso de KCl permitió evidenciar el efecto negativo del estrés osmótico sobre el crecimiento del hongo, al registrarse una drástica disminución de la tasa de extensión apical a concentraciones de 1 M. Mientras que una concentración de 0,5M de NaCl generó un efecto positivo sobre el crecimiento vegetativo. Por su parte, el estrés osmótico generado por el uso de glicerol fue atenuado por su condición de osmolito compatible.

El estrés lumínico LL no afectó la tasa de crecimiento del hongo, mientras que la condición LD la incrementó.

Finalmente, aquellas condiciones estresantes evaluadas en este trabajo y que se encuentran en el hábitat natural del hongo, permitieron poner en evidencia una adaptación evolutiva. Tal adaptación se refleja en dos hallazgos de este estudio: la osmotolerancia de *A. chrysogenum* frente a NaCl y el efecto estimulador del crecimiento vegetativo que ejerce la fotoperiodicidad LD (12/12).



Referencias bibliográficas

Alberti F, Foster GD, Bailey AM. (2017). Natural products from filamentous fungi and production by heterologous expression. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101(2):493-500.

Bahn YS, Jung KW. (2013). Stress signaling pathways for the pathogenicity of *Cryptococcus*. *Eukaryot Cell.* 12(12):1564-77.

Bayram O, Braus GH. (2012). Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol Rev.* 36(1):1-24.

Boudreau BA, Larson TM, Brown DW, Busman M, Roberts ES, Kendra DF, McQuade KL. (2013). Impact of temperature stress and validamycin A on compatible solutes and fumonisin production in *F. verticillioides*: role of trehalose-6-phosphate synthase. *Fungal Genet Biol.* 57:1-10.

Brandhoff B, Simon A, Dornieden A, Schumacher J. (2017). Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators BcLTF3 and BcREG1. *Curr Genet.* 63(5):931-949.

Brotzu G. (1948). Ricerche Su di un Nuovo Antibiotico. *Lavori Dell'Instituto D'Igiene du Cagliari.* 1-11.

Castrillo, M; Avalos, J. (2014). Light-Mediated Participation of the VIVID-like Protein of *Fusarium fujikuroi* VvdA in Pigmentation and Sevelopment. *Fungal Genet Biol.* 71:9–20.

Cockrell AL, Pirlo RK, Babson DM, Cusick KD, Soto CM, Petersen ER, Davis MJ, Hong CI, Lee K, Fitzgerald LA, Biffinger JC. (2015). Suppressing the *Neurospora crassa* circadian clock while maintaining light responsiveness in continuous stirred tank reactors. *Sci Rep.* 5:10691.

Chávez R, Fierro F, García-Rico RO, Vaca I. (2015). Filamentous fungi from extreme environments as a promising source of novel bioactive secondary metabolites. *Front Microbiol.* 9;6:903. doi: 10.3389/fmicb.2015.00903.

Dreyer J, Eichhorn H, Friedlin E, Kürnsteiner H, Kück U. (2007). A homologue of the *Aspergillus* velvet gene regulates both cephalosporin C biosynthesis and hyphal fragmentation in *Acremonium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol.* 73(10):3412-3422.

Dunlap JC, Loros JJ. (2017). Making Time: Conservation of Biological Clocks from Fungi to Animals. *Microbiol Spectr.* 5(3). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0039-2016.

Duran R, Cary JW, Calvo AM. (2010). Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins (Basel).* 2(4):367-381.

Fukuda T, Naka W, Tajima S, Nishikawa T. (1996). Neutral red assay in minimum fungicidal concentrations of antifungal agents. *J Med Vet Mycol.* 34(5):353-6.

García-Rico RO, Fierro F. (2017). Role of G-protein alpha sub-units in the morphogenic processes of filamentous Ascomycota fungi. *Rev Iberoam Micol.* 34(1):1-9.



- García-Rico RO, Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, Vaca I, Figueroa L, Levicán G, Chávez R. (2017). Heterotrimeric G protein alpha subunit controls growth, stress response, extracellular protease activity, and cyclopiazonic acid production in *Penicillium camemberti*. *Fungal Biol.* 121(9):754-762.
- Greene AV, Keller N, Haas H, Bell-Pedersen D. (2003). A circadian oscillator in *Aspergillus* spp. regulates daily development and gene expression. *Eukaryot Cell.* 2(2):231-7.
- Hu Y, Zhu B. (2016). Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer. *Synth Syst Biotechnol.* 1(3):143-149.
- Idnurm A, Heitman J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.* 3(4):e95.
- Karaffa L, Sándor E, Fekete E, Kozma J, Szentirmai A, Pócsi I. (2003). Stimulation of the cyanide-resistant alternative respiratory pathway by oxygen in *Acremonium chrysogenum* correlates with the size of the intracellular peroxide pool. *Can J Microbiol.* 49(3):216-20.
- Kluge J, Kück U. (2018). *AcAxl2* and *AcMst1* regulate arthrospore development and stress resistance in the cephalosporin C producer *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet.* 64(3):713-727.
- Liu J, Gao W, Pan Y, Liu G. (2018). Metabolic engineering of *Acremonium chrysogenum* for improving cephalosporin C production independent of methionine stimulation. *Microb. Cell Fact.* 17, (1): 87.
- Liu L, Long LK, An Y, Yang J, Xu X, Hu CH, Liu G. (2013). The thioredoxin reductase-encoding gene *ActrxR1* is involved in the cephalosporin C production of *Acremonium chrysogenum* in methionine-supplemented medium. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(6):2551-62.
- Long LK, Yang J, An Y, Liu G. (2012). Disruption of a glutathione reductase encoding gene in *Acremonium chrysogenum* leads to reduction of its growth, cephalosporin production and antioxidative ability which is recovered by exogenous methionine. *Fungal Genet Biol.* 49(2):114-22.
- López-Calleja AC, Cuadra T, Barrios-González J, Fierro F, Fernández FJ. (2012). Solid-state and submerged fermentations show different gene expression profiles in cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 22(2):126-134.
- Ochiai N, Tokai T, Nishiuchi T, Takahashi-Ando N, Fujimura M, Kimura M. (2007). Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum*. *Biochem Biophys Res Commun.* 363(3):639-44.
- Ozcengiz G, Demain AL. (2013). Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. *Biotechnol Adv.* 31(2):287-311.
- Rangel DE, Alston DG, Roberts DW. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycol Res.* 112(Pt 11):1355-1361.
- Salichos L, Rokas A. (2010). The diversity and evolution of circadian clock proteins in fungi. *Mycologia.* 102(2):269-78.



Samapundo S, Deschuyffeleer N, Van Laere D, De Leyn I, Devlieghere F. (2010). Effect of NaCl reduction and replacement on the growth of fungi important to the spoilage of bread. *Food Microbiol.* 27(6):749-56.

Schueffler A, Anke T. (2014). Fungal natural products in research and development. *Nat Prod Rep.* 31(10):1425-1448.

Schumacher J. (2017). How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet Biol.* 106:26-41.

Shin KS, Yu JH. (2013). Expression and Activity of Catalases Is Differentially Affected by GpaA (Ga) and FlbA (Regulator of G Protein Signaling) in *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology.* 41(3):145-148.

Torrent C, Gil-Durán C, Rojas-Aedo JF, Medina E, Vaca I, Castro P, García-Rico RO, Cotoras M, Mendoza L, Levicán G, Chávez R. (2017). Role of *sfk1* Gene in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *Front Microbiol.* 8:2424. doi: 10.3389/fmicb.2017.02424.

Velasco J, Luis Adrio J, Angel Moreno M, Díez B, Soler G, Barredo JL. (2000). Environmentally safe production of 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) using recombinant strains of *Acremonium chrysogenum*. *Nat Biotechnol.* 18(8):857-861.

Velmurugan P, Lee YH, Venil CK, Lakshmanaperumalsamy P, Chae JC, Oh BT. (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *J Biosci Bioeng.* 109(4):346-50.

Valderrama, N.T. & Morales-Puentes., M.E. 2016. Frutos y semillas en remanentes de bosque altoandino del Páramo de Rabanal (Boyacá, Colombia). *Bistua Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 14(2): 141-168.

Wang H, Pan Y, Hu P, Zhu Y, Li J, Jiang X, Liu G. (2014). The autophagy-related gene *Acatg1* is involved in conidiation and cephalosporin production in *Acremonium chrysogenum*. *Fungal Genet Biol.* 69:65-74.

Yoshida Y, Maeda T, Lee B, Hasunuma K. (2008). Conidiation rhythm and light entrainment in superoxide dismutase mutant in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics.* 279(2):193-202.

*Para citar este artículo: Aldana Bohórquez S.M., García-Rico R.O. Effect of different stress conditions on the vegetative growth of the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Revista Bistua*.2019. 17(2):182-195.

+ Autor para el envío de correspondencia y la solicitud de las separatas :García-Rico R.O.Universidad de Pamplona Km1 vía Bucaramanga. Edificio Simón Bolívar. Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). E-mail: rovigar@hotmail.com