



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

**Movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma*
spp. y esporas de *Agaricus bisporus* var. portobello**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Q.F.B. LILIA YUNUEN SALAZAR ALCANTAR

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Virginia Angélica Robinson Fuentes



Morelia, Mich., Agosto 2018

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

aprobó la tesis presentada por:

Química Farmacobióloga LILIA YUNUEN SALAZAR ALCANTAR

Doctora en Ciencias (Biología)
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Doctor en Biotecnología de Plantas
Gerardo Vázquez Marrufo

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Edith Higareda Mendoza

Doctora en Ciencias Biológicas
Ana Laura Guillén Nepita

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad
CONACYT como programa consolidado

La autora de esta tesis, estudiante de la
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada para la realización de la
Maestría en Ciencias de la Salud

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrado

Laboratorio de Desarrollo Analítico

Dedicatorias

Esta tesis va dedicada para las personas más importantes en mi vida

Mi hermana Zulem que aunque ya no te tengo a mi lado, siempre te llevo en mi mente y corazón, siempre serás mi Ángel de la guarda porque sé que sigues cuidando de mí como lo hacías en vida. Te amaré por siempre.

Mi amor chiquito Said, porque desde que llegaste has sido mi más grande motivo e inspiración, mis ganas de salir adelante y mi fuerza, te amo mi pollito. Gracias por hacerme la más feliz con tus ocurrencias.

Mi amor Alex, no tengo forma de agradecerte el estar siempre presente apoyándome en todo, tu compañía en este camino me ha hecho todo más fácil y llevadero. Gracias por confiar en mí y animarme a seguir cuando me daban ganas de rendirme. Te amo mucho.

Mi Mamá, sin ti nunca lo hubiera logrado, todo lo que he hecho es gracias a ti y a tu apoyo, eres la mujer más valiente y hermosa que conozco y agradezco a la vida el que me hayas tocado a mí. Te amo mami y gracias por ser la mejor Má de mi latoso.

Mi hermano Edgar, gracias por siempre estar al pendiente de nosotros y por todo el apoyo que me brindas cuando te necesito. Te adoro superhermano.

Mi hermano Mundo, porque eres una persona noble, siempre voy a estar tratando de hacer lo mejor para ti. Te adoro.

Mi cuñada Araceli, gracias por tanto apoyo y por siempre estar al pendiente de nosotros y de mi bebé, soy muy feliz de que seas parte de nuestra familia. Te adoro.

Mi chaparro Joan, porque eres el hermano mayor de Said, me sorprendes con tu nobleza y con la manera que tienes de ser una gran persona, te adoro y siempre voy a estar para ti.

Mi chaparro Irving, porque también eres el hermanito de Said y siempre estas cuidándolo, eres un gran niño y sé que te esfuerzas por cada día ser mejor y yo siempre voy a estar apoyándote, Te adoro.

Mi chaparro Naim, porque eres el más sensible, responsable y preocupado por la familia aunque demuestres lo contrario, gracias por tenerme esa confianza y recuerda que siempre que me necesites aquí va a estar tu Tía-madrina, te Adoro.

Mi princesa Naomi, porque a pesar de ser la más pequeña has llegado muy lejos, admiro tu constancia y disciplina para lograr lo que quieres, siempre estaré apoyando tus sueños. Te adoro.

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a la **D.C. Virginia A. Robinson Fuentes** por todo el conocimiento brindado, por la paciencia y atención que siempre tiene con todos sus alumnos, porque estos cinco años que estuve en el Laboratorio de Desarrollo Analítico me ayudaron a crecer no solo profesionalmente si no de manera personal. Muchas gracias Doctora por todas sus sugerencias, indicaciones, correcciones, conocimientos y tiempo que me ha brindado, me han servido mucho y lo demuestra la obtención de dos títulos con su asesoría. Le agradezco también la confianza que me ha ofrecido, las veces que me ha aconsejado y aterrizado en mis ratos de ansiedad. La aprecio mucho y la tendré presente siempre porque además de ser una excelente profesionalista es una gran persona.

Agradezco a la **D.C. Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas** por formar parte de mi comité tutorial, por siempre tener una sugerencia para mejorar el proyecto, por estar al pendiente del avance del proyecto y prestarme material de su laboratorio, por sus correcciones y ayuda para culminarlo.

Agradezco a la **D.C. Ana Edith Higareda Mendoza** por formar parte de mi comité tutorial, por tener siempre comentarios propositivos para el proyecto y tomarse el tiempo para resolverme dudas y apoyarme con la técnica de citometría de flujo, por sus correcciones y ayuda para culminarlo.

Agradezco al **D.C. Gerardo Vázquez Marrufo** por formar parte de mi comité tutorial, por las facilidades brindadas para la obtención del material biológico, por ser siempre propositivo en los seminarios con el fin de mejorar el proyecto, por sus correcciones y ayuda para culminarlo.

Agradezco a la **D.C. Ana Laura Guillén Nepita** por formar parte de mi mesa sinodal y tomarse el tiempo de revisar este proyecto.

Agradezco a mis compañeros de generación 2016-2018 por todos los momentos, los consejos, orientaciones y sufrimientos en clases que compartimos, de todos me quedara un gran recuerdo y me llevo su amistad.

Agradezco a mis amigos de laboratorio Pablito, Wilmer, Xiomara y Karen por hacer de mis días en el laboratorio una gran experiencia. De todos me llevo grandes recuerdos, consejos y hasta lagrimas compartidas, voy a extrañar la comedera, el café y las terapias de risa que teníamos, los quiero mucho y me los llevo en el corazón.

Agradezco a Andy y Kary por estar siempre presentes y al pendiente, con ustedes compartí alegrías y frustraciones desde que comenzamos este camino, las quiero mucho y gracias por su amistad me la quedo para siempre.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Hongos	5
2.1.1 Pared celular fúngica	5
a) Glucano	5
b) Glicoproteínas	6
c) Quitina	6
d) Melanina	6
2.1.2 Importancia del estudio de los hongos	8
a) Saprobios	8
b) Mutualismo	8
c) Micoparasitismo	8
2.2 <i>Trichoderma spp.</i>	9
2.2.1 Generalidades	9
2.2.2 Características	10
a) Micoparasitismo	11
b) Competencia por nutrientes y espacio	11
c) Antibiosis	12
2.2.3 Ciclo de vida de <i>Trichoderma spp.</i>	12
2.2.4 Usos y aplicaciones de <i>Trichoderma</i>	14
2.3 <i>Agaricus bisporus</i>	17
2.3.1 Ciclo de vida de <i>Agaricus bisporus</i>	18
2.3.2 Importancia agronómica.	19
2.4 Relación entre <i>Trichoderma spp.</i> y <i>Agaricus bisporus</i>	20
2.5 Electroforesis capilar	20
2.5.1 Capilares	21
2.5.2 Detección	21
2.6 Electroforesis capilar de zona (ECZ)	22
2.6.1 Factores que causan la movilidad de los analitos en la electroforesis capilar	23
a) Movilidad electroforética (μ_{ep})	23
b) Flujo electroosmótico (FEO) y formación de doble capa eléctrica	24
2.6.2 Partículas coloidales: origen de la carga de los microorganismos	25
2.6.3 Buffers utilizados para controlar FEO en ECZ	26
2.7 Tipos de Electroforesis capilar	28
2.7.1 Cromatografía capilar micelar electrocinética (MECC)	28
a) Aplicaciones de MECC	29
2.7.2 Electroforesis quiral cromatográfica.	29
a) Complejación por intercambio de ligandos	30
b) Complejación "host-guest" o de inclusión	30
2.7.3 Ciclodextrinas (CDs)	31
a) Ventajas de EC en las separaciones quirales	33
2.7.4 Iones divalentes: $CaCl_2$	33

2.8 Antecedentes de identificación de microorganismos y células fúngicas utilizando electroforesis capilar	34
2.8.1 Trabajos de identificación de células fúngicas por EC en el Laboratorio de Desarrollo Analítico	35
2.9 Citometría de flujo	36
III. JUSTIFICACIÓN	38
IV. HIPÓTESIS	39
V. OBJETIVO GENERAL	39
5.1 Objetivos específicos	39
VI. ESTRATEGIA	40
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	41
7.1 Material biológico	41
7.2 Preparación de solución stock de MMV	41
7.2.1 Preparación del medio de cultivo: Medio Mínimo Vogel	42
7.3 Cultivo de especies de <i>Trichoderma</i> spp.	43
7.3.1 Estimulación de la conidiación.	43
7.3.2 Recolección de conidias de <i>Trichoderma</i>	43
7.4 Recolección de esporas de <i>Agaricus bisporus</i>	44
7.5 Conteo de conidias en cámara de Neubauer	45
7.6 Viabilidad de las células analizadas	46
7.7 Electroforesis capilar: Instrumentación	47
7.7.1 Análisis de vial de salida de análisis electroforéticos	48
7.7.2 Preparación de las muestras para corrimientos electroforéticos	49
7.7.3 Mezcla <i>Agaricus bisporus</i> var. <i>portobello</i> y <i>Trichoderma atroviride</i>	49
7.7.4 Mezcla de cuatro especies silvestres del género <i>Trichoderma</i>	50
7.7.5 Preparación de soluciones	50
7.7.6 Aditivos en buffer de corrimiento (BGE) y muestra	51
7.7.7 Corrimientos electroforéticos utilizando CaCl_2 en la preparación de la muestra	51
7.7.8 Variación de concentración de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> en la muestra preparada con CaCl_2	51
7.8 Microelectroforesis capilar	52
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
8.1 Concentración de conidias	54
8.1.1 Análisis espectrofotométrico	54
8.2 Análisis de vial de salida	57
8.3 Viabilidad de las conidias de <i>Trichoderma</i>	58
8.4 Efecto de β-CDs en los corrimientos electroforéticos	60
8.4.1 Interacción entre las células fúngicas y las β -CDs	63
8.5 Corrimientos electroforéticos con CTAB	64
8.5.1 Interacción de las células fúngicas con CTAB	67
8.6 Efecto del Brij 35 en los corrimientos electroforéticos	68
8.6.1 Interacción del Brij 35 con las células fúngicas en el interior del capilar	69
8.7 Efecto del CaCl_2 en los corrimientos electroforéticos	70

8.7.1 Efecto del CaCl ₂ en el corrimiento electroforético de <i>Agaricus bisporus</i>	75
8.7.2 Interacción del CaCl ₂ con <i>T. atroviride</i> y <i>A. bisporus</i> al interior del capilar	76
8.8 Efecto de la concentración de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> en el corrimiento electroforético	79
IX. RESUMEN DE RESULTADOS	82
X. CONCLUSIÓN	83
XI. PERSPECTIVAS	84
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Índice de Figuras

Nombre	Página
1. Componentes de pared celular fúngica.	7
2. Ciclo de vida de <i>Trichoderma</i> .	13
3. Características macro y microscópicas del genero fúngico <i>Trichoderma</i> .	14
4. Cepas de <i>Trichoderma</i> utilizadas en este estudio.	16
5. Partes que conforman a los basidiomicetos <i>Agaricus bisporus</i> .	18
6. Ciclo biológico de <i>Agaricus bisporus</i> .	19
7. Componentes de un sistema de electroforesis capilar.	22
8. Movilidad electroforética: migración del analito por su relación Masa/carga.	24
9. Representación de flujo electroosmótico y doble capa eléctrica.	25
10. Interacción entre analito y micelas.	29
11. Estrategia experimental.	40
12. Estimulación de la conidiación en las cepas de <i>Trichoderma</i> .	43
13. Recuperación de conidias.	44
14. Forma macroscópica y esporas de <i>Agaricus bisporus var. portobello</i> .	45
15. Área de los subcompartimentos para conteo de conidios.	45
16. Citometro de flujo CytoFLEX BECKMAN COULTER Life Sciences.	47
17. Equipo de Electroforesis Capilar.	47
18. Montaje de equipo de microelectroforesis capilar.	52
19. Curva patrón de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> .	55
20. Curva patrón de conidias de <i>Trichoderma viride</i> .	55

21. Curva patrón de conidias de <i>Trichoderma tomentosum</i> .	56
22. Curva patrón de conidias de <i>Trichoderma harzianum</i> .	56
23. Análisis de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> en citometro de flujo.	58
24. Porcentaje de viabilidad de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> obtenida por citometría de flujo.	59
25. Grafica FSC-A (tamaño celular) vs. PE-A (Fluorescencia) de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> , conidias viables (rosa) y no viables (negro), teñidas con colorante MUSE®.	59
26. Grafica SSC-A (Complejidad celular) vs. PE-A (Fluorescencia) de conidias de <i>Trichoderma atroviride</i> , conidias viables (rosa) y no viables (negro), teñidas con colorante MUSE®.	60
27. Corrimientos individuales de <i>T. atroviride</i> , <i>A. bisporus</i> , buffer HEPES 20mM pH 7.	60
28. Corrimientos electroforéticos individuales y en mezcla de <i>A. bisporus</i> y <i>T. atroviride</i> , buffer HEPES 20mM con adición de β -CDs.	61
29. Componentes de la pared celular fúngica interactuando con β -CDs.	63
30. Interacción de células fúngicas de <i>T. atroviride</i> y <i>A. bisporus</i> en presencia de β -CDs, en el interior del capilar.	64
31. Posible interacción de <i>Agaricus bisporus</i> y <i>Trichoderma atroviride</i> en presencia del surfactante catiónico CTAB en el interior del capilar.	65
32. Corrimientos electroforéticos de mezcla <i>A. bisporus</i> y <i>T. atroviride</i> , buffer HEPES con adición de CTAB 25mM.	66
33. Interacción de <i>A. bisporus</i> y <i>T. atroviride</i> en presencia de CTAB 25mM, observado en microelectroforesis capilar.	67
34. Corrimientos electroforéticos de mezcla de tres cepas de <i>Trichoderma</i> , utilizando HEPES como BGE adicionado con Brij 35.	68
35. Interacción de conidias de <i>Trichoderma</i> en presencia del surfactante no iónico Brij35, en el interior del capilar.	69

36. Fotogramas de la interacción de *A. bisporus* y *T. atroviride* en presencia de Brij 35 0.9mM, en el sistema de microelectroforesis capilar. 70
37. Señal electroforética obtenida en el análisis de *Trichoderma atroviride* utilizando CaCl_2 8mM, BGE HEPES 20mM a pH 7. 71
38. Par iónico formado entre el glucano y el CaCl_2 . 72
39. Repeticiones de análisis de la muestra de conidias de *Trichoderma atroviride* con CaCl_2 8mM, BGE HEPES 20mM pH 7. 73
40. Análisis electroforético de conidias de *Trichoderma atroviride* con CaCl_2 74
41. Señales electroforéticas obtenidas en análisis de la misma muestra de *T. atroviride* con CaCl_2 , HEPES 20mM pH 7, en diferentes días posteriores a su preparación. 74
42. Electroferograma obtenido del análisis de *Agaricus bisporus* con CaCl_2 , BGE HEPES 20mM a pH 7. 75
43. Fotogramas de la interacción de *A. bisporus* y *T. atroviride* en presencia de CaCl_2 8mM, en el sistema de microelectroforesis capilar. 78
44. Agregación de células fúngicas de *Trichoderma atroviride* y *A. bisporus* en presencia de CaCl_2 , observada en microscopio óptico marca Leica 40x. 78

Índice de Tablas

Nombre	Página
1. Enfermedades causadas por el género <i>Trichoderma</i> .	17
2. Buffers utilizados en EC.	27
3. Tipos de aditivos y funciones.	27
4. Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas naturales.	31
5. Cepas silvestres de género <i>Trichoderma</i> .	41
6. Componentes de la solución stock de MMV.	42
7. Condiciones para acondicionar capilares nuevos.	48
8. Método para corrimiento electroforético.	48
9. Condiciones para análisis de vial de salida.	49
10. Buffers y características utilizadas.	51
11. Concentración de conidias presentes en las suspensiones de las cuatro especies de <i>Trichoderma</i> .	54
12. Valores de absorbancia que arrojaron los viales de salida.	57
13. Valores de absorbancia que arrojaron los viales de salida.	79
14. Señales electroforéticas correspondientes a diferente número de conidias en el análisis.	80

Resumen

Trichoderma spp. es un hongo microscópico de amplia distribución y muy estudiado ya que tiene una gran capacidad metabólica. Es utilizado para la producción de enzimas industriales como pigmentos y quinonas, así como para la producción de más de 100 metabolitos con actividad antibiótica, y es ampliamente utilizado como control biológico. Algunas especies han resultado ser patógenos oportunistas, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, provocando que estén expuestos a sufrir algún tipo de micosis. *Agaricus bisporus* es un hongo basidiomiceto con gran importancia agronómica ya que representa un alimento con alto nivel nutricional, sobre todo en países en desarrollo. Se han reportado algunas especies del género *Trichoderma* como contaminantes de cultivos de setas de *Agaricus bisporus*. Por todo lo anterior, es necesario que la identificación de los microorganismos sea más rápida, sensible y más selectiva. En años recientes se ha propuesto a la electroforesis capilar como una técnica alternativa para este fin ya que nos permite conocer las propiedades de adherencia y repulsión que presentan las células fúngicas a superficies y otras células. **Objetivo general:** Evaluar el efecto de la incorporación de aditivos en el buffer de corrimiento, en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma* spp. y esporas de *Agaricus bisporus* var. *portobello*. **Metodología:** Buffer de corrimiento: HEPES y TBE; surfactantes: CTAB y Brij 35; selectores quirales: β -CDs. Citómetro de flujo CytoFlex con colorante de viabilidad Muse™. Espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™. **Resultados:** Se determinó el número aproximado de conidias de *Trichoderma* que conformaban la suspensión con la que se trabajaba. El volumen de inyección fue de 0.095 μ L que contenían 12.5X10⁶ conidias, de las cuales fueron detectadas 201267 conidias por corrimiento. La viabilidad de la población celular fue de 91%, sin mostrar diferencias en tamaño celular y granularidad entre células viables y no viables. En los corrimientos electroforéticos utilizando β -CDs se obtuvieron picos estrechos, definidos y simétricos. Al utilizar CTAB se obtuvieron picos sin resolución, agrupando a células de ambos géneros fúngicos. Con Brij 35 se obtuvieron múltiples señales electroforéticas. Con CaCl₂ se obtuvo un pico simétrico y definido de conidias de *T. atroviride*, mientras que *A. bisporus* no presentó movilidad electroforética en presencia de CaCl₂. **Conclusión:** Hay cambios en la movilidad electroforética de las células fúngicas debido a la incorporación de aditivos en el BGE; sin embargo, hay un efecto mayor cuando se usa CaCl₂.

Palabras clave: Electroforesis capilar, *Trichoderma* spp., *Agaricus bisporus*, surfactantes, iones divalentes.

ABSTRACT

Trichoderma is a microscopic fungus of wide distribution and great metabolic capacity. It is used for the production of industrial enzymes such as pigments and quinones, as well as for the production of more than 100 metabolites with antibiotic activity. In addition, it is widely used as a biological control. Some species have turned out to be opportunistic pathogens, especially in immunocompromised patients, causing them to be exposed to some type of mycosis. *Agaricus bisporus* is a basidiomycete fungus with great agronomic importance since it has a high nutritional value, especially in developing countries. Some species of the genus *Trichoderma* have been reported as contaminants of mushroom crops of *Agaricus bisporus*. Due to above information, it is necessary to perform the identification of such fungi in a faster, sensitive and more selective way. In recent years, capillary electrophoresis has been proposed as an alternative technique for this purpose since it is possible to learn about the adhesion and repulsion properties of fungal cells to surfaces and other cells.

Objective: To evaluate the effect of additives in the BGE on the electrophoretic mobility of conidia of *Trichoderma* sp and spores of *Agaricus bisporus* var. *Portobello*.

Methodology: BGE: HEPES and TBE; surfactants: CTAB, Brij 35; chiral selectors: β -CDs. Flow Cytometer: Cytoflex with Viability dye Muse™. Spectrophotometer Spectronic® 20 Genesys™.

Results: The approximate number of *Trichoderma* conidia in the suspension used, was determined. The injection volume was 0.095 μ L containing 12.5×10^6 conidia, of which 201267 were detected by the electrophoretic assay. The viability of the cell population was 91% without showing differences in cell size and granularity between viable and non-viable cells. The electropherograms obtained using β -CDs, the peaks were narrow, defined and symmetrical. With CTAB, unresolved peaks were obtained since the cells of both fungal genus were grouped. With Brij 35, multiple electrophoretic signals were obtained. With CaCl_2 a symmetric and defined peak of conidia of *T. atroviride* was obtained, *A. bisporus* does not present electrophoretic mobility in the presence of CaCl_2 . **Conclusion:** There are changes in the electrophoretic mobility of the fungal cells due to the incorporation of additives in the BGE; however, there is a major effect when CaCl_2 was used.

Keywords: Capillary Electrophoresis, *Trichoderma* spp, *Agaricus bisporus*, surfactants, divalent ions.

Abreviaturas

BGE	Buffer de corrimiento
β-CDs	Beta ciclodextrinas
CDs	Ciclodextrinas
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
CMEB	Cepario Michoacano Universitario perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana
CMC	Concentración micelar crítica
CMF	Citometría de flujo
CTAB	Hexadeciltrimetil amonio
DAD	Detector de arreglo de diodos
d.i.	Diámetro interno
EC	Electroforesis capilar
ECZ	Electroforesis capilar de zona
FEO	Flujo electroosmótico
FSC	Forward scatter
IP	Yoduro de propidio
L_d	Longitud al detector
L_t	Longitud total
MECC	Cromatografía micelar electrocinética
μep	Movilidad electroforética
μL	Microlitro
mL	Mililitro
MMV	Medio mínimo Vogel
nm	Nanómetro
pKa	Constante de disociación
R²	Coefficiente de correlación
SSC	Side scatter
TB	Tris- Borato
TX100	Triton x100
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

Trichoderma spp. es un hongo microscópico de amplia distribución y muy estudiado ya que tiene una gran capacidad de producir metabolitos antifúngicos; es utilizado para la producción de enzimas, pigmentos industriales derivados de quinonas, para la producción de más de 100 metabolitos con actividad antibiótica como policétidos, polipéptidos, pironas, terpenos y metabolitos derivados de aminoácidos. Entre dichos metabolitos, *Trichoderma* produce el ácido-3-indolacético (AIA), una hormona inductora del crecimiento en plantas [Ortuño *et al.*, 2013; Klein *et al.*, 2002].

En la industria alimentaria *Trichoderma* también causa impacto, ya que es capaz de producir micotoxinas conocidas como tricotecenos, que han sido reportados como contaminantes de alimentos y representan un gran riesgo para los humanos, debido a su efecto carcinógeno. Los tricotecenos también son reportados como causantes del "síndrome de fatiga crónica" provocado por esporas de *Stachybotrys atra* y *Trichoderma viride* [Martí-Sole *et al.*, 1999; Cossette *et al.*, 1992].

El hongo *Trichoderma viride* es capaz de producir la toxina Tricodermina, un metabolito antifúngico, que inhibe la síntesis proteica al unirse a los ribosomas de otros hongos.

El género *Trichoderma* incluye una gran cantidad de especies que han sido referenciadas como agentes de biocontrol [Santamarina *et al.*, 2002; Rosello, 2003]. Las cepas de *Trichoderma* más reconocidas como agentes de biocontrol pertenecen a las especies *T. virens*, *T. viride* y *T. harzianum*. Entre los mecanismos directos e indirectos de antagonismo que utiliza este género está el micoparasitismo, la competencia por nutrientes y espacio, y el antibiosis [Harman *et al.*, 1989; Samaniego y Gámez, 2000; Harman *et al.*, 2004; Mejía, 2008].

Otra función importante que presenta este género es la utilización en la promoción del crecimiento y estimulación de mecanismos de defensa de algunas plantas, dicho mecanismo lo lleva a cabo *Trichoderma*, colonizando las raíces de las plantas lo que provoca un incremento en su crecimiento con la ayuda de algunos factores segregados como citoquinas, auxinas y etileno; mejora la productividad de los cultivos y la absorción de nutrientes [Osiewacz, 2002].

En la actualidad la cantidad de hongos filamentosos potencialmente patógenos para los humanos ha sufrido un aumento excesivo, ello ha ocurrido en diferentes géneros fúngicos, convirtiéndose en una causa importante de infecciones nosocomiales con una alta tasa de mortalidad, principalmente en pacientes inmunocomprometidos [James *et al.*, 2006; Horka *et al.*, 2009]. El trasplante de órganos, distintas enfermedades, incluso SIDA, han ocasionado el aumento de pacientes inmunodeprimidos provocando que estén expuestos a algún tipo de micosis; y el uso indiscriminado que se les da a los antibióticos y antimicóticos le confiere a una gran cantidad de cepas una mayor resistencia a este tipo de compuestos, por lo que se vuelve necesario que la identificación de los microorganismos sea más rápida, más sensible y más selectiva [Hoyos-Carbajal, 2011].

Existen diferentes técnicas para realizar el análisis y la identificación de hongos microscópicos, siendo la más utilizada el cultivo y la observación microscópica de sus características morfológicas. Aunque es el método más común, tiene la gran desventaja de estar sujeta a las condiciones a las que está expuesto el hongo [Hoyos-Carbajal, 2011].

En conjunto con el método de cultivo se utilizan las pruebas bioquímicas basadas en la fermentación y asimilación de fuentes de carbono [García Aguilar, 2009]. Otras técnicas que requieren tiempos considerablemente más cortos para su análisis son la hibridación, amplificación y el inmunoensayo,

siendo muy complejas de llevar a cabo, además de tener un costo elevado [Bao y *et al.*, 2008].

Existen bases de datos muy completas con información de *Trichoderma*, que incluyen secuencias de nucleótidos, lista de enzimas y dendogramas; dicha información se ha obtenido mediante diferentes técnicas de estudio, destacando la secuenciación de genes ribosomales, análisis de perfiles de restricción de ADNr, PCR y FISH [Taxonomy IsoTaG, 2013; García Aguilar, 2009].

Para lograr la caracterización de un organismo es necesario tener información de todo tipo y en los últimos años se ha empleado la electroforesis capilar (EC) para obtener una gran cantidad de información sobre los microorganismos, siendo una técnica prometedora ya que es bien conocido que sus análisis se realizan en un corto tiempo, de manera económica y con una buena sensibilidad [Bao *et al.*, 2008].

Utilizando la EC se pueden conocer las cargas eléctricas de superficie, en este caso de hongos microscópicos, que son proporcionadas por sus componentes de la pared celular, conformada principalmente de diferentes polisacáridos (80-90%), quitina que le proporciona rigidez y estabilidad estructural, β - α -glucanos, además de péptidos, proteínas, lípidos, polifosfatos y iones inorgánicos [Armstrong y *et al.*, 2003]. La EC surge como una técnica de separación que aprovecha las propiedades de la pared celular y se basa en la velocidad de migración de los analitos al ser sometidos a un campo eléctrico [Horka *et al.*, 2009; Horka *et al.*, 2012; Girod, 2002].

En el análisis de conidias hidrófobas se pueden esperar algunas dificultades, tales como la agregación entre las conidias, su adsorción en la pared del capilar y la sensibilidad de la detección. En el laboratorio de Desarrollo Analítico de la División de Estudios de Posgrado, en la Facultad de Ciencias Químicas y Biológicas, UMSNH, el estudio de las características de las conidias

ha permitido conocer su comportamiento en presencia de diferentes buffers y aditivos, logrando la obtención de buenas señales electroforéticas en el análisis de hongos filamentosos, pero no obteniendo aún las señales electroforéticas propias de cada especie [Horka *et al.*, 2009].

En este proyecto se quiere mejorar las señales electroforéticas obtenidas en los últimos análisis de *Trichoderma spp.*, realizados en el laboratorio de Desarrollo Analítico, utilizando diferentes tipos de aditivos como modificadores de FEO, modificadores quirales y surfactantes en el buffer de corrida. La cepa *Trichoderma spp.* es utilizada en este análisis ya que presenta un rápido crecimiento, abundante conidiación y su pared celular es muy parecida a la que presentan la mayoría de los ascomicetos filamentosos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Hongos

Los hongos son organismos eucarióticos, aerobios y heterótrofos, pueden ir desde organismos unicelulares hasta pluricelulares macroscópicos. Su alimentación es por medio de una digestión externa y posterior ingesta de nutrientes. Podemos encontrarlos ampliamente en el medio ambiente cumpliendo diferentes papeles, principalmente contaminando el aire, suelo y alimentos, controlando plagas en cultivos y como hongos comestibles [López *et al.*, 2006; Fischer y Kües, 2006; Egbuta *et al.*, 2017].

Están caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio. Dichas estructuras representan la forma invasiva de los hongos patógenos y son las que se observan en las preparaciones histológicas del tejido infectado [Hibbett, 2007].

2.1.1 Pared celular fúngica.

La pared celular fúngica es una estructura compleja y dinámica muy importante, ya que representa una barrera de permeabilidad y un escudo protector, es rígida y está conformada principalmente por glucanos, glicoproteínas y quitinas (Fig. 1), este último polisacárido se encuentra presente en todas las especies fúngicas, estableciendo la fuerza y la forma física de la pared; en su membrana celular contienen ergosterol [Fischer y Kües, 2006; Walker *et al.*, 2018].

Las paredes celulares de los hongos y esporas son estructuras estratificadas, se componen principalmente de polisacáridos (80-90%), péptidos, proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos.

a) Glucano: Es el polisacárido estructural más abundante de la pared celular fúngica, representa del 50-60% del peso seco. El contenido de β -glucanos

varía de acuerdo a la especie, las condiciones de crecimiento de los hongos y la madurez del cuerpo fructífero. Está compuesto de unidades de glucosa sintetizado por las glucanosintetasas que catalizan la formación de cadenas lineales de 1500 residuos de glucosa con uniones β -1,3, proporcionándole el nombre β -1,3-glucano; cada 40-50 residuos se unen nuevas glucosas para dar lugar a la estructura ramificada. Estas estructuras pueden unirse a otros glucanos y a quitinas, proporcionándole resistencia mecánica a la célula [Porton, 2008; Castrillon, 2013; Rivera; 2016].

b) Glicoproteínas: Representan del 20-30% del peso seco. Están asociadas a carbohidratos por enlaces O-glucosídicos o N-glucosídicos formando glicoproteínas, conteniendo secuencias de péptidos señal en su extremo N, y encontrándose reticuladas en la matriz de glucano-quitina. Dichas estructuras pueden tener anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) uniéndolas a la membrana plasmática. Participan en el mantenimiento de la forma celular y en procesos de adhesión; protegen a la célula de sustancias extrañas, participan en la absorción de moléculas y transmiten señales al citoplasma, además de participar en la síntesis y remodelado de los componentes celulares [Ponton, 2008; Urrutia, 2010].

c) Quitina: Mantiene la rigidez y estabilidad estructural de las células. Se sintetiza a partir de N-acetil-D-glucosamina por la enzima quitinsintetasa. Representa del 10-20% del peso seco. La mayoría se localiza cerca de la membrana plasmática y su contenido cambia según la fase morfológica del hongo [Ponton, 2008; Contreras, 2015].

d) Melanina: Es un pigmento fenólico negro que tiene como función proteger a la célula debido a la presencia de electrones desapareados en su molécula, puede cambiar la permeabilidad iónica de sus membranas resultando en hinchazón celular y ruptura [Ponton, 2008; Díaz *et al.*, 2013].

Una característica importante de la pared celular es que es una estructura en continuo cambio en respuesta al ambiente y durante el ciclo celular. La capa externa de la pared varía en relación con el morfotipo, la etapa de crecimiento y la especie fúngica; las modificaciones más importantes observadas son en la capa externa [Bowman, 2006; Latge, 2010].

Las superficies celulares de las conidias de hongos filamentosos también están constituidas por hidrofobinas que son proteínas pequeñas ricas en cisteína unidas por puentes disulfuro intramoleculares y sólo son expresadas por hongos filamentosos [Castrillon *et al.*, 2013]. Dichas proteínas son necesarias para el crecimiento aéreo y la dispersión de las esporas; además, proporcionan el recubrimiento hidrófobo en la superficie. Debido al carácter hidrófobo de las conidias, éstas pueden presentar agregación entre ellas y otras moléculas, así como adherencia a la pared del capilar; esto debido a que a valores de pH alcalino, los grupos funcionales presentes en la pared celular pueden ionizarse [Pedrós, 2003; Santa Cecilia, 2014].

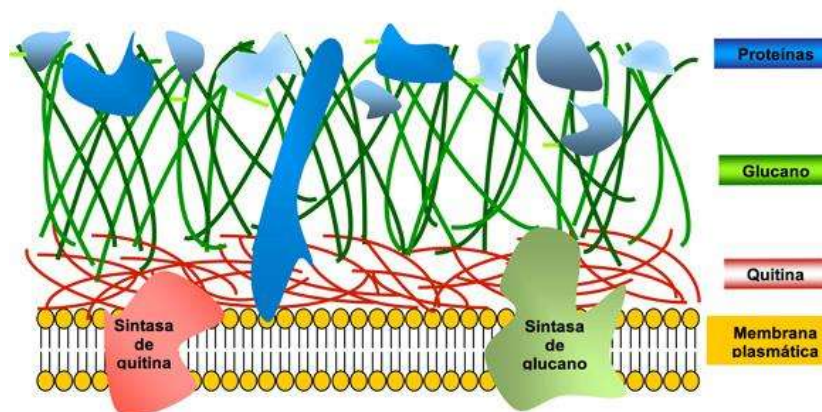


Figura 1. Componentes de pared celular fúngica.

2.1.2 Importancia del estudio de los hongos

Los hongos son organismos que desarrollan un papel fundamental en términos ecológicos, ya que son los principales descomponedores y transformadores de la materia orgánica. De acuerdo con el papel que desempeñan en la naturaleza se clasifican en:

a) Saprobios: La mayoría de los hongos del suelo son saprobios, esto significa que obtiene sus nutrimentos a partir de materia orgánica muerta, en descomposición o en vías de descomposición [Manson, 2008].

b) Mutualismo: Se presenta una interacción biológica entre organismos de diferentes especies en donde ambos se benefician, mejorando su nivel de sobrevivencia, crecimiento y aptitud ecológica, lo que es lo mismo, reproducción exitosa [De Bary, 2008; Badii *et al.*, 2013].

c) Micoparasitismo: Es la acción de un hongo parasitando a otro, puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. El hongo antagonista se enrolla y penetra el micelio del patógeno, creciendo las hifas dentro de las del huésped, provocando pérdida de protoplasma y dejando células vacías. Generalmente están implicadas enzimas extracelulares, tales como quitinasas, celulasas, β -1-3-glucanasas y proteasas, que lisan (rompen) las paredes de las hifas o causan esclerocios de los hongos parasitados [Osorio-Hernández, 2009].

Una característica importante de los hongos es que son productores de metabolitos secundarios que son útiles en medicina y biotecnología, como vitaminas, anticancerígenos y antivirales. En la industria alimentaria los hongos se utilizan como productores de enzimas, polisacáridos, colorantes, ácidos orgánicos, aromatizantes y levaduras [Mellado, 2002; Mata, 2010].

Los hongos son productores de sustancias tóxicas conocidas como micotoxinas, que contaminan alimentos y representan un gran riesgo para los

humanos, debido a su actividad neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinogénica y teratogénica. Es difícil prevenir que los mohos crezcan en los alimentos, pero se pueden disminuir los niveles manteniendo condiciones higiénicas durante el procesado y el almacenaje [Castillo y Robinson, 2017].

La cantidad de hongos filamentosos potencialmente patógenos para los humanos ha sufrido un aumento excesivo, convirtiéndose en una causa importante de infecciones nosocomiales con una alta tasa de mortalidad principalmente en pacientes inmunocomprometidos [James *et al.*, 2006; Gallegos, 2016].

Las características epidemiológicas de las micosis están cambiando, y se presentan nuevas especies patógenas resistentes a antifúngicos [Mellado, 2002].

2.2 *Trichoderma spp.*

2.2.1 Generalidades

El género *Trichoderma* fue descrito por primera vez por Persoon en 1794. Debido a que la morfología de las especies pertenecientes a *Trichoderma/Hypocrea* eran difíciles de distinguir, se propuso reducir la taxonomía a una sola especie, *Trichoderma viride*. Alrededor de un siglo después, comenzó a desarrollarse un concepto para su identificación [Samuels, 2006]. Gracias a esto, numerosas especies nuevas de *Trichoderma/Hypocrea* fueron descubiertas, tanto que para el año 2006 el género ya comprendía más de 100 especies filogenéticamente identificadas. Existieron identificaciones erróneas de ciertas especies, como es el caso de *Trichoderma harzianum* que se ha utilizado para nombrar a muchas especies [Kullnig *et al.*, 2001].

Fueron numerosos y continuos los esfuerzos para poder elucidar la diversidad y concurrencia geográfica de *Trichoderma/Hypocrea*, esto llevado a cabo por medio de documentaciones detalladas del género en todo el mundo [Samuels *et al.*, 2002; Jaklitsch, 2009].

Para el año 2010, la base de datos "Index Fungorum" enumera 471 especies para *Hypocrea* y 165 especies de *Trichoderma* [Schuster, 2010].

2.2.2 Características

Trichoderma es un hongo filamentoso que forma parte de la micobiota del suelo de diferentes ecosistemas en una amplia gama de zonas climáticas, se caracterizan por ser hongos saprofitos donde actúan como descomponedores de materiales lignocelulósicos de madera, ramas y hojas caídas. [Klein *et al.*, 1998; Infante *et al.*, 2009; Canessa y Morell, 1996; Cázares *et al.*, 2016].

Trichoderma pertenece al Reino: Fungi, División: Mycota, Subdivisión: Eumycota, Clase: Hyphomycetes, Orden: Moniliales, Familia: Moniliaceae, Género: *Trichoderma* [Villegas, 2005].

Especies como *T. harzianum* y *T. atroviride* producen altas cantidades de compuestos antifúngicos y antibióticos, así como quitinasas y glucanasas utilizadas como herramientas para el control biológico de fitopatógenos [Cázares *et al.*, 2016].

La especie *Trichoderma viride* es capaz de producir una toxina llamada Tricodermina, un metabolito antifúngico, que se encarga de inhibir la síntesis proteica al unirse a los ribosomas de otros hongos. Dichas características propias del género *Trichoderma* lo presentan como uno de los mejores agentes utilizados para biocontrol, esto debido a que no es considerado un hongo fitopatógeno; por el contrario, presenta un gran potencial antagónico

contra hongos fitopatógenos que dañan numerosos cultivos [Cázares et al., 2016].

Dicha capacidad de biocontrol se atribuye a su elevada capacidad reproductiva, su habilidad de sobrevivir en condiciones desfavorables, su gran capacidad de producir enzimas utilizadas en la degradación de sustratos y su alta eficiencia en la utilización de nutrientes [Infante et al., 2009].

El género *Trichoderma* emplea distintos mecanismos directos e indirectos de antagonismo para combatir a otros hongos, entre ellos se encuentran:

a) Micoparasitismo: Con el cual atacan directamente a otro hongo parasitándolo, este mecanismo se basa en parte en la expresión secuencial de enzimas como quitinasas, glucanasas y proteasas, encargadas de degradar la pared celular de otros hongos [Harman et al., 2004].

Durante el proceso de micoparasitismo, las especies pertenecientes al género *Trichoderma* crecen quimiotrópicamente; es decir, dirigiéndose al hospedante provocado por un estímulo químico, se enredan frecuentemente en las hifas adhiriéndose a ellas, las paredes celulares de los fitopatógenos comienzan a degradarse y esto se observa al presentarse estados tardíos del proceso parasítico, provocando debilitamiento del patógeno [Infante et al., 2009].

b) Competencia por nutrientes y espacio: Para que la competencia entre dos organismos se presente debe existir escasez de algún requerimiento, debido a que la utilización de algún nutriente por un organismo reduce la cantidad necesaria para los demás.

Existen estudios que muestran que *Trichoderma* es un gran competidor por nutrientes en suelos agrícolas, principalmente carbono, nitrato y hierro; esta capacidad que tiene *Trichoderma* por competir es beneficiada por su rápido

crecimiento y por la gran producción de metabolitos capaces de frenar a los patógenos competidores [Martínez, 2013].

c) Antibiosis: Es la asociación antagónica de diferentes organismos, en el que uno de ellos no es capaz de soportar las sustancias tóxicas segregadas por el otro. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* son productores de metabolitos tóxicos volátiles y no-volátiles que inhiben el crecimiento de otros organismos. Entre dichas sustancias volátiles se encuentran las alquilpironas, las ciclosporinas producidas por *T. polysporum*, los antibióticos como isonitrilo y tricodermina producidos por *T. hamatum*, y las trichorzianinas como principal agente soluble antifúngico. En el 2008, Mejía reportó la utilización de compuestos volátiles producidos por *Trichoderma harzianum* para controlar la producción de aflatoxina B1 proveniente de *A. flavus* en granos de maíz almacenados, logrando una disminución en el crecimiento de dicho organismo y, por lo tanto, poca producción de aflatoxinas [Mejía, 2008].

2.2.3 Ciclo de vida de *Trichoderma spp*

El ciclo de vida de esta especie (Fig. 2) comienza con la germinación de la espora o conidia, que involucra la iniciación de actividades bioquímicas llevadas a cabo con un incremento gradual en la velocidad de metabolismo hasta llegar a su nivel normal. Los requerimientos para iniciar la germinación son agua y humedad relativa suficientes, oxígeno, bióxido de carbono, nutrientes de bajo peso molecular, como el azúcar que actúa como fuente de carbono y aminoácidos como fuente de nitrógeno. Terminada la etapa de germinación se forma la primera hifa conocida como "tubo germinativo" que al expandirse forma hifas ramificadas que pueden medir entre 3 y 12 μm de diámetro, conformando una colonia micelial. Su crecimiento es radial; cuando existen los nutrientes suficientes el micelio vegetativo crece de forma continua, pero cuando los nutrientes van disminuyendo el micelio deja de crecer y comienza la conidiación. La conidiación se lleva a cabo en el micelio aéreo

en forma de conidias unicelulares y en el micelio vegetativo en forma de clamidioconidias [Carlile *et al.*, 2001; Osorio-Hernández, 2009].



Figura 2. Ciclo de vida de *Trichoderma*.

La colonia micelial de *Trichoderma* se caracteriza por un aspecto algodonoso color blanco; conforme va presentándose la conidiación va apareciendo un parche verdoso sobre la colonia blanca como se muestra en la figura 3a [Infante, 2009]. Los conidióforos son hialinos ramificados, con fiálides simples o agrupados (Fig. 3b) el tamaño de sus conidias (Fig. 3c) va de 3 a 6 μm de diámetro, con forma circular, unicelulares y de color verde brillante [Harman, 2001; Martínez, 2013; Osorio-Hernández, 2009].

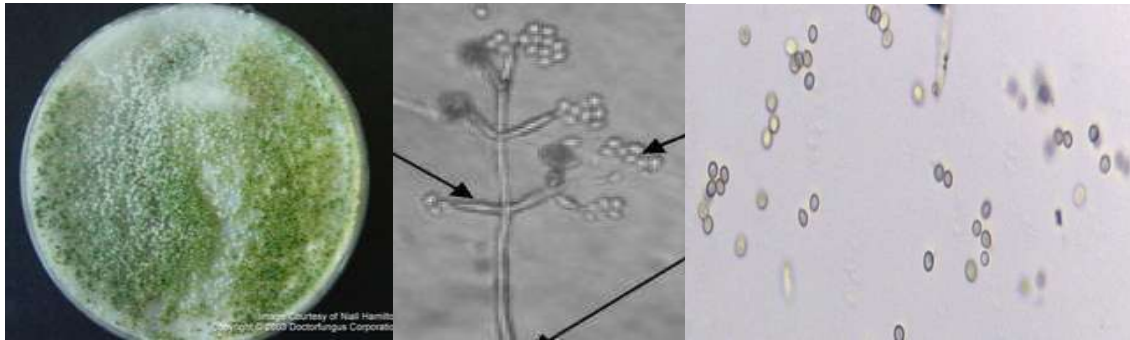


Figura 3. Características macro y microscópicas del género fúngico *Trichoderma*. a) Colonia micelial de *Trichoderma* con presencia de conidias. b) Fiálides hialinas. c) Conidias de *Trichoderma* observadas al microscopio. Imagen tomada de Niall Hamilton 2015.

El género *Trichoderma* alberga hongos aerobios capaces de resistir un amplio intervalo de temperatura. La relación entre la temperatura y el desarrollo de *Trichoderma* depende de las especies. La temperatura óptima de *T. viride* es 31°C, la de *T. harzianum* es de 38°C, aunque de manera general estas especies se desarrollan a temperaturas entre 20 y 30°C, y toleran un amplio intervalo de pH (2.5 – 8.5) [Martínez, 2013; Ramírez, 2013].

2.2.4 Usos y aplicaciones de *Trichoderma*

Trichoderma/Hypocrea tiene una gran importancia desde el punto de vista económico ya que tienen la capacidad de producir enzimas de interés industrial como las celulasas y sustancias con actividad antimicrobiana [Vizcaíno *et al.*, 2005; Ramírez, 2013]. Las enzimas producidas son utilizadas por la industria alimentaria para la degradación de polisacáridos complejos, en la producción y transformación de alimentos. Como es el caso de β -glucanasas utilizadas para mejorar los procesos de infusión, otras enzimas como pectinasas, celulasas y hemicelulasas se emplean para la maceración de jugo de fruta; las xilanasas son utilizadas como aditivo para piensos en la cría de ganado y para alimento de mascotas, debido a la hidrólisis enzimática de arabiloxilanos presentes en forrajes y cereales, que incrementan la eficiencia alimentaria de las materias primas de la dieta [Blumenthal, 2004].

Algunas de las enzimas producidas por *Trichoderma harzianum* han sido utilizadas como conservadores de alimentos debido a su efecto antifúngico, esto gracias a que degradan la pared celular [Fuglsang *et al.*, 1995]. *T. harzianum mutanasa* se puede utilizar en pasta de dientes para evitar la acumulación de *Streptococcus mutans* en la placa dental [Wiater *et al.*, 2005].

Trichoderma es también utilizado en la industria textil, fabricación de pastas y la industria de papel utiliza sus enzimas para hidrólisis de la celulosa [Galante, 1998].

El género *Trichoderma* es utilizado en la producción de antibióticos o metabolitos secundarios tóxicos para otros organismos, los cuales son capaces de detener la acción de toxinas y de otros compuestos generados por los patógenos [Harman *et al.*, 2004].

Trichoderma se emplea como control biológico en el estudio de hongos fitopatógenos ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas, produciendo metabolitos antifúngicos como gliotoxina, gliovirina, viridina, así como metabolitos volátiles o solubles que afectan de manera negativa el desarrollo de los patógenos, entre ellos *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea* que son plagas de cientos de cultivos como los tomates, pepinos, fresas, algodón y uvas [Argumedo-Delira, 2009; Stefanova *et al.*, 1999; Osorio-Hernández, 2009].

Trichoderma harzianum y otras especies del género actúan como simbioses oportunistas, interactúan con la planta colonizando raíces y estableciendo una relación química y sistémica que modifica la expresión de genes y producen hormonas de crecimiento como auxinas y giberelinas, incrementando el crecimiento de plantas de lechuga *Latuca sativa* [Lynch *et al.*, 1991, Ousley *et al.*, 1994].

Algunas especies de *Trichoderma*, como *T. estonicum*, son empleados para la producción de bioetanol hidrolizando los residuos lignocelulósicos, para obtener de manera accesible los azúcares contenidos en sus fibras y obtener alcohol de segunda generación por sacarificación [Saravanakumar *et al.*, 2014].

En este proyecto se trabajó con cuatro especies pertenecientes a *Trichoderma* (Fig. 4): ***T. harzianum* (CMU1)** grupo taxonómico mayormente distribuido a nivel mundial, productor de hormonas de crecimiento y de altos niveles de compuestos antifúngicos y antibióticos, como quitinasas y glucanasas, utilizados para control biológico; ***T. atroviride* (CMU8)** cepa productora de quitinasas y glucanasas utilizadas para control biológico, presenta actividad de lacasa para degradación de compuestos lignocelulósicos; ***T. viride* (CMU218)** presenta actividad de lacasa y es ampliamente utilizado para biocontrol, al igual que ***T. tomentosum* (CMU221)** [Cázares *et al.*, 2016].

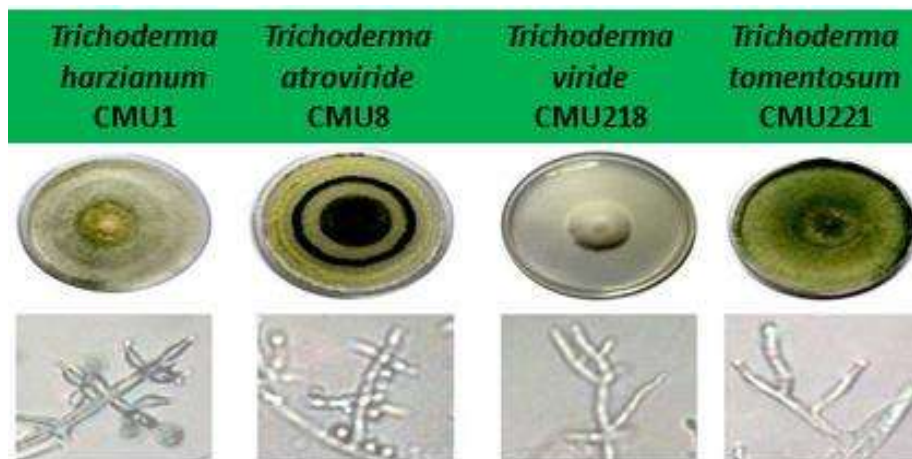


Figura 4. Cepas de *Trichoderma* utilizadas en este estudio.

A pesar de todas las aplicaciones el género *Trichoderma*, también ha sido reportado como agente patógeno oportunista en humanos inmunosuprimidos (Tabla 1), mostrando un crecimiento eficiente a temperatura corporal, siendo

la especie más común en estos casos *Trichoderma longibrachiatum* [Trabelsi et al., 2010].

Tabla 1. Enfermedades causadas por el género *Trichoderma*.

Especie	
<i>T. citrinoviride</i> <i>T. harzianum</i> <i>T. longibrachiatum</i> <i>H. orientalis</i>	Problemas respiratorios.
<i>T. longibrachiatum</i>	Absceso cerebral en paciente leucémico con neutropenia prolongada.
<i>T. pseudokoningii</i>	Infecciones invasivas en paciente sometido a trasplante de hígado.
<i>T. konigii</i>	Infección invasiva en paciente con fibrosis quística con trasplante pulmonar
<i>T. spp.</i>	Peritonitis en paciente con diálisis peritoneal.
<i>T. arviride</i>	Infección en paciente receptor de trasplante de hígado.

(Chouaki et al., 2002; Seguin et al., 1995; Ranque et al., 2008; Trabelsi et al., 2010)

2.3 *Agaricus bisporus*.

Agaricus bisporus es un basidiomiceto homotálico secundario de la familia Agaricales, nativo de Europa y América del norte. Produce carpóforos, esporocarpos, basidiocarpos o setas carnosas comestibles, por lo que son extensamente cultivados para su uso en la gastronomía [García-Mendoza, 2000; Kuo, 2006].

Agaricus bisporus tiene un sombrero redondeado que puede alcanzar hasta los 18 cm de diámetro que se encuentra unido por medio de un anillo al pie que crece hasta 8 cm de largo y 3 cm de diámetro (Fig. 5). Cuentan con laminillas típicas de las agaricáceas, que cambian gradualmente de color rosado a pardo oscuro, donde contienen a las esporas que poseen una forma elíptica y miden de 5.5-8.5µm por 4-6,5µm. [Kuo, 2006].

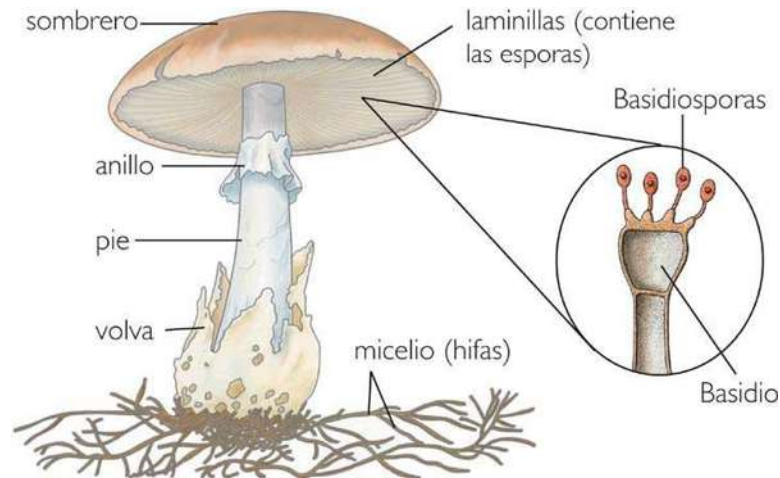


Figura 5. Partes que conforman a los basidiomicetos *Agaricus bisporus*.

2.3.1 Ciclo de vida de *Agaricus bisporus*

El ciclo biológico de *Agaricus bisporus* cuenta con dos rutas diferentes, la fase de crecimiento vegetativo y la fase reproductiva donde se producen las estructuras sexuales, carpóforos o setas.

El ciclo de vida comienza con la basidiospora mononucleada (producida en un basidio dentro del basidiocarpo), produciendo el micelio primario monocariótico haploide. El micelio primario crece durante un tiempo indefinido hasta que se encuentra con otro micelio primario y que sea compatible con él, haciéndose uno por anastomosis y formando el micelio secundario, que continuará su crecimiento de forma vegetativa sin que haya fusión de núcleos. Por lo que se habla de micelio dicariótico y presenta un crecimiento más rápido que el primario. Cuando el micelio secundario alcanza la madurez, comienza con la formación de primordios, micelio terciario agregado y reproductivo que da lugar a su desarrollo final, al basidiocarpo. Dentro de los basidios, las células especializadas de los cuerpos fructíferos, se produce la fusión de núcleos o cariogama seguida de meiosis, dando origen a dos, cuatro y en casos especiales hasta ocho basidiosporas hijas haploides (Fig. 6) [García-Mendoza, 2000].

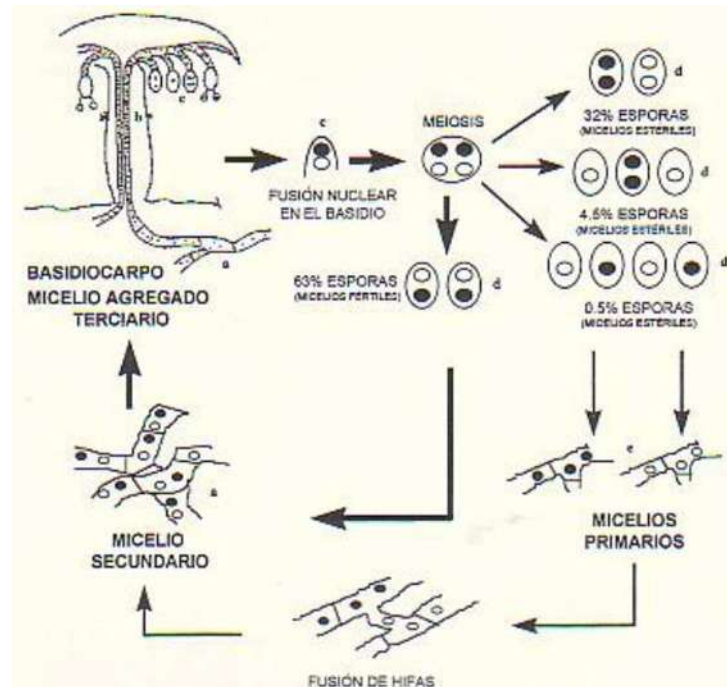


Figura 6. Ciclo biológico de *Agaricus bisporus*.

2.3.2 Importancia agronómica

Actualmente el cultivo de hongos comestibles se ha vuelto una gran alternativa que logra satisfacer las medidas nutricionales de la población gracias a sus bajos costos de producción, alto contenido proteico, grandes volúmenes de cosecha en poco espacio y tiempo [Camacho, 2012; Salmones et al., 2012].

De los hongos comestibles, *Agaricus bisporus* es el más cultivado a nivel mundial, con una producción estimada cerca de los 4 millones de toneladas, de los cuales México aporta 40000 toneladas de este volumen, con un valor comercial de 200 millones de dólares, ubicándolo como el mayor productor en América Latina y décimo sexto a nivel mundial [Martínez-Carrera et al., 2007; Salmones et al., 2002].

Además de su gran importancia a nivel agronómico, representa una industria generadora de empleos. En China, principal productor de hongos cultivados

en el mundo, existen 25 millones de personas involucradas en esta actividad. En México alrededor de 25000 empleos directos se han generado como resultado de la producción e industrialización de estos organismos [Li, 2002; Martínez-Carrera et al., 2007; Salmones et al., 2002].

2.4 Relación entre *Trichoderma spp.* y *Agaricus bisporus*

Algunas especies de *Trichoderma spp.* representan formas altamente agresivas y han sido encontrados como contaminantes en los cultivos de hongos comestibles como *Agaricus bisporus*, reportando pérdidas del 30-100% en Norte América. En México también se han identificado “mohos contaminantes”, entre los que se encuentra frecuentemente *Trichoderma harzianum* con sus biotipos (Th1, Th2, Th3 y Th4) en la producción de hongos comestibles, provocando pérdidas económicas para los productores de la región [Romero-Arenas, 2009].

2.5 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica, desarrollada por el químico sueco Arne Tiselius en la década de los años treinta, quien la aplicó en el estudio de proteínas secas. Esta técnica tiene como función provocar el movimiento o desplazamiento de moléculas cargadas (iones), sustancias neutras o migración pasiva, utilizando un campo eléctrico aplicado que provoca su movimiento a través de un capilar debido a la diferente velocidad de migración de las distintas especies cargadas [Castagnino, 2000; Osatinsky, 2007]. La electroforesis capilar ha tenido gran impacto en la medicina, permitiendo la separación de aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, carbohidratos, contaminantes alimenticios, material genético y algunos fármacos [Magaña, 2009].

2.5.1 Capilares

Se utilizan capilares de sílice fundida con una longitud de 50-75cm de longitud o menor, con un diámetro interno de 50-100 μ m que les proporcionan la capacidad de alta resolución; dichos capilares se encuentran cubiertos de poliamida, material que les confiere mayor rigidez y resistencia [Schwartz, 1994; Castagnino, 2000].

2.5.2 Detección

En la electroforesis capilar la detección se realiza directamente sobre el capilar, éste cuenta con una ventana alineada con el detector que permite el paso de la luz. El detector utilizado dependerá de los analitos a determinar, siendo el más utilizado el UV-visible; a pesar de la estabilidad y facilidad de operación, presenta inconvenientes ya que opera a una única longitud de onda. Caso contrario del detector de arreglo de diodos (DAD) que permite obtener espectros a diferentes longitudes de onda, por lo que se obtiene una visualización en línea, permitiendo la identificación de los compuestos separados [Schwartz, 1994; Castagnino, 2000; Osatinsky, 2007]. En el sistema de electroforesis capilar como se muestra en la figura 7, es necesaria una fuente de poder que proporcione un campo eléctrico controlado, dos recipientes que contengan la solución buffer, dos electrodos y un detector apropiado que puede ser de luz UV o de arreglo de diodos (DAD).

En el interior del capilar es inyectada la muestra con el buffer de corrimiento que actúa como conductor de la corriente eléctrica y controlando la carga eléctrica de las sustancias a analizar de manera simultánea, después son colocados ambos extremos del capilar en los recipientes que contengan la solución amortiguadora. Con la ayuda de dos electrodos se le aplica un voltaje que favorece la separación de analitos, debido a la velocidad de migración que obtienen, esto en función de su relación masa/carga [Skoog *et al.*, 2001; Gallegos, 2016].

Sistema de Electroforesis Capilar.

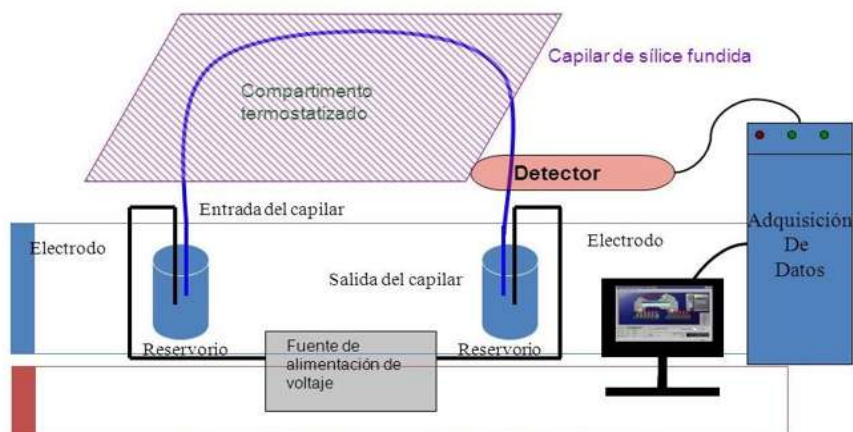


Figura 7. Componentes de un sistema de electroforesis capilar. [Schwartz, 1994, Beckman instruments].

2.6 Electroforesis capilar de zona (ECZ)

También conocida como electroforesis en solución libre. La separación de analitos utilizando esta técnica se basa en las diferencias que existen entre la relación masa/carga. Al inyectar la muestra al capilar se aplica el voltaje provocando que los componentes de la muestra se separen en zonas discretas; para lograr este efecto es fundamental que la solución buffer empleada sea homogénea y el campo eléctrico aplicado se mantenga constante a lo largo de la longitud del capilar [Beckman, 2000].

La movilidad electroforética, que explica la migración de los analitos (μ_{ep}) en esta metodología se puede conocer de la teoría Debye-Huckel-Henry que dice:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R}$$

Donde:

q = carga neta

R = radio de Stokes

n = viscosidad

La carga neta va a depender del pH de la solución buffer que se esté utilizando. Con la ECZ se pueden separar moléculas grandes o pequeñas con gran facilidad, sin importar que la diferencia entre su relación masa/carga sea muy pequeña.

2.6.1 Factores que causan la movilidad de los analitos en la electroforesis capilar

a) Movilidad electroforética (μ_{ep})

La velocidad con la que se mueven las moléculas hacia el cátodo o el ánodo es denominada velocidad de migración (Fig. 8). Al ser aplicado el campo eléctrico, la molécula comenzará a moverse hacia el electrodo de signo contrario a una velocidad que dependerá de muchos factores como:

Viscosidad del medio: la velocidad de migración de las moléculas es inversamente proporcional a la viscosidad.

Campo eléctrico: cuanto mayor sea el campo eléctrico mayor es la velocidad.

Carga eléctrica neta de la molécula: cuanto mayor sea la carga neta de la molécula, mayor es la velocidad.

Tamaño de la molécula: la velocidad es inversamente proporcional al tamaño de la molécula [Cruces, 1998].

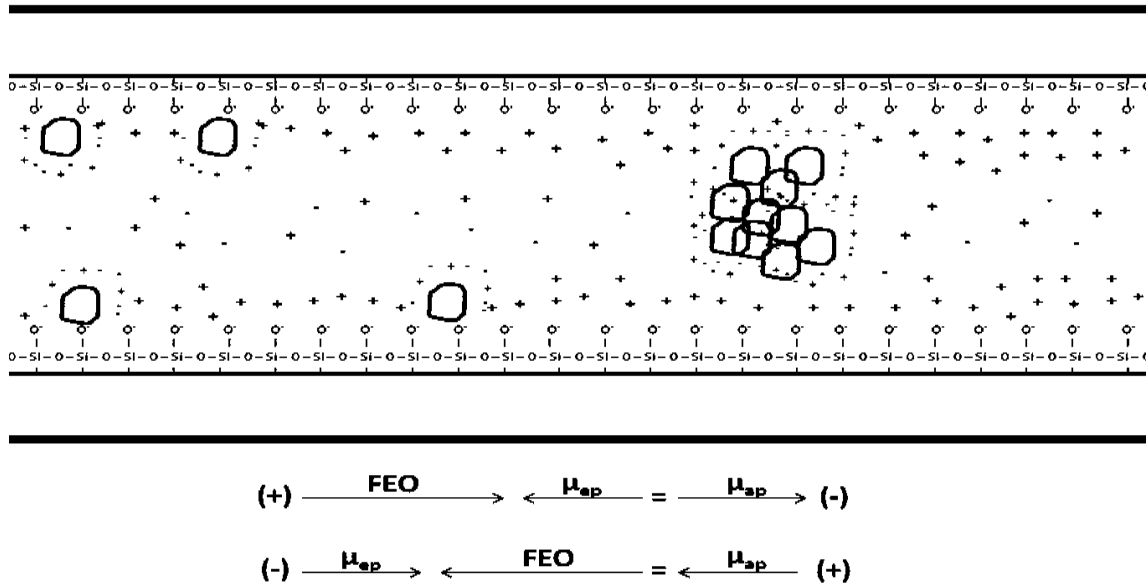


Figura 8. Movilidad electroforética: migración del analito por su relación masa/carga.

b) Flujo electroosmótico (FEO) y formación de doble capa eléctrica

Al aplicar un campo eléctrico entre la solución y la pared del capilar, se produce el movimiento de todos los solutos presentes en la muestra hacia el electrodo negativo, dicho movimiento es conocido como flujo electroosmótico (FEO). Este proceso se lleva a cabo en el interior del capilar debido a que su pared interna, que está presente como fase sólida, cuenta con grupos silanol (Si-OH) que al ser sometidos a condiciones acuosas a un pH alcalino se ionizan y presentan un exceso de cargas negativas; los cationes presentes en la solución van a tratar de neutralizar parcialmente la carga negativa, formando una doble capa inmóvil de cationes. Los cationes restantes en la solución circundante al tratar de neutralizar por completo esta carga negativa van a provocar el arrastre de todos los compuestos de la muestra hacia el electrodo negativo (Fig. 9). Con la presencia del FEO es posible analizar aniones, cationes y especies neutras en un solo análisis. Si el FEO no está presente, la migración se realizaría de solo aniones, o solo cationes sin pasar todos los analitos por el detector. Con el FEO todas las especies pasan

por el detector con el orden de migración de cationes, aniones y especies neutras [Hayes *et al.*, 1993; Cázares, 2009; Chopin-Doroteo, 2012].

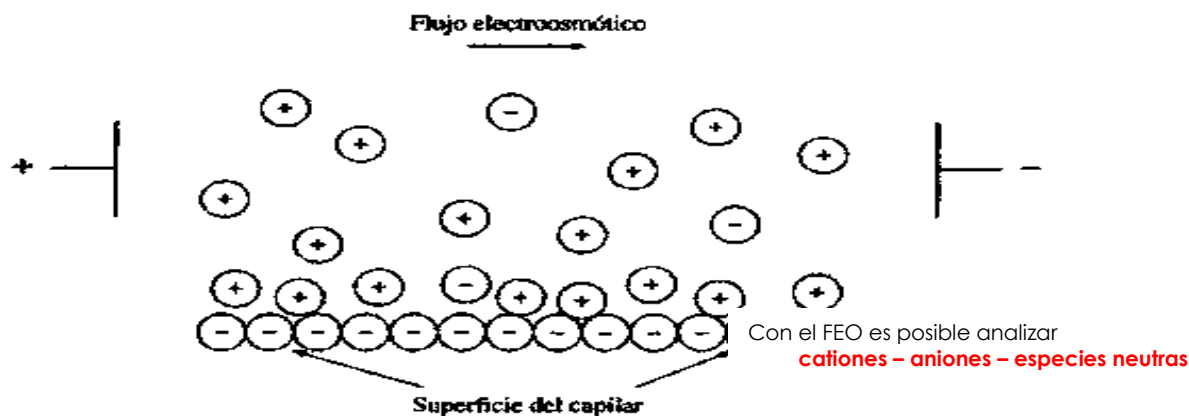


Figura 9. Representación de flujo electroosmótico y doble capa eléctrica [Cázares, 2009, tesis; Hayes *et al.*, 1993].

2.6.2 Partículas coloidales: origen de la carga de los microorganismos

Los coloides son partículas de diámetro comprendido entre 1 nm y 1 μm . Dichas partículas tienen un tamaño tan pequeño que provoca que estén suspendidos en solución y no sedimentan, únicamente en virtud de la influencia de la gravedad [Dessai, 2002].

La proporción superficie/volumen proporciona buenas características de adsorción de los coloides para los iones libres, este fenómeno de la adsorción del ion implica la presencia de la carga electrónica en su superficie que da lugar a algunas fuerzas de repulsión. En comparación con el tamaño es aceptable caracterizar a la mayoría de los microorganismos como partículas coloidales [Dessai, 2002].

Por lo tanto, los microorganismos pueden adquirir la carga de su superficie de dos maneras diferentes. La primera es debido a la ionización de los grupos superficiales como resultado de la protonación o desprotonación de moléculas de superficie ácidas o básicas, siendo los grupos ionizables más

comunes en la superficie externa del microorganismo los ácidos carboxílicos, fosfatos, aminas y residuos de sulfatos. La carga superficial también se puede adquirir mediante la adsorción de iones de la solución circundante. De acuerdo con el tamaño y la naturaleza química de la superficie de la partícula coloidal, va a depender la cantidad y el tipo de ion absorbido [Dessai, 2002].

2.6.3 Buffers utilizados para controlar FEO en ECZ

El buffer de corrimiento (BGE) se presenta como la fase móvil que está encargada de neutralizar el resto de la carga negativa por un exceso de cationes, éstos son los encargados de mantener el balance de cargas y a este proceso se le conoce como potencial Z [Cázares, 2007].

Entre más elevado sea el valor de pH, más alto será el flujo electroosmótico. Por lo tanto, a valores de pH elevados los aniones migrarán hacia el cátodo debido a que el FEO es mayor que la migración electroforética, cuando el pH sea menor, el FEO estará disminuido y permitirá la identificación de aniones y cationes en diferentes corridas. El pH tiene efecto sobre los analitos de la muestra a separar ya que de éste dependen la carga y la selectividad de la separación. Para asegurar una completa ionización se tiene que elegir un buffer que tenga un pH dos unidades arriba o abajo del pKa del analito, cuidando no trabajar con un pH muy alcalino ya que provocara que el FEO sea demasiado rápido y no permitirá la separación de los analitos [Castagnino, 2000; Chopin-Doroteo, 2012].

Para controlar el efecto del FEO y obtener una mejor selectividad en la separación se utilizan diferentes tipos de buffers (Tabla 2).

Tabla 2. Buffers utilizados en EC.

Buffer	Intervalo de pH
Fosfato	1.14 – 3.14
Acetato	3.76 – 5.76
Fosfato	6.20 – 8.20
Borato	8.14 – 10.14
Buffer zwitteriónicos	
MES	5.15 – 7.15
PIPES	5.80 – 7.80
HEPES	6.55 – 8.55
Tricina	7.15 – 9.15
Tris	7.30 – 9.30

Además de las soluciones buffer, existen varios aditivos (Tabla 3) que pueden ser agregados a los mismos, ayudando a cambiar la selectividad de la separación. Los aditivos pueden alterar las movilidades electroforéticas de los analitos permitiendo diferenciarlos, aunque originalmente hayan tenido una movilidad electroforética idéntica; tales aditivos pueden ser surfactantes y ciclodextrinas [Castagnino, 2000].

Tabla 3. Tipos de aditivos y funciones.

Aditivo.	Función del aditivo.
Sales inorgánicas	Cambios en la conformación de proteínas.
Solventes orgánicos	Disolver, modificar el FEO.
Urea	Solubilizar proteínas y desnaturalizar oligonucleótidos.
Ácidos sulfónicos, reactivos formadores de pares de iones	Agentes de interacción hidrofóbica.
Surfactantes catiónicos	Inversión de carga en la pared del capilar.
Derivados de celulosa	Reducción del FEO. Proveen un medio de tamizaje.
Aminas	Cubren grupos silanoles libres.

La modificación del buffer de corrimiento y el empleo de distintos tipos de aditivos dan origen a diferentes tipos de electroforesis capilar.

2.7 Tipos de electroforesis capilar

2.7.1 Cromatografía capilar micelar electrocinética (MECC)

El uso de aditivos como los surfactantes da origen a otro tipo de electroforesis llamada cromatografía capilar micelar electrocinética (MECC, por sus siglas en inglés). Utilizando la ECZ no pueden ser separados los solutos neutros debido a que no presentan movilidad electroforética, se puede lograr la separación formando un sistema micelar en el buffer de corrimiento (BGE) que interactúe con los analitos para que gracias a este procedimiento dichos solutos puedan ser separados [Skoog *et al.*, 2001].

Esta técnica fue presentada por primera vez por Terabe en 1984. Puede ser considerada un híbrido entre la electroforesis y la cromatografía, y permite la separación de sustancias neutras o cargadas. MECC tiene como principio emplear soluciones homogéneas que contengan tensoactivos en el buffer de corrimiento, provocando la formación de micelas caracterizadas por tener una cola larga hidrófoba y una cabeza hidrófila. La presencia de los agregados de las micelas provoca cambios físicos tales como la tensión superficial, la viscosidad y la dispersión de luz [Skoog *et al.*, 2001; Robinson, 2006].

Las micelas formadas por los surfactantes constituyen una pseudofase en donde es particionada la molécula del analito debido a las interacciones hidrofóbicas presentes en el interior de la micela. Con la ayuda del FEO estas micelas son transportadas en dirección del detector. Mientras se lleva a cabo esta migración, se pueden presentar interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con los solutos [Casado-Rio, 2014].

Para que se lleve a cabo la interacción entre el analito y la micela (Fig. 10) el compuesto debe tener un carácter hidrofóbico, ya que entre más hidrofóbico, interactúa con más fuerza y es mayormente retenido en la micela. Entre más interacción exista, mayor será también el tiempo de migración, debido a que las micelas son atraídas en contra del FEO. Si la interacción con las micelas es nula, el soluto es transportado en el sentido del FEO [Castagnino, 2000].

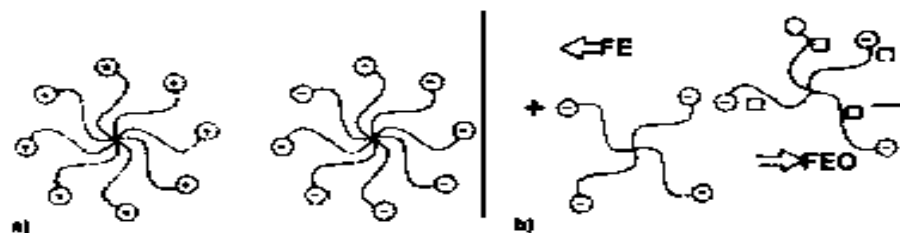


Figura 10. Interacción entre analito y micelas.

a) Aplicaciones de MECC

Las aplicaciones de MECC incluyen el análisis de plaguicidas sin carga, aminoácidos esenciales y de cadena ramificada, hidrocarburos y contenidos de alcohol de la hierba de mejorana, por ejemplo [Johnstone, 2012].

2.7.2 Electroforesis quiral cromatográfica

Otro tipo de electroforesis capilar es la que se utiliza para la separación de enantiómeros ópticos que poseen un carbono asimétrico y que permite obtener compuestos llamados quirales, representan la imagen especular del compuesto [Castagnino, 2000].

Una molécula quiral es aquella que no puede superponerse a su reflexión especular, o lo que es lo mismo, una molécula es quiral cuando carece de simetría de reflexión, esta propiedad es debida, en general, al diferente

arreglo espacial de los grupos alrededor de un centro asimétrico o también llamado centro estereogénico.

La electroforesis es considerada una técnica exitosa en la separación de enantiómeros, dichas separaciones se llevan a cabo en el modo de ECZ o MECC añadiéndole al buffer de corrimiento un modificador quiral que tiene como función discriminar entre los dos enantiómeros, permitiendo separar DL aminoácidos y sustancias quirales [Castagnino, 2000].

La separación quiral depende de múltiples factores, tales como: el pH, la concentración, naturaleza y fuerza iónica del buffer de corrimiento o temperatura del capilar. Lograr la optimización de estos parámetros es lo que dificulta el desarrollo del método.

Los principios de la separación quiral utilizando EC son varios, de los cuales los más importantes son:

- a) Complejación por intercambio de ligandos:** los enantiómeros de un compuesto pueden formar complejos constituidos por un ión metálico como el Cu^{2+} y Ni^{2+} y un aminoácido ópticamente puro [Kuhn *et al.*, 1994].
- b) Complejación "host-guest" o de inclusión:** el analito es llamado molécula "guest" y es espacialmente incluido en el interior de un ligando conocido como molécula "host", sin que su estructura se afecte de forma significativa. De esta forma algunos compuestos quirales son utilizados para formar complejos con compuestos de interés ya que tienen la capacidad de actuar como "host", con la finalidad de conseguir una resolución enantiomérica. Entre estos compuestos se encuentran: éteres corona, antibióticos macrocíclicos y ciclodextrinas que son utilizadas con el fin de aumentar el poder resolutivo [Kuhn *et al.*, 1994; Gasper *et al.*, 1996; Casado-Rio, 2014; Pineda-Rey, 2014].

2.7.3 Ciclodextrinas (CDs)

Las ciclodextrinas (CDs) fueron descubiertas por primera vez en 1981, formadas por la acción de ciertas enzimas sobre la molécula del almidón [Cifuentes, 2009].

Las CDs constituyen una serie de tres oligosacáridos cíclicos formando una familia de α -CD, β -CD y γ -CD, los cuales se encuentran compuestos por 6, 7 u 8 unidades de D-(+)-glucopiranosas unidas en forma α -1,4 [Castagnino, 2000]. Son moléculas muy estables, resistentes a la luz y no absorben luz apreciablemente en el UV-visible. La característica estructural de las ciclodextrinas es su conformación toroidal, en forma de cono de extremos abiertos; el diámetro de la cavidad está determinado por el número de unidades de glucosa como se muestra en la tabla 4 [Kuhn *et al.*, 1994; Pineda-Rey, 2017].

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas naturales.

Parámetro	α -CD	β -CD	γ -CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Masa molecular	972	1135	1297
Diámetro interno de la cavidad (Å)	5,7	7,8	9,5
Diámetro externo de la cavidad (Å)	13,7	15,3	16,9
Solubilidad en agua (25°C) (%w/v)	14,5	1,8	23,2

Estos anillos tienen carácter anfipático, la cavidad está revestida por átomos de hidrógeno y puentes de hidrógeno glucosídicos; es relativamente hidrofóbica ya que los electrones no enlazantes de los puentes de oxígeno glucosídico se encuentran orientados hacia el interior de la cavidad, generando una alta densidad electrónica, mientras que la superficie es hidrofílica [Castagnino, 2002; Álzate, 2012].

Existen diferentes tipos de uniones entre los analitos y las CDs como: interacciones del tipo Van der Waals, unión por puente de hidrógeno, interacción dipolo-dipolo, impulsión hidrofóbica, efectos de tensión solvente superficie, entre otros.

En años recientes, las ciclodextrinas han causado un alto impacto en la industria farmacéutica, gracias a la capacidad que poseen para formar compuestos de inclusión con diferentes fármacos [Pineda-Rey, 2017].

En la industria química se han utilizado las CDs como agentes encapsulantes de todo tipo de ingredientes activos para poder transportarlos, tal es el caso de fármacos, cosméticos, saborizantes, vitaminas, desechos industriales y compuestos tóxicos [Leyva, 2004].

Otro de los usos de las CDs, es su empleo como aditivo alimentario, con el objetivo de proteger los componentes lipofílicos que son sensibles a la degradación inducida por el oxígeno, la luz o el calor; solubilizar colorantes alimenticios y vitaminas; estabilizar fragancias, sabores, vitaminas y aceites esenciales; eliminar olores y sabores indeseables; y mejorar la solubilidad acuosa de componentes orgánicos [Domínguez, 2014].

Existen diferentes estudios que han reportado a las ciclodextrinas como agentes solubilizantes para aceites volátiles hidrofóbicos, ya que logran encapsularlos en su matriz. De esta manera la molécula huésped puede ingresar en un medio hidrofílico sin cambiar su solubilidad, siendo las CDs las que se disuelven en agua. Entre los tres tipos de CDs (α , β y γ) la más utilizada es la β -ciclodextrina, debido al tamaño de su cavidad formada por 7 unidades de glucosa, siendo adecuado para formar complejos con huéspedes con masa molecular de entre 200 y 800g/mol, además de tener una accesibilidad y precio razonable [Álzate, 2012].

a) Ventajas de EC en las separaciones quirales

La concentración y naturaleza del buffer de corrimiento puede ser modificada aumentando la capacidad de resolución de la técnica.

La EC mantiene el selector quiral libre en solución con lo que favorece la interacción con el analito, porque no está en una conformación fija como cuando está inmovilizado. Puede emplearse una combinación de selectores quirales para mejorar la resolución quiral. La EC utiliza cantidades reducidas de reactivos por lo que permite el uso de selectores quirales de elevado costo [Gasper, 1996].

2.7.4 Iones divalentes: CaCl_2

En los últimos años, el nuevo enfoque que tiene la técnica de ECZ implica la modificación de grupos funcionales como carboxilos, aminas y fosfatos presentes en la pared celular con ayuda de los iones metálicos divalentes, provocando la agregación de las células de una manera controlada [Dziubakiewicz *et al.*, 2014].

Existen algunos estudios que reportan el uso de iones metálicos como es el caso de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Li^{2+} y Ca^{2+} , reportándolos como inductores de agregación de las células [Miki *et al.*, 1982; Stratford, 1989].

Entre los grupos funcionales presentes en la pared celular y los iones divalentes se presenta un intercambio iónico, cuanto más alta sea su valencia, mayor será la fuerza de su unión. En condiciones adecuadas de pH (mayor a su pKa), los grupos funcionales de pared celular se encuentran desprotonados lo que favorece la interacción de estos con iones divalentes con carga positiva, causando la agregación de las células [Miki *et al.*, 1982; Stratford, 1989; Rogowska *et al.*, 2018].

2.8 Antecedentes de identificación de microorganismos y células fúngicas utilizando electroforesis capilar

En el año 2000, Armstrong y colaboradores observaron el comportamiento en la migración de *S. cerevisiae* a través del capilar en una suspensión sin sonicar y otra suspensión sonicada. Demostraron la importancia de la sonicación para romper aglomerados celulares, obteniendo señales muy eficientes [Armstrong *et al.*, 2000]. Moon y Kim [2003] estudiaron mediante ECZ dos cepas de *S. cerevisiae* empleadas como probióticos. Obtuvieron una sola señal muy eficiente en los corrimientos con sonicación [Moon y Kim, 2003]. Para el año 2008, Armstrong utilizó CZE para analizar muestras con células de *S. cerevisiae*, encontraron que a 280 nm el caldo nutritivo tiene poca absorbancia y a 214 nm las levaduras tienen buena absorbancia, detectando 200 células como mínimo [Bao *et al.*, 2008]. Horka y colaboradores, [2009] lograron mediante ECZ la separación en mezcla de conidias de diferentes especies fúngicas, obtuvieron excelente eficiencia y resolución en la separación [Horka, 2009]. También en el año 2009 Petr y colaboradores separaron mediante CZE, células de *S. cerevisiae* y *Escherichia coli*, obtuvieron buena eficiencia y excelente resolución. Conforme aumenta la fuerza iónica disminuye la μ_{ep} en *E. coli*, se mantiene en *S. cerevisiae*. Conforme aumenta el pH incrementa la μ_{ep} en *E. coli* y ligeramente en *S. cerevisiae* [Petr *et al.*, 2009]. En el año 2011 Horka y colaboradores separaron mediante CZE una mezcla de conidias de 4 especies de *Monilinia* previamente identificadas por secuenciación. La concentración obtenida de conidias de cepas aisladas y las aisladas de la manzana fue de 1×10^8 células/mL [Horka, 2012]. Recientemente, Rogowska y colaboradores (2018) realizaron un análisis de *S. cerevisiae* utilizando ECZ, evaluando el efecto de diferentes pH en solución de iones Ca^{2+} sobre la μ_{ep} y la agregación celular, observando que la movilidad electroforética de las levaduras disminuye conforme aumenta el pH de la solución de Ca^{2+} y se presenta la agregación celular [Rogowska *et al.*, 2018].

2.8.1 Trabajos de identificación de células fúngicas por EC en el Laboratorio de Desarrollo Analítico

En el año 2007, Cazares, utilizando EC, obtuvo señales características de células de *Botryosphaera rhodina* y *Trichoderma sp.* en su forma micelial, con t_m característicos para cada cepa, así como un pico definido y simétrico, demostrando la factibilidad de estudiar células fúngicas mediante esta técnica [Cázares, 2007]. Aguilar en el 2009, buscando controlar la longitud de las células miceliales, encontró que se obtenían señales electroforéticas características en tiempos de migración relativamente cortos, utilizando germínulas de *Trichoderma sp.* [Aguilar, 2009]. Para el año 2009, Cázares logró caracterizar tanto conidias de *T. atroviride* como esporas de *Amylomyces rouxii* y *Agaricus bisporus*. Obtuvo excelentes resultados en las diferentes condiciones ensayadas (pH, longitud de capilar, d.i. del capilar, tipo de buffer y voltaje) identificando las mejores condiciones y tiempos de migración; de esta manera separaron conidias de *T. atroviride* y esporas de *Agaricus bisporus var. portobello* en mezcla, con excelente resolución [Cazares, 2009]. En el año 2011, Ávila estudió el comportamiento electroforético de macroconidias de los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Pestalotiopsis*, aislados de hojas y frutos enfermos de guayaba, obteniendo señales características para una de las cepas de *Alternaria*, pero no para las cepas de *Pestalotiopsis*. Además, demuestra que las macroconidias no pierden su viabilidad después de migrar a lo largo del capilar durante el proceso electroforético [Ávila, 2011]. Castillo y Robinson, en el 2013, evaluaron el efecto de surfactantes catiónicos en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.* En el mismo año, Rivero y Robinson, evaluaron el efecto de un surfactante aniónico y uno no iónico en la movilidad electroforética de conidias de una cepa silvestre de *Trichoderma* [Rivero y Robinson, 2013]. En el año 2014, Salazar evaluó la influencia de surfactantes en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.*, observando que los surfactantes CTAB y TX-100 ejercen

efecto sobre la movilidad y agrupación de las conidias, obteniendo buenas señales electroforéticas. En un estudio más reciente, Gallegos (2016) comparó las señales electroforéticas de cinco cepas de *Trichoderma spp.*, utilizando buffer zwitteriónicos, obteniendo señales estrechas y bien definidas para cada una de las especies y al probar las mismas condiciones en un corrimiento electroforético con mezcla de las cinco cepas se hizo evidente la posible separación de señales electroforéticas correspondientes a cada una de las especies del género *Trichoderma*.

2.9 Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF), constituye una técnica avanzada, automatizada, objetiva y altamente sensible, muy útil para el estudio de las células. Ésta nos brinda una gran cantidad de información acerca del tamaño celular (forward scatter), complejidad celular (side scatter) y el porcentaje de viabilidad de la muestra evaluada [Marsán *et al.*, 2015].

A pesar de que la citometría de flujo es utilizada a menudo para la descripción morfológica de microorganismos como bacterias, los estudios realizados en organismos filamentosos son pocos. Un parámetro importante de los hongos filamentosos que se ha evaluado utilizando la CMF es la viabilidad, determinando su porcentaje en fluidos metalúrgicos, así como su viabilidad en respuesta a pruebas de sensibilidad y efectos de la radiación gamma; datos importantes para una gran cantidad de aplicaciones en la industria [Balajee *et al.*, 2002; Mesquita *et al.*, 2013; Vanhauteghem *et al.*, 2017; Ehgartner *et al.*, 2017].

La CMF también ha sido utilizada para el análisis del género *Trichoderma*, utilizando colorantes para lograr diferenciar las diferentes etapas de crecimiento desde la germinación hasta el desarrollo de las hifas [Bradner *et al.*, 2003].

Utilizaron la CMF para evaluar la viabilidad de conidios microencapsulados con polímeros de *Trichoderma harzianum* para asegurar una mejor conservación de las formulaciones utilizadas en control biológico, papel principal de este género fúngico [Muñoz-Celaya *et al.*, 2012].

Para evaluar la viabilidad se utilizan colorantes, como el diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), que pueden penetrar todas las células, pero únicamente las células viables son capaces de convertirla en un producto fluorescente y el yoduro de propidio (IP) que puede penetrar únicamente células con paredes celulares comprometidas; dicha técnica fue utilizada para evaluar viabilidad y daño celular en conidias de *Trichoderma harzianum*, después de procesos de secado [Muñoz-Celaya *et al.*, 2012].

Otro estudio también evaluó la viabilidad de *Trichoderma harzianum* sometidas a diferentes tipos de estrés, utilizando los colorantes FUN1 y IP, y determinaron que el principal daño de las conidias es la pérdida de integridad de la membrana, sin embargo, hace mención que una porción de las conidias conserva su membrana íntegra aunque pierden su capacidad metabólica [Muñoz-Celaya *et al.*, 2015].

III. JUSTIFICACIÓN.

Los géneros fúngicos presentan los mismos componentes estructurales (β -glucano, glicoproteínas y quitina) en su pared celular.

En el análisis del género *Trichoderma* utilizando la EC, se ha logrado obtener señales electroforéticas estrechas, definidas y simétricas en ensayos individuales, brindando gran información sobre las propiedades de pared de estos microorganismos, como son la agregación celular y adherencia a la pared interna del capilar.

A partir de ensayos con mezclas de los géneros *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus* var. *portobello*, se busca analizar el comportamiento de las células fúngicas y sus propiedades de pared celular variando condiciones en el buffer de corrimiento utilizando aditivos como modificadores de FEO, surfactantes y selectores quirales, para así poder conocer las diferencias y similitudes entre la pared celular de ambos géneros fúngicos.

IV. HIPÓTESIS

La incorporación de aditivos al buffer de corrimiento en el análisis de mezclas de conidias de *Trichoderma atroviride* y esporas de *Agaricus bisporus var. portobello* provoca movilidades electroforéticas distintivas.

V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la incorporación de aditivos al buffer de corrimiento sobre la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp.* y esporas de *Agaricus bisporus var. portobello*.

5.1 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de aditivos modificadores de FEO en la movilidad electroforética de las células fúngicas en ensayo.
2. Evaluar el efecto de surfactantes en la movilidad electroforética de células fúngicas en ensayo.
3. Evaluar el efecto de modificadores quirales en la movilidad electroforética de las células fúngicas en ensayo.

VI. ESTRATEGIA

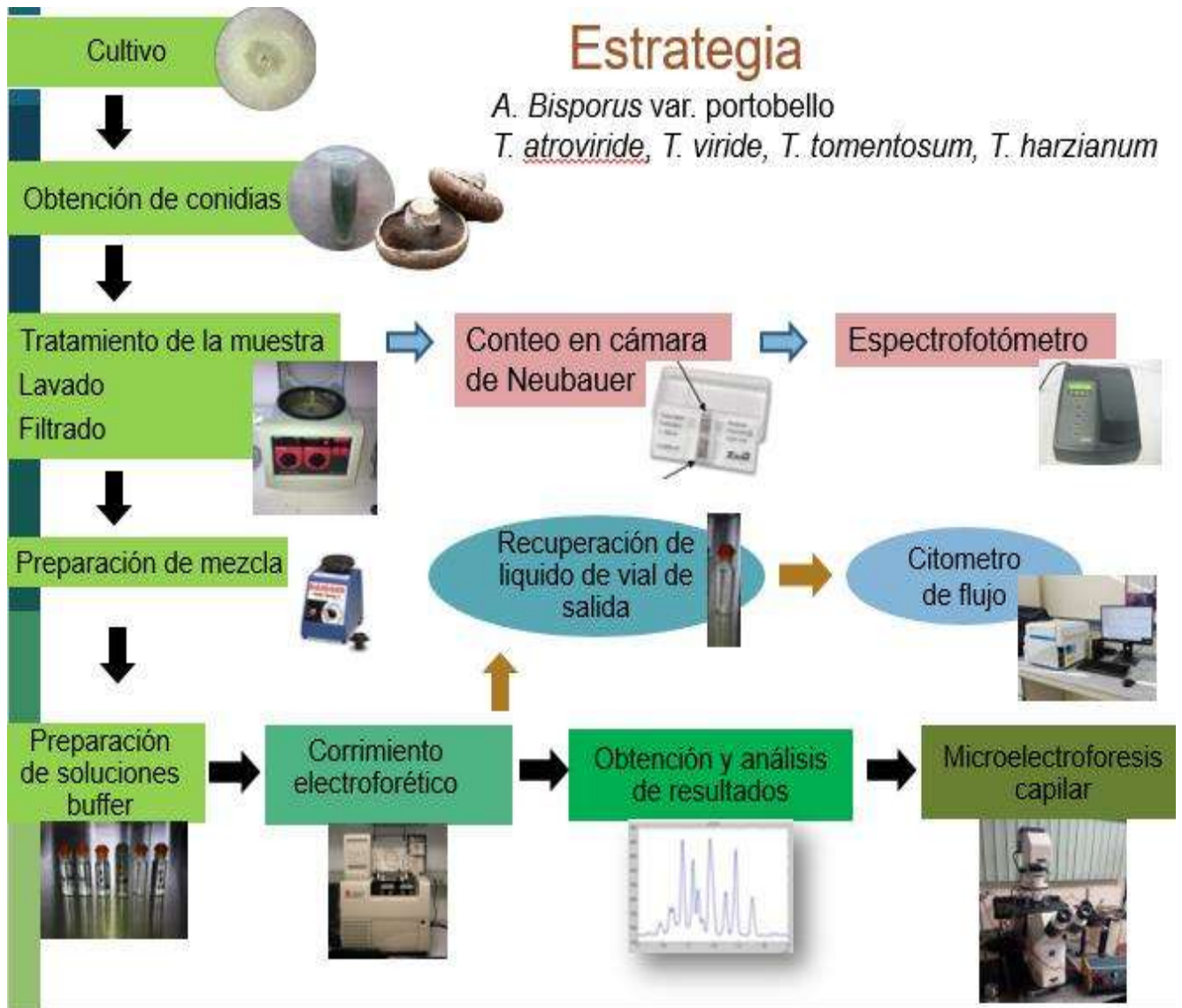


Figura 11. Estrategia experimental.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se utilizaron cuatro cepas silvestres del género *Trichoderma* (Tabla 5) provenientes del Cepario Michoacano Universitario perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del CMEB-UMSNH. Fueron sembrados en Medio Mínimo Vogel (MMV) para mantener el micelio vegetativo de *Trichoderma* spp. Se realizaron resiembras continuas de las cuatro especies silvestres de *Trichoderma* para la generación constante de inóculos y la obtención de conidias nuevas, que fueron utilizadas como muestra. También se utilizaron esporas de *Agaricus bisporus* var. *portobello*.

Tabla 5. Cepas silvestres de género *Trichoderma*.

<i>Trichoderma harzianum</i>	CMU1
<i>Trichoderma atroviride</i>	CMU8
<i>Trichoderma viride</i>	CMU218
<i>Trichoderma tomentosum</i>	CMU221

7.2 Preparación de solución stock de MMV

Se prepararon 500mL de una solución stock (50X) de MMV, compuesta por los reactivos que se muestran en la tabla 6. La solución de oligoelementos se prepara por separado. Los componentes se agregan lentamente en 400 mL de H₂O destilada, se le adiciona 2.5 mL de solución de oligoelementos y se afora a 500mL. Por último se le agrega 3 ml de cloroformo como conservador. Mantener a temperatura ambiente y en oscuridad.

Tabla 6. Componentes de la solución stock de MMV.

Reactivo	Cantidad
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 - 5\text{H}_2\text{O}$	75g
KH_2PO_4	125g
NH_4NO_3	50g
$\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	10g
$\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$	2.5g
Biotina (5mg/100mL de etanol 50%v/v)	2.5mL
Solución de oligoelementos	2.5mL
Ácido cítrico - $2\text{H}_2\text{O}$	2.5g
$\text{ZnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$	3.5g
$\text{FeCl}_3 - 6\text{H}_2\text{O}$	0.5g
$\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$	0.125g
$\text{MnCl}_2 - 4\text{H}_2\text{O}$	0.036g
H_3BO_3	0.025g
$\text{NA}_2\text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$	0.025g

De la solución stock se utilizan 20 mL para preparar un litro de MMV.

7.2.1 Preparación del medio de cultivo: Medio Mínimo Vogel

Para preparar 500mL de medio de cultivo se pesaron 7.5g de agar, 7.5g de Dextrosa DIBICO®. En un matraz Erlenmeyer se colocó el agar, la Dextrosa DIBICO® y 10 mL de solución stock de MMV, se le adicionaron 480mL de H_2O bidestilada para completar un volumen total de 500mL, se cubre el matraz con tapón de algodón, gasa y aluminio y se llevó a esterilizar en autoclave a 121°C ($15\text{lb}/\text{in}^2$) durante 15 min. Se dejó enfriar y posteriormente se vació en cajas de Petri, ya solidificados se guardaron en refrigeración hasta su uso.

7.3 Cultivo de especies de *Trichoderma* spp.

Se realizaron resiembras continuas de las cuatro especies silvestres de *Trichoderma* para la generación constante de inóculos y la obtención de conidias nuevas que fueron utilizadas como muestra, tomando un bocado de 5 mm de ancho, inoculando en dos cajas Petri que contienen MMV para cada especie.

7.3.1 Estimulación de la conidiación

Las cepas se incubaron a 25°C por 72 h. Transcurrido el tiempo se realizó daño mecánico al micelio de cada cepa con la ayuda de una espátula, para estimular la conidiación, tardando un aproximado de 24 h en comenzar la conidiación, (Figura 12).

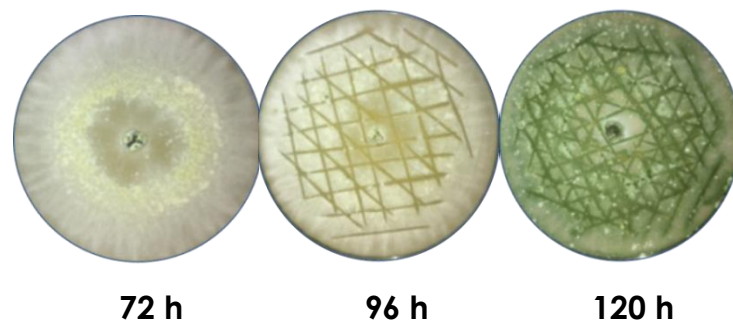


Figura 12. Estimulación de la conidiación en las cepas de *Trichoderma*.

7.3.2 Recolección de conidias de *Trichoderma*

Se presentó la conidiación aproximadamente a las 120 h y se procedió a recolectar las conidias utilizando 1 mL de agua estéril con agitación manual, ladeando la caja de Petri por 1 minuto, recolectando el líquido con pipeta Pasteur para colocarla en un microtubo de 1.5 mL (Fig. 13).



Figura 13. Recuperación de conidias.

La solución obtenida se filtró usando papel filtro estéril y se colocó en microtubos estériles de 1.5 mL. A continuación las conidias se lavaron tres veces con 1 mL de H₂O destilada estéril agitando en vortex (ICA MS1 Minishaker®) durante 5 min y centrifugando a 13,300g durante 10 min, para liberarlas del micelio y medio de cultivo. El sedimento se recupera y finalmente se resuspende en el buffer de corrimiento con una dilución 1:10 bajo condiciones estériles; posteriormente, se sonicar en un equipo Branson 1510, durante 10 min para eliminar las burbujas presentes en la suspensión.

7.4 Recolección de esporas de *Agaricus bisporus*

Para la recuperación de las conidias de *Agaricus bisporus* (Fig. 14) se procedió a remover todas las laminillas del hongo y fueron colocadas en tubos para centrifuga de 10 mL, a los que se le adiciono H₂O destilada suficiente para llenarlos y realizar lavados. Fueron llevados a vortex por 3 min para que se desprendieran las esporas de las laminillas. Posteriormente se llevaron a centrifugación a 4500 rpm por 10min, después de la centrifugación las esporas quedan sedimentadas en el tubo y las laminillas quedan suspendidas en el sobrenadante por lo que se eliminan los sobrenadantes de todos los tubos. Los sedimentos fueron resuspendidos en H₂O destilada y se realizaron varios lavados hasta obtener el H₂O clara. Posteriormente se filtró la solución utilizando una gasa para eliminar los restos de laminillas y obtener la suspensión de esporas en H₂O estéril.



Figura 14. Forma macroscópica y microscópica de *Agaricus bisporus var. portobello*.
a) Carpóforos, b) Esporas

7.5 Conteo de conidias en cámara de Neubauer

Las células se contaron en un hematocitómetro (Camara de Neubauer, (Fig. 15), utilizando diluciones seriadas 1:10, 1:30, 1:50, 1:100, 1:150 y 1:200.

Los conteos se realizaron por triplicado y se determinó el promedio.

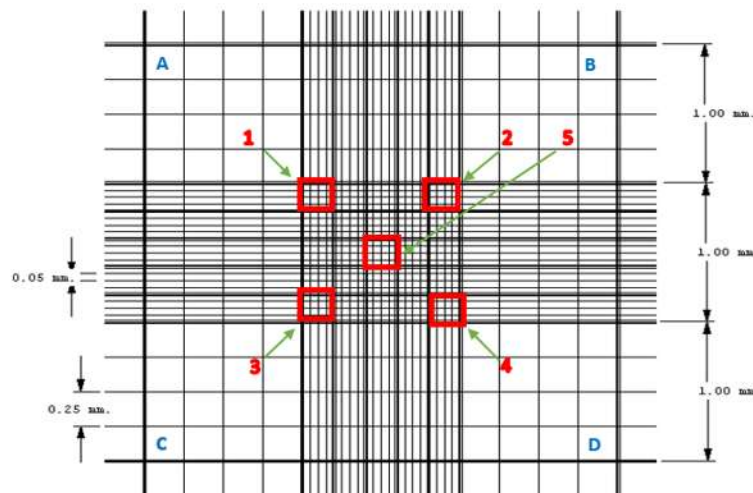


Figura 15. Área de los subcompartimentos para conteo de conidios

Se utilizó la siguiente fórmula matemática para obtener la concentración de las conidias (número de conidias por μL) presentes en la suspensión original [Marienfield, 2010].

$$\text{Conidias}/\mu\text{L} = \{[(\text{Campo 1} + \text{Campo 2})/2] \times 2,5 \times 10^3\}$$

$$\text{Campo 1} = (E1 + E2 + E3 + E4 + E5)/5 \text{ y } \text{Campo 2} = (E1 + E2 + E3 + E4 + E5)/5$$

Ejemplo:

$$\text{Conidias}/\mu\text{L} = \{[(32 + 24)/2] \times 2,5 \times 10^3\} = 1400000 \text{ conidias por } \mu\text{L}$$

También se contabilizaron las células de las 24 diluciones analizadas con el hematocitómetro, utilizando el método de turbimetría [Caligiore-Gei, 2015] a una longitud de 530nm en un espectrofotómetro Spectronic® 20 Genesys™.

7.6 Viabilidad de las células analizadas

La viabilidad de las células fúngicas se analizó por citometría de flujo. Se utilizó una suspensión de conidias recién colectadas de *Trichoderma atroviride*.

De acuerdo al protocolo del colorante “MUSE™ Count & Viability Kit User’s Guide” se tomaron 20 μL de la suspensión de conidias en 480 μL de colorante. Se dejó reposar por cinco min y se realizó el análisis con el citómetro de flujo CytoFLEX, BECKMAN COULTER, Life Sciences (Fig. 16).

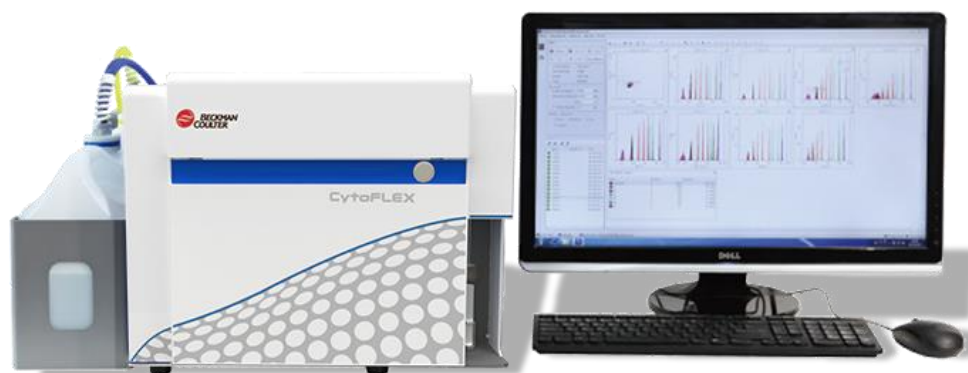


Figura 16. Citómetro flujo CytoFLEX BECKMAN COULTER Life Sciences.

7.7 Electroforesis capilar: instrumentación.

Los corrimientos electroforéticos se realizaron mediante un equipo BECKMAN COULTER P/ACE™ MDQ Capillary Electrophoresis System Beckman Coulter® (Fig. 17). Se utilizó un capilar de sílice fundida de 100µm d.i., 75cm de L_t y 55cm de L_d , empleando un detector de arreglo de diodos con una longitud de onda de 201, 254 y 280nm, una temperatura controlada de 25°C y un campo eléctrico constante, en polaridad normal (+).



Figura 17. Equipo de electroforesis capilar.

Para comenzar los corrimientos electroforéticos es necesario realizar lavados al capilar nuevo para acondicionarlo. Dichos lavados consisten en hacer

pasar soluciones en el interior del capilar de acuerdo a las condiciones que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones para acondicionar capilares nuevos.

Solución	Presión (psi)	Tiempo (min)
Metanol	20	5
Agua destilada	20	2
HCl 1N	20	5
Agua destilada	20	2
NaOH (solución regeneradora) 1N	20	10
Agua destilada	20	2
Solución buffer	20	5

El método utilizado para realizar un corrimiento electroforético se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Método para corrimiento electroforético.

Solución	Presión	Tiempo	Voltaje
NaOH 1N	20	2	-
H₂O	20	2	-
Recubrimiento del capilar	20	3	-
Buffer	20	3	-
Muestra	0.5	12s	-
Plug de buffer	0.5	5s	-
Separación (cierre de circuito con viales de buffer)	-	15min	17KV

7.7.1 Análisis de vial de salida de análisis electroforéticos

Para realizar el análisis de vial de salida se utilizaron las condiciones que se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Condiciones para análisis de vial de salida.

Muestra	Suspensión de conidias de <i>Trichoderma harzianum</i>
BGE	HEPES 20mM pH 7
Aditivo	TX100
NaOH 1N, H ₂ O dest.	Lavados de capilar entre corridas

Se realizaron cinco corrimientos electroforéticos continuos de la misma muestra. Se recuperó el líquido del vial de salida y se colocó en un microtubo de 1.5 mL para centrifugar a 13300g por 5 min. Las conidias se resuspendieron agitando en vortex por 3 min. La concentración aproximada de conidias presentes en el vial de salida se determinó como se mencionó anteriormente, interpolando en la curva patrón correspondiente para *Trichoderma harzianum*.

Este análisis se realizó por cuadruplicado y se obtuvo el promedio.

7.7.2 Preparación de las muestras para corrimientos electroforéticos

Se probaron diferentes condiciones en muestra como son:

- Mezcla de esporas de *Agaricus bisporus var. portobello* y conidias de *Trichoderma atroviride*,
- Mezcla de cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. tomentosum*) y en corrimientos individuales.

7.7.3 Mezcla *Agaricus bisporus var. portobello* y *Trichoderma atroviride*

Se preparó una mezcla de esporas de *Agaricus bisporus* y conidias de *Trichoderma atroviride* tomando 200µL de cada una; se colocaron en un microtubo y se agitaron en vortex por 5 min. A dicha solución se le adicionaron 200µL de buffer de corrimiento para obtener una dilución final de 2:3. De la

suspensión resultante se tomaron 400 μL para utilizarlos como muestra en los corrimientos electroforéticos.

7.7.4 Mezcla de cuatro especies silvestres del género *Trichoderma*

Para realizar la mezcla de cuatro especies de *Trichoderma* se tomaron 200 μL de cada una, se colocaron en un microtubo y se agitó en vortex durante 5 min. A la suspensión resultante se le adicionó buffer de corrimiento para tener una dilución final en proporción 2:3, tomando 400 μL de la suspensión y 200 μL de buffer. Finalmente, se colocaron 400 μL de la muestra en viales especiales para llevar a cabo el análisis electroforético.

7.7.5 Preparación de soluciones

Para preparar las soluciones buffer y aditivos se utilizaron reactivos grado analítico.

- HEPES marca SIGMA® Life Science
- Borato de Sodio, 10-hidrato marca J.T.Baker®
- β -Ciclodextrinas marca SIGMA-ALDRICH®
- CTAB marca SIGMA-ALDRICH®
- Tritón™ X-100 marca SIGMA® Life Science
- Brij 35 marca SIGMA-ALDRICH®
- Hidróxido de Sodio marca J.T.Baker®
- Ácido Clorhídrico marca J.T.Baker®
- Metanol marca J.T.Baker®
- Agua destilada

Los buffers utilizados se ajustaron a un pH en su máxima capacidad de amortiguamiento alrededor de su pKa (Tabla 10), utilizando un potenciómetro Hanna Instruments pH 211 Microprocessor.

Tabla 10. Buffers y características utilizadas.

Buffer	pKa	Intervalo de pH	pH utilizado
Borato	9.24	8.14 – 10.14	8
Buffer zwitterionicos			
HEPES	7.56	6.55 – 8.55	7

7.7.6 Aditivos en buffer de corrimiento (BGE) y muestra.

Modificadores quirales: β -Ciclodextrinas (CDs)

Modificadores de FEO: CTAB 25mM

Surfactantes: TX-100 al 1% y Brij 35 al 0.9mM

Para realizar lavados del capilar entre las corridas se utilizó NaOH 1M, H₂O, HCl 1M y metanol.

7.7.7 Corrimientos electroforéticos utilizando CaCl₂ en la preparación de la muestra

Se preparó una muestra con 100 μ L de suspensión de conidias de *Trichoderma atroviride* y se le adicionaron 300 μ L de CaCl₂ 8mM, dejando reposar 24h para posteriormente realizar el corrimiento electroforético utilizando como BGE HEPES 20mM a pH 7.

7.7.8 Variación de la concentración de conidias de *Trichoderma atroviride* en la muestra preparada con CaCl₂

Se obtuvo una suspensión de conidias en H₂O estéril de *Trichoderma atroviride*. Se determinó la concentración de conidias tomando de la suspensión original diferentes volúmenes (1 μ L, 2 μ L, 3 μ L, 4 μ L, 5 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L) en microtubos de 2mL y se calculó el total de conidias que estaba presente en cada volumen.

Las conidias se centrifugaron a 13300g por 5min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 μ L de H₂O estéril. A las suspensiones resultantes se le adicionaron 300 μ L de CaCl₂ 8mM y se dejaron reposar por 24h para su posterior análisis electroforético.

7.8 Microelectroforesis capilar

Para realizar el análisis de microelectroforesis capilar se cortó un capilar de 10cm de longitud, d.i. de 100 μ m y se le quitó el recubrimiento de poliamida, dejándolo totalmente transparente. El equipo de microelectroforesis capilar consta de una fuente de poder que proporcionara el campo eléctrico de 100 volts y dos celdas que contienen la solución buffer donde se conectará el capilar completamente lleno de la suspensión de conidias. Se utilizó un microscopio óptico marca Zeiss para observar el interior del capilar, el sistema se monta como se muestra en la figura 18.



Figura 18. Montaje de equipo de microelectroforesis capilar.

Para realizar los análisis se utilizó como BGE, HEPES 1N a pH 7.

Las muestras se prepararon con una mezcla de 100 μ L de suspensión de conidias de *Trichoderma atroviride* y 100 μ L de suspensión de esporas de *Agaricus bisporus*.

Las soluciones con las que fue preparada dicha muestra fueron: β -CDs 20mM, CTAB 25mM, Brij 35 0.9mM, Tx100 al 1%, y CaCl₂ 8mM.

Los análisis se realizaron en muestras recién preparadas y 96h posteriores a su preparación para observar el comportamiento de las células fúngicas en el interior del capilar.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Concentración de conidias

Para saber el número aproximado de conidias con las que se trabajaba, se calculó la concentración de conidias. Se observó que las conidias presentes en las suspensiones variaban de acuerdo a la especie, yendo desde los 58 millones hasta los 197 millones por μL (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de conidias presentes en las suspensiones de las cuatro especies de *Trichoderma*

<u>Dilución</u>	<u><i>T. harzianum</i></u> <u>(con/μL)</u> $\times 10^6$	<u><i>T. atroviride</i></u> <u>(con/μL)</u> $\times 10^6$	<u><i>T. viride</i></u> <u>(con/μL)</u> $\times 10^6$	<u><i>T. tomentosum</i></u> <u>(con/μL)</u> $\times 10^6$
1:1	197.5	156.25	58	144.25
1:10	19.75	15.625	5.8	14.425
1:30	7.65	6.05	3.275	7.2
1:50	5.15	4.775	2.6	3.525
1:100	2.3	3.325	1.125	2.7
1:150	1.4	1.35	0.95	0.775
1:200	1.075	1.675	0.5	0.525

8.1.1 Análisis espectrofotométrico

Las absorbancias correspondientes a cada una de las diluciones se utilizaron para realizar curvas patrón (Fig. 19, 20, 21, 22) para utilizarlas posteriormente en la determinación del número de conidias que conformaban cada muestra a analizar.

Concentración (con/μL)	Absorbancia
156.25X10 ⁶	1.608
15.625X10 ⁶	0.1525
6.05X10 ⁶	0.0515
4.775X10 ⁶	0.035
3.325X10 ⁶	0.0245
1.35X10 ⁶	0.012
1.675X10 ⁶	0.006
0	0

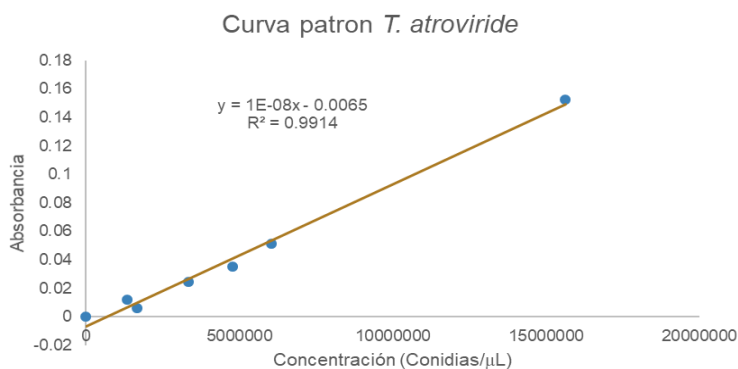


Figura 19. Curva Patrón de conidias de *Trichoderma atroviride*.

Concentración (con/μL)	Absorbancia
58X10 ⁶	1.281
5.8X10 ⁶	0.128
3.275X10 ⁶	0.0375
2.6X10 ⁶	0.017
1.125X10 ⁶	0.0115
9.5X10 ⁵	0.01
5X10 ⁵	0.006
0	0

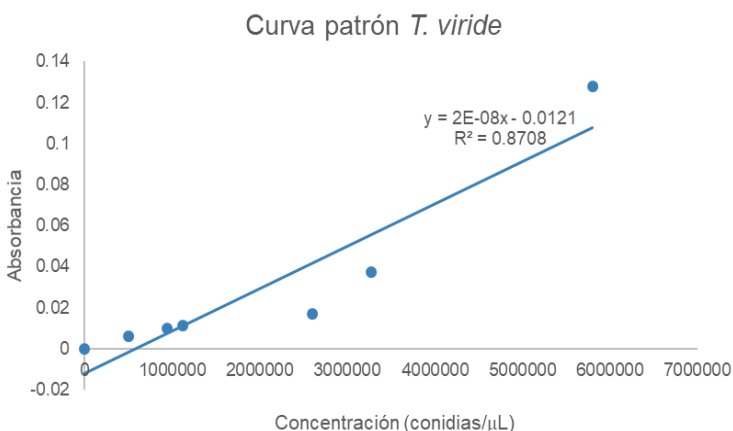


Figura 20. Curva Patrón de conidias de *Trichoderma viride*.

Concentración (con/ μ l)	Absorbancia
144X10 ⁶	1.633
14.42510 ⁶	0.187
7.2X10 ⁶	0.07
3.525X10 ⁶	0.04
2.7X10 ⁶	0.012
7.7510 ⁵	0.008
5.25X10 ⁵	0.005
0	0

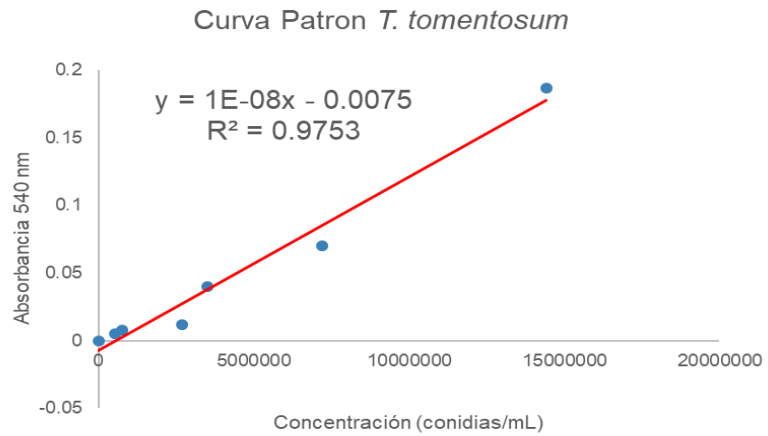


Figura 21. Curva Patrón de conidias de *Trichoderma tomentosum*.

Concentración (con/ μ L)	Absorbancia
197.5X10 ⁶	1.668
19.75X10 ⁶	0.221
7.65X10 ⁶	0.072
5.15X10 ⁶	0.0345
2.3X10 ⁶	0.0325
1.4X10 ⁶	0.018
1.075X10 ⁶	0.011
0	0

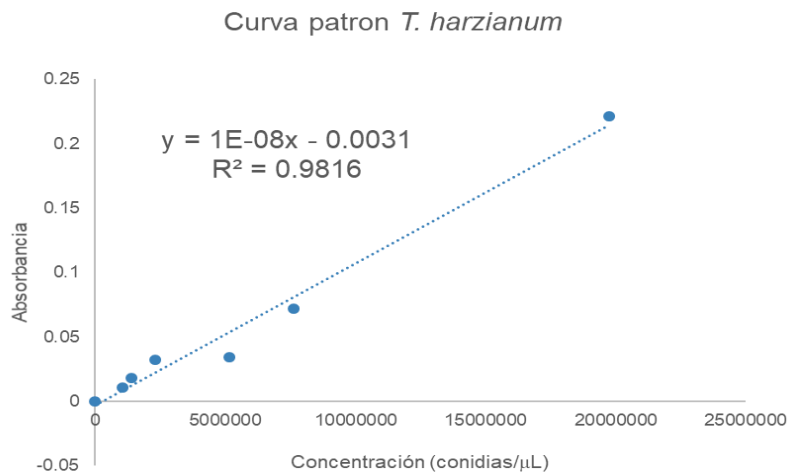


Figura 22. Curva Patrón de conidias de *Trichoderma harzianum*.

Como se observa en cada una de las curvas patrón, el coeficiente de correlación R^2 es cercano a la unidad, lo que nos indica que son adecuadas y que se pueden utilizar para interpolar absorbancias y conocer la concentración de conidias presentes.

8.2 Análisis de vial de salida

Después de obtener las curvas patrón de las suspensiones de conidias correspondientes a las cuatro especies del género *Trichoderma* y conocer el número aproximado de conidias que conformaba la suspensión, se determinó la cantidad de conidias que se recuperaron en los viales de salida después del análisis electroforético (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de absorbancia que arrojaron los viales de salida.

Abs	Concentración (con/ μ L)	1 Corrimiento (con/ μ L)
0.0063	937206.511	187441.3
0.007	999645.444	199929.08
0.01	1267240.87	253448.2
0.005	821248.492	164249.6
	Promedio =	201267

Cada una de las absorbancias corresponde al promedio de las concentraciones calculadas a partir de la absorbancia de cinco corrimientos electroforéticos consecutivos.

La muestra que se utilizó en el análisis está compuesta por 400 μ L de suspensión de conidias de *Trichoderma harzianum* con una concentración de 18×10^6 con/ μ L más 200 μ L de buffer. La muestra preparada quedo con una concentración de 12×10^6 con/ μ L, el volumen teórico inyectado es de 0.095 μ L, por lo que el número de conidias inyectadas es de aproximadamente 1.14×10^6 conidias. De las cuales se encontraron 201267 conidias presentes en el vial de salida por corrimiento electroforético correspondiente a un 17.65%,

comprobando que las señales electroforéticas obtenidas corresponden a la migración y detección de las conidias como consecuencia de su interacción con el BGE y los aditivos utilizados.

8.3 Viabilidad de las conidias de *Trichoderma*

La suspensión de conidias del género *Trichoderma* se analizó por citometría de flujo.

En las gráficas obtenidas se observan dos poblaciones, una correspondiente a las conidias viables (rosa) y otra población que corresponde a las conidias no viables (negro). Las conidias viables y no viables no se diferencian en granularidad y tamaño celular (Fig. 23).

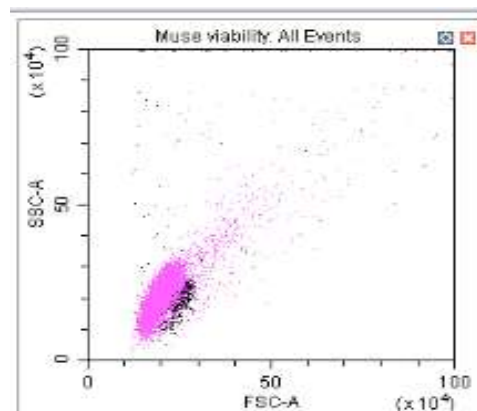


Figura 23. Análisis de conidias de *Trichoderma atroviride* en citómetro de flujo, mostrando complejidad y tamaño celular de dos poblaciones: Viables (rosa), no viables (negro).

La viabilidad de las células fúngicas ha sido evaluada en diferentes estudios analizando distintos factores que pudieran afectarla negativamente como son el potencial osmótico, el medio de cultivo, ya sea sólido o líquido, o la forma de conservación de las cepas que se utilice, relacionándolo con la disminución de UFC/mL [Sarmiento, 2013].

La viabilidad de la población fue del 91% (Fig. 24), que indica el porcentaje del total de conidias que tienen la capacidad de germinar.

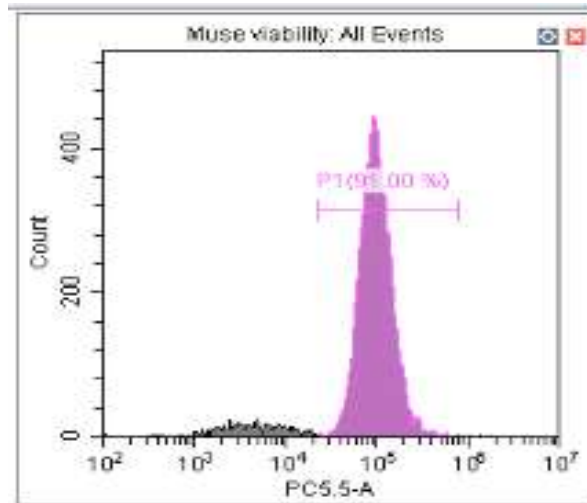


Figura 24. Porcentaje de viabilidad de conidias de *Trichoderma atroviride* obtenida por citometría de flujo.

Se considera una muestra adecuada ya que dicho porcentaje de células viables está cercano al 100%.

En la figura 25 se grafica el tamaño celular contra la fluorescencia, pudiendo observar que tanto células viables y no viables siguen presentando el mismo tamaño pero una mayor fluorescencia para las células viables.

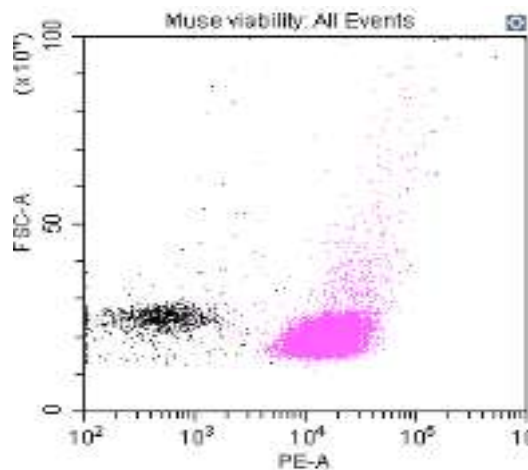


Figura 25. Grafica FSC-A (tamaño celular) vs. PE-A (Fluorescencia) de conidias de *Trichoderma atroviride*, conidias viables (rosa) y no viables (negro), teñidas con colorante MUSE®.

En la figura 26, se grafica granularidad contra fluorescencia mostrando que las dos poblaciones mantienen la misma complejidad independientemente si pertenecen a las células viables o no viables.

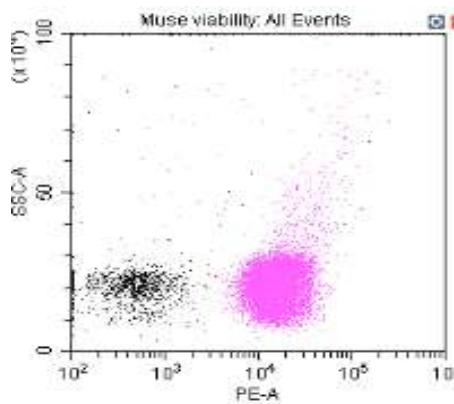


Figura 26. Grafica SSC-A (Complejidad celular) vs. PE-A (Fluorescencia) de conidias de *Trichoderma atroviride*, conidias viables (rosa) y no viables (negro), teñidas con colorante MUSE®.

8.4 Efecto de β -CDs en los corrimientos electroforéticos

En los corrimientos electroforéticos realizados para el análisis de conidias de *Trichoderma atroviride* y esporas de *Agaricus bisporus* var. *portobello*, utilizando como BGE HEPES 20mM a pH 7, se obtuvieron múltiples señales sin una buena resolución entre ellas (Fig. 27).

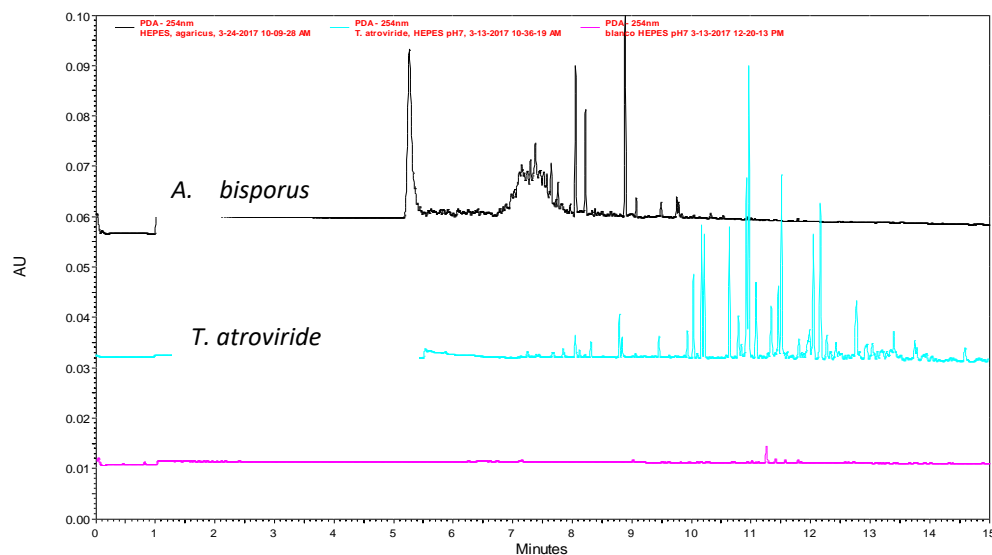


Figura 27. Corrimientos individuales de *T. atroviride* y *A. bisporus*, buffer HEPES 20mM pH 7.

A diferencia de dichas señales, se obtuvo una mejoría al utilizar como aditivo las β -ciclodextrinas en la misma muestra, demostrando que las células fúngicas están interactuando con dicho aditivo a través de sus propiedades de pared celular (Fig. 28). Este tipo de aditivos, pertenecientes al grupo de modificadores quirales, nunca ha sido utilizado en el análisis de células fúngicas, únicamente en la separación enantiomérica de moléculas químicas, como agentes solubilizantes para aceites volátiles hidrofóbicos, entre otros [Velásquez, 2010; Alzate, 2012].

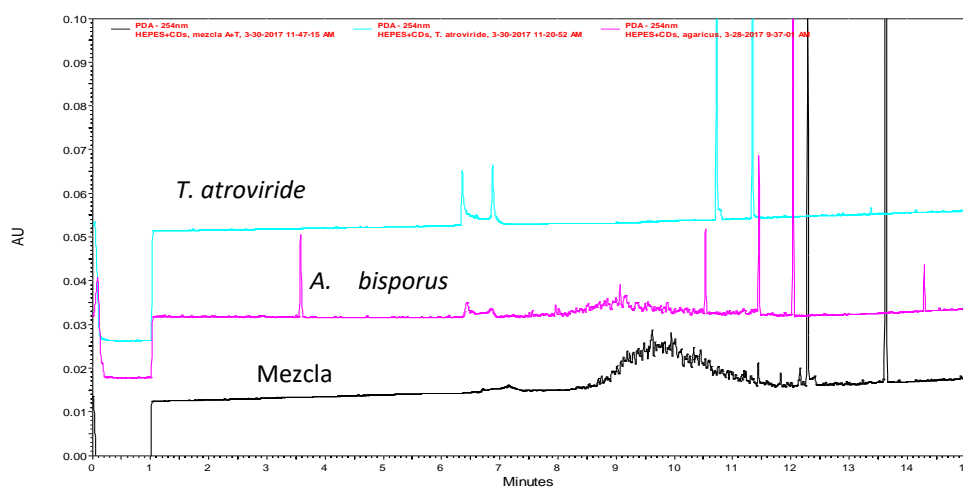


Figura 28. Corrimientos electroforéticos individuales y en mezcla de *A. bisporus* y *T. atroviride*, buffer HEPES 20Mm con adición de β -CDs.

Las β -ciclodextrinas forman complejos con moléculas y/o grupos funcionales, interactuando con su cavidad por medio de puentes de H; dentro del capilar, éstas podrían interactuar con el β -1,3-glucano (Fig. 29), al ser un compuesto orgánico y componente principal de la pared celular de ambos géneros fúngicos utilizados en este estudio [Castagnino, 2002; Ponton, 2008]. El β -1,3-glucano está compuesto por unidades de glucosa, la cavidad de las β -CDs es adecuada para formar complejos con huéspedes con masa molecular de entre 200 y 800g/mol [Álzate, 2012]. Otra posible interacción se da debido a que la pared celular fúngica contiene proteínas de superficie ricas en cisteína y propias de los hongos filamentosos (*Trichoderma*), conocidas como

hidrofobinas y se caracterizan por brindar el carácter hidrofóbico a la pared celular fúngica. Dicho efecto podría favorecer la interacción con las β -CDs ya que éstas también tienen un carácter hidrofóbico en su cavidad y al interactuar con un huésped hidrofóbico desplazan las moléculas de agua que contienen, favoreciendo su interacción con la pared, volviéndose un complejo mucho más estable [Sandoval, 2011; Martínez, 2007].

En los electroferogramas (Fig. 28) no se logró identificar una señal característica para cada género fúngico, obteniendo varios picos estrechos que muestran la agrupación de las células fúngicas, por lo que se comprueba que los grupos funcionales presentes en la pared celular no difieren entre géneros fúngicos, e interaccionan de la misma forma con las β -CDs.

A pesar de contar con los mismos componentes de pared celular, existen estudios que reportan diferencias estructurales de los polisacáridos que se encuentran en la pared celular entre variedades de la misma especie de *Agaricus bisporus*, pudiendo ser la causa de que se obtengan diferentes señales en los electroferogramas, ya que algunas células de *A. bisporus* y *T. atroviride* podrían estar interactuando en conjunto y de la misma forma con las β -CDs debido a la similitud en la disposición de grupos funcionales y otras células fúngicas de *A. bisporus* interactuar de manera separada por presentar dichas diferencias estructurales [García-Mendoza, 2000].

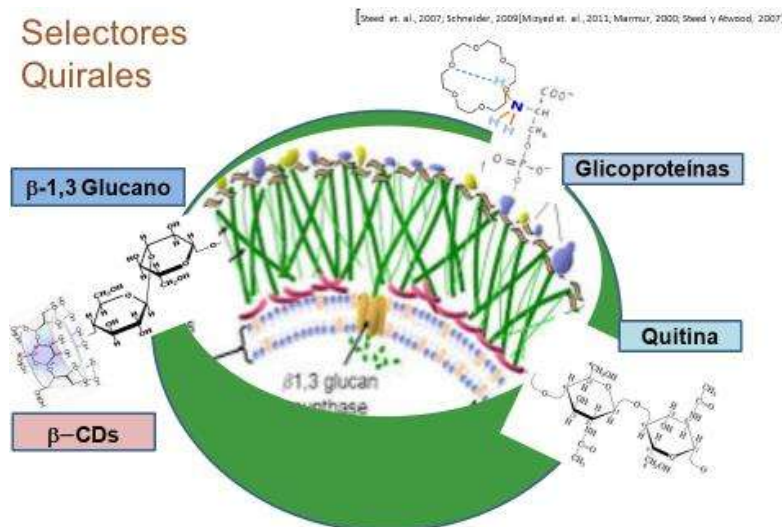


Figura 29. Componentes de la pared celular fúngica interactuando con β -CDs.

Para observar la interacción que existe entre las células fúngicas de ambos géneros y las β -CDs se realizó un análisis utilizando las mismas condiciones en un sistema de microelectroforesis capilar.

8.4.1 Interacción entre las células fúngicas y las β -CDs

En el equipo de microelectroforesis capilar se pudo observar la interacción que existe entre la mezcla de células fúngicas de *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus var. portobello* con las β -CDs dentro del capilar (Fig. 30). Observando que al aplicar el campo eléctrico, algunas conidias del género *Trichoderma* migran hacia el electrodo positivo como consecuencia de su μ_{ep} al estar cargadas negativamente (flecha roja); contrario a esto, algunas esporas de *A. bisporus var. portobello* y conidias de *Trichoderma atroviride* migran hacia el electrodo negativo (flecha azul). De acuerdo a lo reportado, los analitos que forman complejos con las CDs migran a la velocidad del FEO y aquellos que se encuentran libres en solución migran con una velocidad diferente. Con esto podemos corroborar que la interacción de las β -CDs se está presentando con ambos géneros fúngicos. La velocidad de migración de

las células fúngicas que interactúan con las β -CDs es menor comparada con las células que no presentan interacción con dicho aditivo, y esto es debido a que las CDs retardan el coeficiente de distribución y la velocidad depende directamente de él.

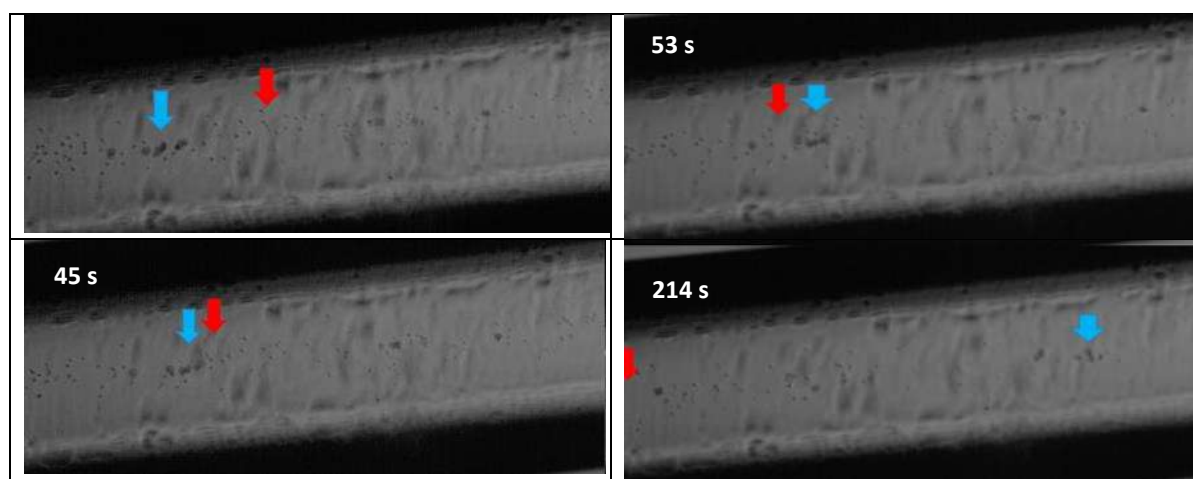


Figura 30. Interacción de células fúngicas de *T. atroviride* y *A. bisporus* en presencia de β -CDs, en el interior del capilar. Conidias de *T. atroviride* migrando hacia el electrodo positivo (flecha roja); complejos de β -CDs-conidia de *T. atroviride* y β -CDs-esporas de *A. bisporus* migrando en sentido del FEO (flecha azul).

8.5 Corrimientos electroforéticos con CTAB

Al utilizar como aditivo el CTAB 15mM adicionado al BGE, HEPES 20mM pH 7, en el análisis de la mezcla de *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride* se produjo la inversión del FEO, por lo que el corrimiento electroforético se realizó en polaridad inversa. Los surfactantes catiónicos, como es el caso del CTAB, tienden a adsorberse a la pared interna del capilar recubriendo a los grupos silanol y quedando la superficie cargada positivamente, lo que provoca que la doble capa eléctrica esté conformada por los aniones, invirtiendo el FEO y por lo tanto arrastrando a los analitos desde el polo negativo hacia el positivo (Fig. 31).

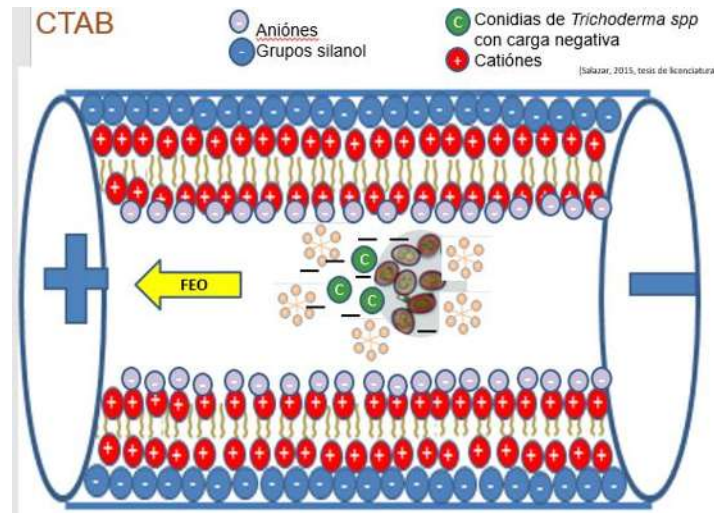


Figura 31. Posible interacción de *Agaricus bisporus* y *Trichoderma atroviride* en presencia del surfactante catiónico CTAB en el interior del capilar.

Al utilizar los surfactantes en una concentración mayor a su CMC, se provoca la formación de micelas que se caracterizan por tener una cabeza hidrofílica y una cola hidrófoba; dichas micelas interactúan por medio de sus colas formando agregados con las conidias (Fig. 31); los agregados micelas-conidias de surfactantes catiónicos migran en sentido del FEO y algunos se adhieren a la pared interna del capilar, esto es debido a que las cationes que se encuentran en las cabezas de las micelas se unen a los grupos Si-O⁻ del capilar para neutralizar la carga negativa, cuando estos ya están interaccionando con los analitos mediante sus colas hidrofóbicas.

En los electroferogramas se obtuvieron señales electroforéticas estrechas, pero no se logró identificar las que correspondieran a cada género fúngico (Fig. 32).

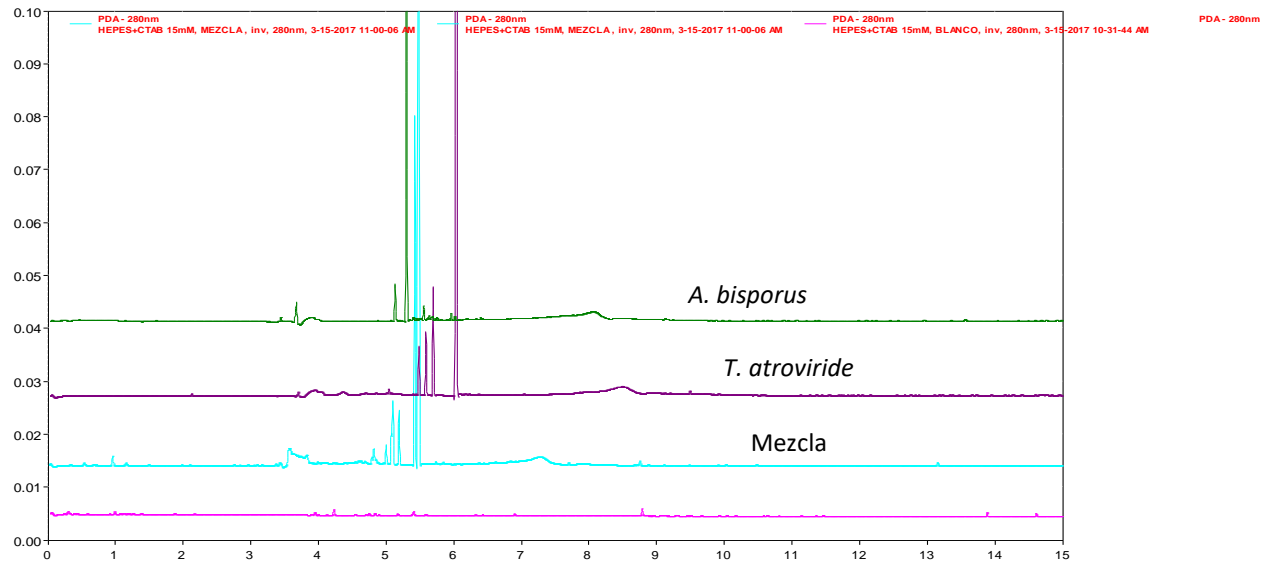


Figura 32. Corrimientos electroforéticos de mezcla *A. bisporus* y *T. atroviride*, buffer HEPES con adición de CTAB 25mM.

Dicho efecto de agregación y adherencia a la pared interna del capilar fue reportado por Salazar en el 2015, al realizar un análisis utilizando microelectroforesis capilar. En el 2016, Gallegos reportó el mismo efecto de agrupación en conidias del género *Trichoderma* utilizando como aditivo el CTAB, obteniendo una señal electroforética estrecha y definida. En este estudio se utilizaron dos géneros fúngicos, *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus*. De acuerdo con las señales que se obtuvieron, se podría indicar que la agrupación de células fúngicas se presenta sin importar que pertenezcan a dos géneros fúngicos diferentes, esto debido a la similitud estructural que permite la disposición de los mismos grupos funcionales en la pared celular fúngica; además de que el valor de pH del buffer (HEPES pH 7) con el que se trabaja les confiere a las células fúngicas un carácter hidrófobo que favorece la interacción con las micelas formadas por el surfactante CTAB [García-Mendoza, 2000; Castagnino, 2000; Salazar, 2015; Gallegos, 2016].

8.5.1 Interacción de las células fúngicas con CTAB

Utilizando el surfactante catiónico CTAB se observó el comportamiento de la mezcla de células fúngicas de *Trichoderma atroviride* y *Agaricus bisporus var. portobello* en el interior del capilar (Fig. 33). Se pudo corroborar que en presencia de dicho surfactante catiónico las conidias tienden a agruparse y adherirse a la pared interna del capilar, sin diferenciar entre los dos géneros fúngicos *T. atroviride* y *A. bisporus*; al formar dichos agregados adheridos a la pared no presentan movilidad electroforética y se mantienen en el mismo sitio en todo el tiempo de análisis, también se logra observar que algunas conidias individuales de *T. atroviride* migran hacia el electrodo positivo debido a su μ_{ep} al estar cargadas negativamente (indicadas con flecha amarilla) y algunas células de *A. bisporus* y *T. atroviride* migran hacia el electrodo negativo por la posible interacción con el surfactante catiónico CTAB al proporcionarles su carga positiva [Salazar, 2015; Castagnino, 2000].

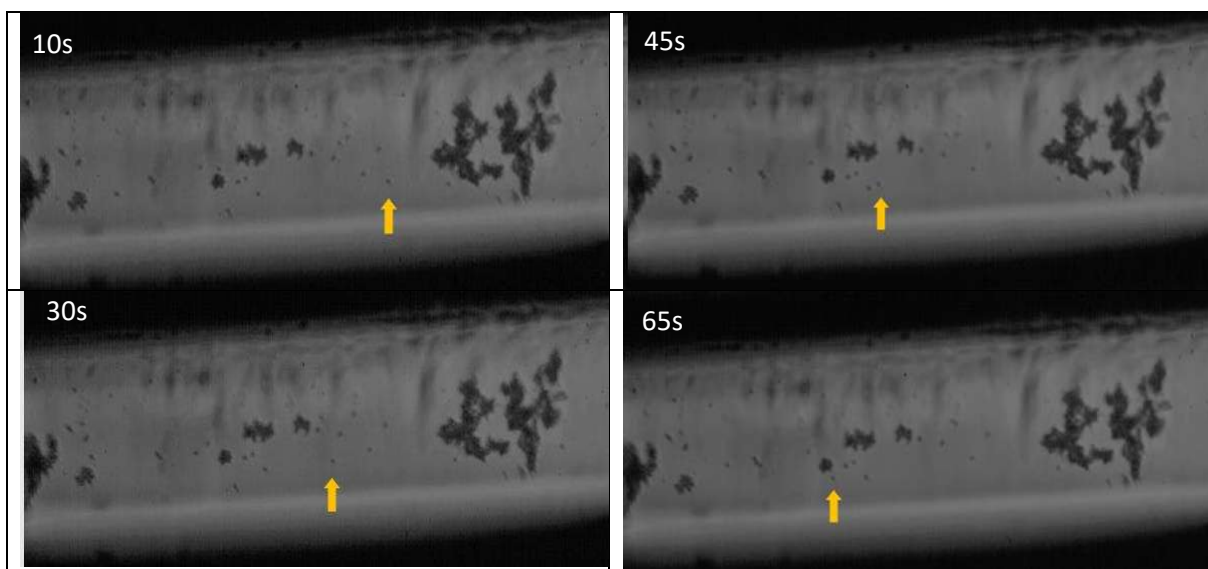


Figura 33. Interacción de *A. bisporus* y *T. atroviride* en presencia de CTAB 25mM, observado en microelectroforesis capilar. Conidias de *T. atroviride* migrando hacia el electrodo positivo debido a su μ_{ep} (flecha amarilla). Agregados de células fúngicas de ambos géneros *T. atroviride* y *A. bisporus* adheridos al capilar no presentan movilidad electroforética (explicación en el texto).

8.6 Efecto del Brij 35 en los corrimientos electroforéticos

En los corrimientos electroforéticos donde se utiliza Brij 35 como aditivo en el BGE, se analizó la muestra preparada con mezcla de tres cepas silvestres de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. viride*, *T. tomentosum*) y corrimientos individuales de cada cepa silvestre; en los corrimientos de cepas individuales se obtuvieron múltiples señales estrechas sin lograr la agrupación (Fig. 34), en los corrimientos electroforéticos realizados con la mezcla no se logró caracterizar señales correspondientes a cada uno de las especies fúngicas.

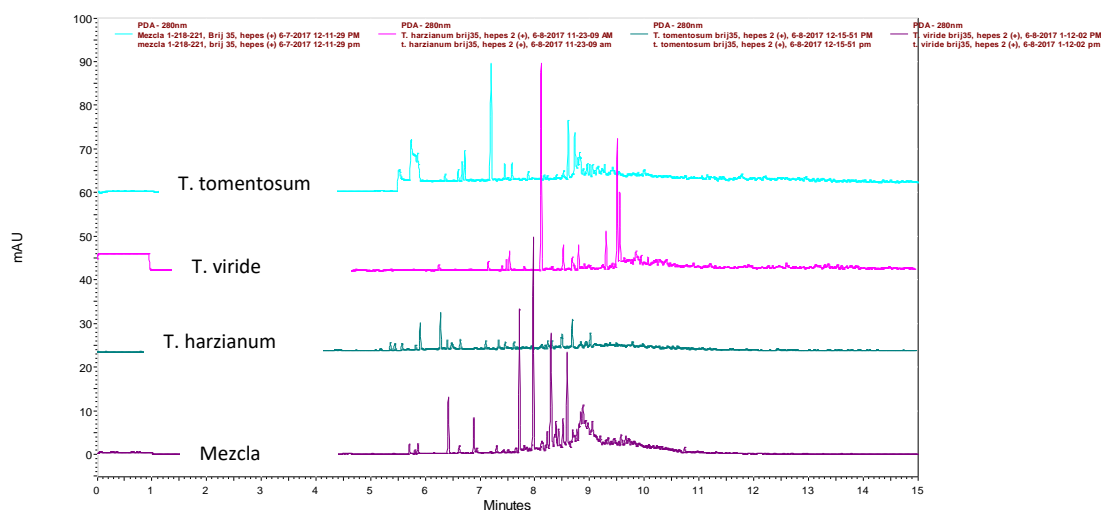


Figura 34. Corrimientos electroforéticos de mezcla de tres cepas de *Trichoderma*, utilizando HEPES como BGE adicionado con Brij 35.

Este tipo de aditivos se han utilizado en análisis de células fúngicas, como lo reportado por Horka en el 2009, donde logró separar una mezcla de conidias de diferentes géneros fúngicos utilizando Brij 35 como aditivo. Al tratarse de un surfactante no iónico, éste puede provocar la migración de las conidias de manera agrupada o individual, evitando que éstas se adhieran a la pared (Fig. 35) como se observó en estudios anteriores, migran en diferentes conjuntos, dando como resultado señales electroforéticas sin resolución [Salazar, 2015]. De acuerdo a lo reportado por García-Mendoza respecto a las diferencias

estructurales de los componentes de pared celular entre la misma especie de *A. bisporus*, se podría sugerir que entre las conidias de las tres especies silvestres del género *Trichoderma* también pueden existir dichas diferencias estructurales, lo que provoca que se obtengan múltiples señales electroforéticas en los análisis [García-Mendoza, 2000].

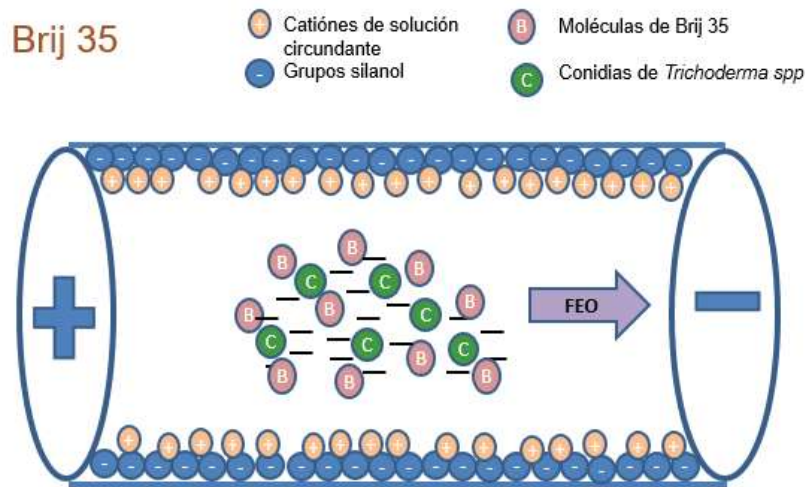


Figura 35. Interacción de conidias de *Trichoderma spp.* en presencia del surfactante no iónico Brij35, en el interior del capilar.

8.6.1 Interacción del Brij 35 con las células fúngicas en el interior del capilar

Utilizando el sistema de microelectroforesis capilar se observó la interacción de células fúngicas de *Agaricus bisporus var. portobello* y *Trichoderma atroviride* en presencia del surfactante no iónico Brij 35 (Fig. 36), pudiendo observar que las células de ambos géneros fúngicos migran de forma individual hacia el electrodo negativo (indicadas con flecha amarilla); se observan migrando en el centro del capilar sin adherirse a su pared, corroborando los resultados obtenidos por Salazar (2015) al utilizar un surfactante no iónico. Debido a los resultados obtenidos, se puede sugerir que los surfactantes no iónicos pueden utilizarse para realizar análisis de células fúngicas individuales ya que evitan la agregación celular.

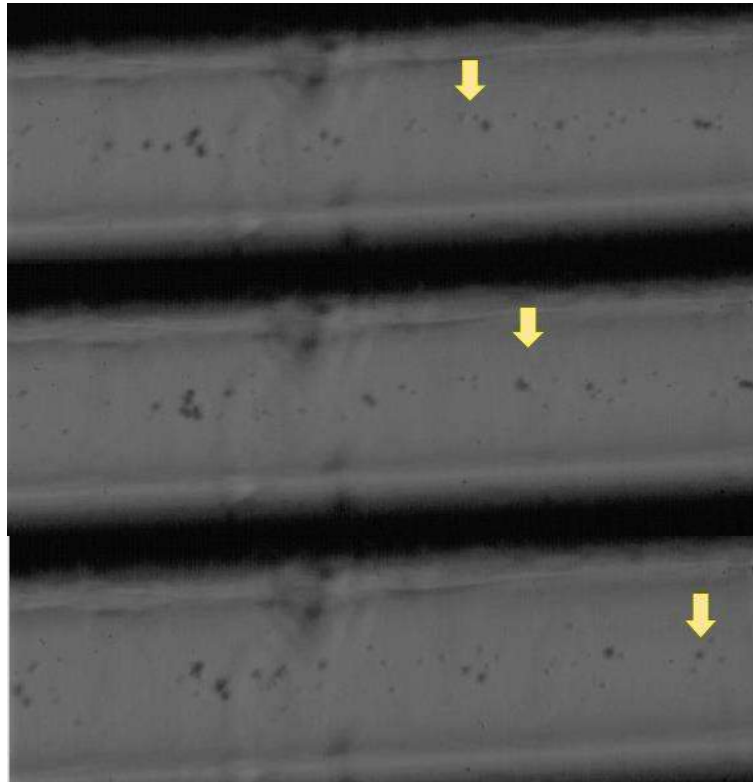


Figura 36. Fotografías de la interacción de *A. bisporus* y *T. atroviride* en presencia de Brij 35 0.9mM, en el sistema de microelectroforesis capilar. Migración individual de conidias de *T. atroviride* y esporas de *A. bisporus* hacia el electrodo negativo (indicadas con flecha amarilla), no presentan adherencia a la pared interna del capilar.

8.7 Efecto del CaCl_2 en los corrimientos electroforéticos

En los análisis electroforéticos, utilizando iones divalentes, se realizó una primera prueba utilizando una muestra preparada con 100 μL de suspensión de conidias de *Trichoderma atroviride* y se le adicionaron 300 μL de CaCl_2 8mM, el BGE fue HEPES 20mM a pH 7; al probar dichas condiciones se obtuvieron en los electroferogramas un solo pico simétrico y bien definido (Fig. 37).

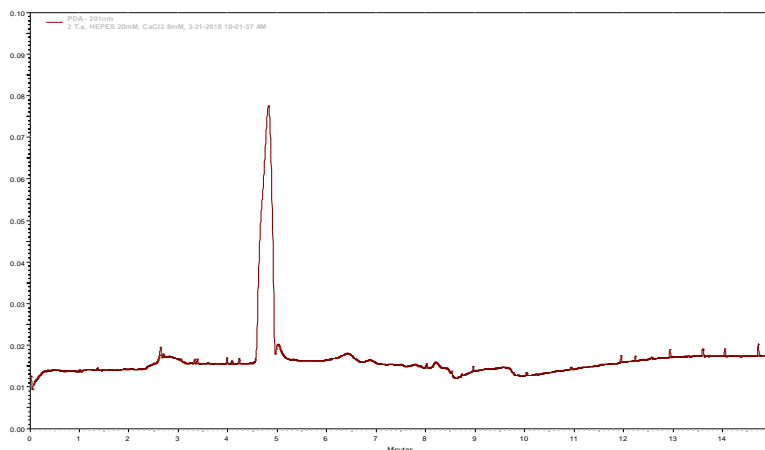


Figura 37. Señal electroforética obtenida en el análisis de *Trichoderma atroviride* utilizando CaCl_2 8mM, BGE HEPES 20mM a pH 7.

De acuerdo a la señal electroforética obtenida, podríamos sugerir que las conidias de *Trichoderma atroviride* en presencia de CaCl_2 tienden a agruparse y por esto se obtiene un solo pico en el electroferograma. Esto se puede comparar con los resultados obtenidos en otros estudios donde utilizan el Ca^{2+} en análisis electroforéticos de levaduras y bacterias. Como lo reportado por Dziubakiewicz en el 2013, donde evaluó el comportamiento electroforético de bacterias Gram (+) y Gram(-) utilizando iones Ca^{2+} para modificar su carga superficial, observando que bajo estas condiciones las bacterias crean agregados compactos y se presentan menos señales de ruido en los electroferogramas. De igual manera, Rogowska y colaboradores (2018) analizaron el comportamiento electroforético de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando iones Ca^{2+} , reportando la acumulación de células de levadura [Dziubakiewicz *et al.*, 2013; Rogowska *et al.*, 2018].

La posible interacción del CaCl_2 con las células fúngicas podría atribuirse a que la pared celular fúngica está compuesta principalmente por β -glucanos, glicoproteínas y quitina; ésta conformación de la pared celular permite que haya una gran cantidad de grupos funcionales en la superficie, como son los carboxilos, fosfatos y aminas. Debido a los valores de pH utilizados en este

estudio (valor mayor a su pKa), los grupos funcionales de la pared celular fúngica se encuentran desprotonados otorgándoles una carga negativa, favoreciendo la interacción con los iones Ca^{2+} cargados positivamente (Fig. 38). Los carboxilos son reportados por Rogowska y colaboradores (2018) como la principal interacción con los iones Ca^{2+} , por lo que el CaCl_2 podría estar formando pares iónicos con los carboxilos presentes en el β -glucano, componente principal de la pared celular fúngica. [Rogowska *et al.*, 2018].

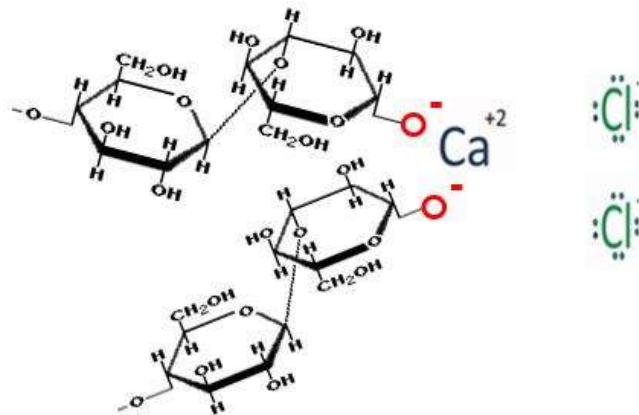


Figura 38. Par iónico formado entre el glucano y el CaCl_2 .

En el mismo estudio realizado por Rogowska y colaboradores (2018), evaluaron el efecto de diferentes valores de pH (6, 8, 9) de la solución de calcio 5mM, con un BGE de TB pH 7.98, indicaron que el pH en la solución de Ca^{2+} sí afecta la movilidad electroforética de las células de levadura disminuyéndola y aumentando la intensidad de la señal, atribuyendo esto a la aglutinación de las levaduras [Rogowska *et al.*, 2018]. En este estudio no se controló el valor de pH en la solución, únicamente la concentración siendo de 8mM y el BGE fue HEPES 20mM a pH 7; a pesar de no controlar el valor de pH, se logró obtener un pico simétrico y bien definido.

Además, mencionan que la mayor reproducibilidad de señales electroforéticas la obtuvieron al utilizar un pH de 9 en la solución de calcio; en nuestro estudio se realizaron repeticiones (Fig. 39) del análisis de la muestra

modificada con los iones Ca^{2+} , obteniendo señales electroforéticas iguales, a pesar de no controlar el pH de la solución de Ca^{2+} , únicamente del BGE, HEPES con un pH de 7; esto podría sugerir que a este valor de pH existe una alta desprotonación de los grupos funcionales que se encuentran en la superficie de pared celular y por lo tanto mayor disponibilidad de sitios de unión de iones, provocando la agregación de las células fúngicas [Rogowska *et al.*, 2018].

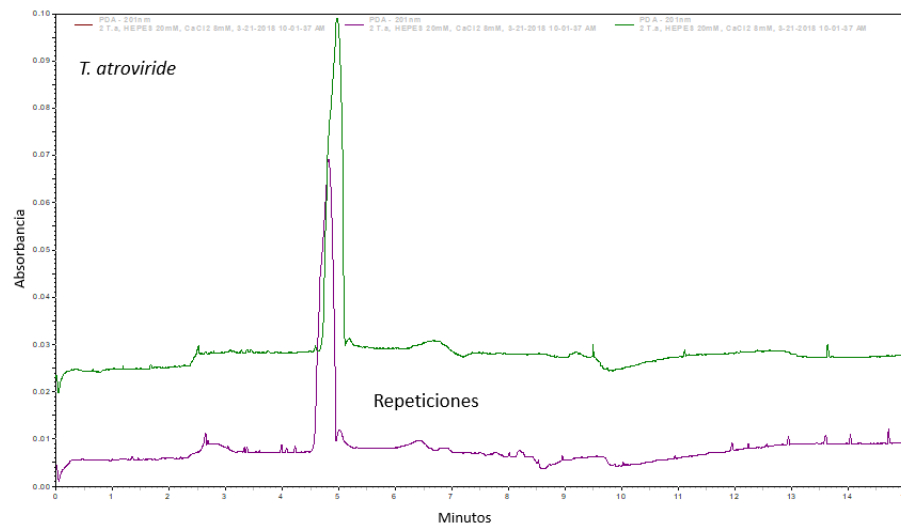


Figura 39. Repeticiones de análisis de la muestra de conidias de *Trichoderma atroviride* con CaCl_2 8mM, BGE HEPES 20mM pH 7.

Al preparar la muestra con $100\mu\text{L}$ de *Trichoderma atroviride* y $300\mu\text{L}$ de CaCl_2 , se observó que en el análisis de la muestra recién preparada no se obtenía una señal en los electroferogramas, por lo que se dejó reposar 24 h y al realizar un nuevo análisis electroforético se logró obtener el mismo pico bien definido y simétrico que se había obtenido en las anteriores muestras analizadas (Fig. 40).

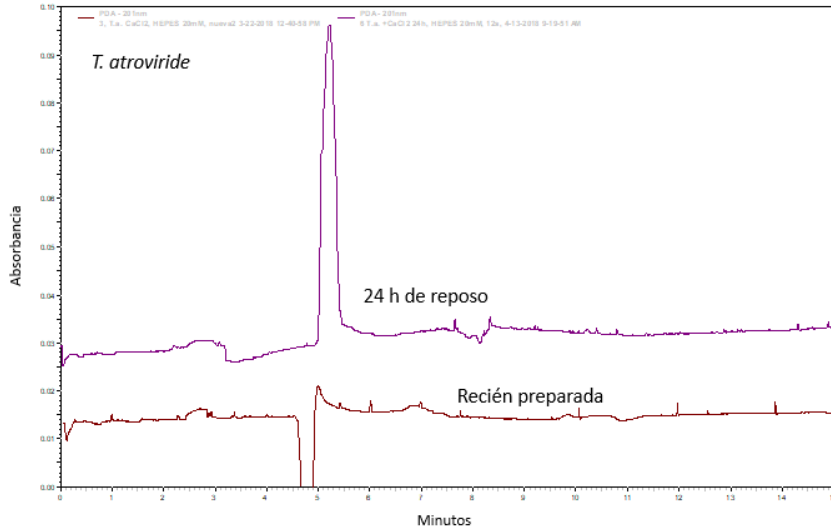


Figura 40. Análisis electroforético de conidias de *Trichoderma atroviride* con CaCl_2 . (a) Recién preparada, (b) 24 h de reposo.

Al observar los resultados obtenidos después del reposo de la muestra por 24h, se realizó el análisis electroforético de la misma muestra en diferentes días (1, 5, 6 y 22) posteriores a su preparación para observar si cambiaba la señal entre más días de interacción entre las células fúngicas y el CaCl_2 (Fig. 41), pudiendo observar que la señal electroforética no presenta un cambio significativo con el tiempo.

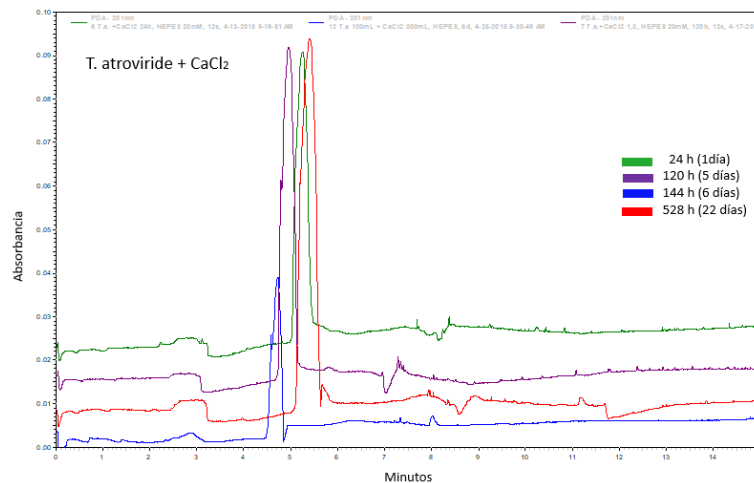


Figura 41. Señales electroforéticas obtenidas en análisis de la misma muestra de *T. atroviride* con CaCl_2 , HEPES 20mM pH 7, a diferentes días posteriores a su preparación.

8.7.1 Efecto del CaCl_2 en el corrimiento electroforético de *Agaricus bisporus*

Al utilizar las mismas condiciones utilizando iones divalentes (CaCl_2) con BGE HEPES 20mM a pH 7, en el análisis del género fúngico *Agaricus bisporus* no se logró obtener una señal electroforética (Fig. 42).

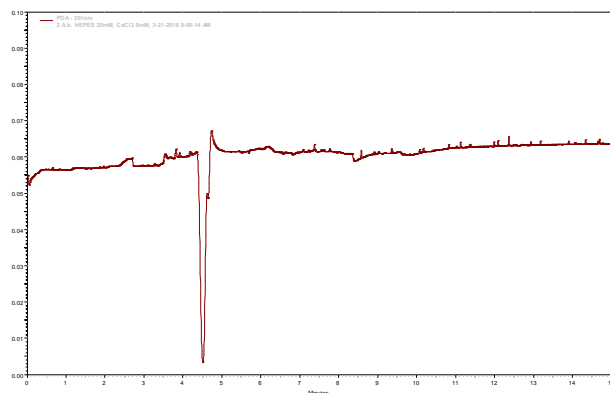


Figura 42. Electroferograma obtenido del análisis de *Agaricus bisporus* con CaCl_2 , BGE HEPES 20mM a pH 7.

Al no obtener una señal, se decidió realizar modificaciones a las condiciones y ahora utilizar TBE como BGE, sin lograr obtener nuevamente una señal electroforética.

Esta ausencia de señales electroforéticas, utilizando las mismas condiciones que en los análisis de conidias de *Trichoderma atroviride*, podría deberse a que la pared celular fúngica de *Agaricus bisporus* está compuesta principalmente por α - y β -glucanos, galactanos, mananos, xilanos, quitina con enlaces N-acetilglucosamina, y en una proporción menor de proteínas y lípidos, además de que sus esporas presentan sobre su pared celular una cubierta con melanina; dicha conformación es semejante a la composición de pared celular del género *Trichoderma*, por lo que cuentan con los mismos grupos funcionales disponibles para la interacción con el CaCl_2 , pero a pesar de dicha semejanza existen estudios que han reportado diferencias químicas estructurales de los polisacáridos que se encuentran en la pared celular entre

variedades de la misma especie de *Agaricus bisporus*, lo que podría ser la causa de que las esporas de *A. bisporus* no interactúen con los iones Ca^{2+} y por lo tanto no se obtenga una señal en los electroferogramas [García-Mendoza, 2000].

Para corroborar la estructura química de la pared, se han realizado pruebas de degradación enzimática utilizando α - y β -glucanasas asociadas con quitinasas, con lo que han logrado comprobar la localización de los polisacáridos dentro de la pared, corroborando las diferencias que ya se habían demostrado [García-Mendoza, 2000].

La pared celular fúngica de *A. bisporus* es una entidad muy dinámica que cambia a lo largo de todos los procesos morfogenéticos citados [Cid *et al.*, 1995].

Otro factor que podría afectar a los componentes de la pared celular fúngica de *A. bisporus* es que sus cultivos se encuentran frecuentemente contaminados por el fitopatógeno *Verticillium fungicola* y tratando de controlar dicha micosis se ha implementado de manera rutinaria la aplicación de fungicidas que afectan tanto al micopatógeno como al hospedero, en este caso *A. bisporus* [García-Mendoza, 2000].

8.7.2 Interacción del CaCl_2 con *T. atroviride* y *A. bisporus* al interior del capilar

Al observar el comportamiento de la mezcla de células fúngicas de *T. atroviride* y *A. bisporus* al interior del capilar (Fig. 44), se pudo observar que las conidias de *T. atroviride* migran en el centro del capilar, de manera conjunta hacia el electrodo negativo, lo que nos indica que están interaccionando con los iones Ca^{2+} , pudiendo corroborar que las señales electroforéticas obtenidas en el equipo de EC si corresponden a la migración y detección de conidias de *T. atroviride*.

Las esporas de *A. bisporus* no presentan movilidad al estar en presencia de los iones Ca^{2+} (flecha azul) lo que puede explicar la ausencia de señales electroforéticas al analizarlo individualmente (Fig. 43).

Esta falta de movilidad electroforética en las esporas de *A. bisporus* podría atribuirse a que los iones Ca^{2+} interactúan con mayor facilidad con los grupos funcionales presentes en su pared celular debido a que existe una mayor superficie para interaccionar al poseer un tamaño de hasta $8.5\mu\text{m}$ por $6.5\mu\text{m}$, neutralizando por completo las cargas de la espora.

Es importante resaltar que en este sistema de microelectroforesis, el capilar se encuentra completamente lleno de la suspensión de células fúngicas y por lo tanto no se produce el FEO, lo que pudiera sugerir que las esporas al ser neutras no pueden migrar. En el caso de las conidias de *T. atroviride*, los iones Ca^{2+} podrían estar interactuando con algunos grupos funcionales proporcionándoles una mayor carga positiva, pero sin neutralizar por completo la carga de la conidia y esto podría deberse a que la conidia, al tener un menor tamaño de 2 a $6\mu\text{m}$, no permite la interacción de los iones Ca^{2+} con todos los grupos funcionales, posiblemente debido a un efecto estérico.

En los análisis realizados en el equipo de EC únicamente se inyecta un plug de muestra, lo que podría ser la causa de obtener un solo pico en el electroferograma, ya que las conidias de *T. atroviride* migran en conjunto.

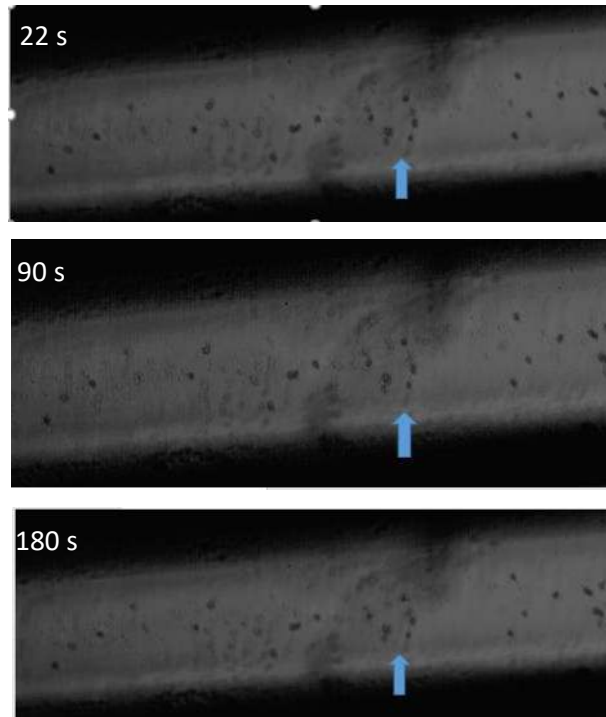


Figura 43. Fotogramas de la interacción de *A. bisporus* y *T. atroviride* en presencia de CaCl_2 8mM, en el sistema de microelectroforesis capilar. Esporas de *A. bisporus* no tiene movilidad electroforética en presencia de CaCl_2 y se sugiere la posible neutralización de células (indicadas con flecha azul).

En el microscopio óptico se analizó la mezcla de células fúngicas de *A. bisporus* y *T. atroviride* en presencia de CaCl_2 ; se observó que en presencia de dicho aditivo las células de ambos géneros fúngicos presentan agregación (Fig. 44), a diferencia de lo que ocurre en el interior del capilar donde las esporas de *A. bisporus* no interaccionan con el CaCl_2 .

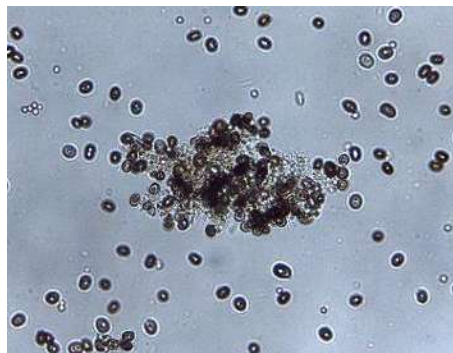


Figura 44. Agregación de células fungicas de *Trichoderma atroviride* y *A. bisporus* en presencia de CaCl_2 , observada en microscopio optico marca Leica 40x.

8.8 Efecto de la concentración de conidias de *Trichoderma atroviride* en el corrimiento electroforético

En la Tabla 13 se muestra el número total de conidias que conforman los volúmenes de suspensión con los que se preparó la muestra a analizar.

Tabla 13. Número total de conidias que contienen las distintas suspensiones.

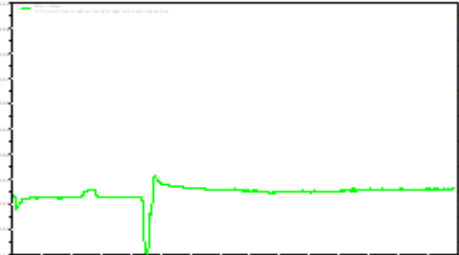
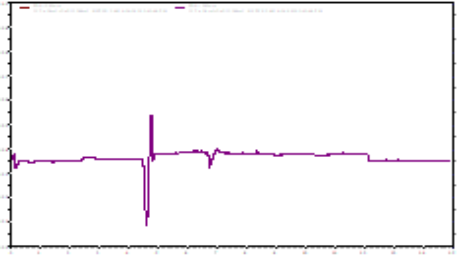
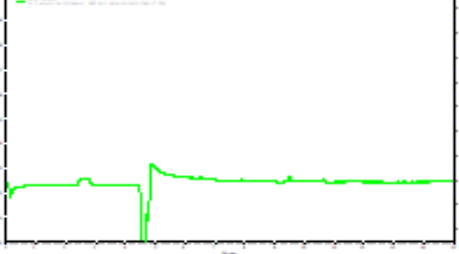
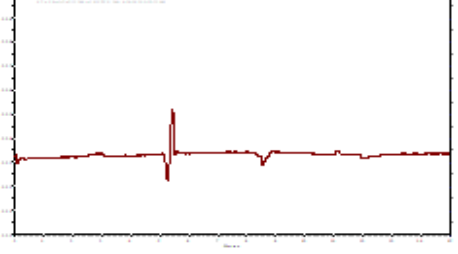
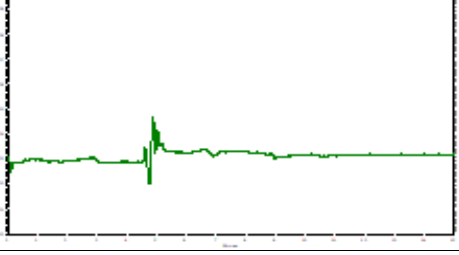
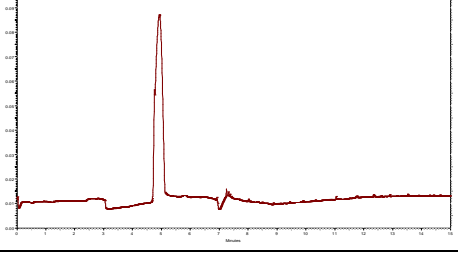
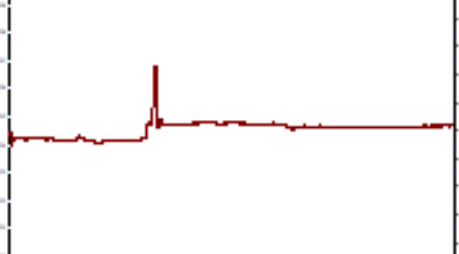

Volumen de suspensión de conidias	Total de conidias en suspensión ($\times 10^6$)
1 μL	22.3
2 μL	44.7
3 μL	67
4 μL	89.4
5 μL	111.7
10 μL	223.5
20 μL	447.1
30 μL	670.7
50 μL	1117.8
100 μL	2235.6
150 μL	3353.4
200 μL	4471.2

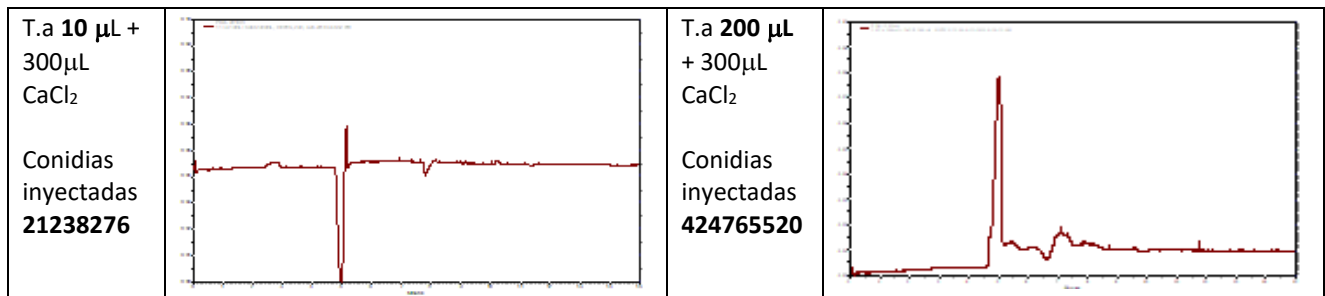
Se realizaron análisis electroforéticos variando la cantidad de conidias de *Trichoderma atroviride* en la muestra, utilizando iones divalentes (CaCl_2). En la tabla 14 se muestran las señales electroforéticas correspondientes a cada uno de los volúmenes utilizados y la cantidad aproximada de conidias que fue inyectada en cada análisis.

Podemos observar en los electroferogramas que el pico correspondiente a cada análisis se presenta en el mismo tiempo de migración, entre 4 y 6 minutos, y que la intensidad de la señal va aumentando conforme aumenta la cantidad de conidias inyectadas, yendo desde los 2 millones que corresponde a 1 μL de suspensión de conidias hasta los 424 millones correspondientes a 200

μL de conidias analizadas. Como se puede observar en la tabla 14 la mejor señal electroforética se obtuvo al utilizar alrededor de 212 millones de células fúngicas. Se puede sugerir que con esta cantidad de conidias existen los grupos funcionales suficientes para que se presente la interacción con la totalidad de los iones Ca^{2+} y se produzca la agregación de todas las células fúngicas, mostrando un pico definido, estrecho y sin ninguna otra señal de alta intensidad en el electroferograma.

Tabla 14. Señales electroforéticas correspondientes a diferente número de conidias en el análisis.

T.a 1 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias Inyectadas 2123827		T.a 30 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias inyectadas 63714828	
T.a 2 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias Inyectadas 4247655		T.a 50 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias inyectadas 106191380	
T.a 4 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias Inyectadas 8495310		T.a 100 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias inyectadas 212382760	
T.a 5 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias Inyectadas 10619138		T.a 150 μL + 300 μL CaCl_2 Conidias inyectadas 318574140	



Con los resultados obtenidos en ese análisis nosotros podríamos sugerir que el número de conidias inyectadas en los análisis electroforéticos posteriores contenga un aproximado de 200 millones de conidias.

IX. RESUMEN DE RESULTADOS

- ✓ El número de conidias que conformaba las suspensiones de las cuatro especies silvestres de *Trichoderma* van desde los 58 millones hasta los 197 millones por μL .
- ✓ El volumen de inyección fue de $0.095\mu\text{L}$ que contenían 1.14×10^6 conidias de *T. harzianum*, y se recuperaron 201267 conidias en el vial de salida por corrimiento electroforético, correspondientes al 17.65%.
- ✓ La suspensión de conidias de *Trichoderma atroviride* analizada por citometría de flujo mostró la viabilidad de la población celular de 91%, y no mostró diferencias en cuanto a granularidad y tamaño celular entre células viables y no viables.
- ✓ El aditivo β -CDs muestra mejorías en las señales electroforéticas de *A. bisporus* y *T. atroviride*, mostrando picos estrechos, definidos y simétricos, sin mostrar diferencias entre géneros fúngicos en la interacción con este tipo de aditivos.
- ✓ Con el aditivo CTAB, las células fúngicas de ambos géneros fúngicos se agrupan sin diferenciar entre géneros fúngicos, mostrando señales electroforéticas sin resolución; en la microelectroforesis se observa que migran en ambos sentidos y en diferentes grupos, pero sin hacer diferencia entre géneros fúngicos.
- ✓ Utilizando como aditivo el Brij 35 las conidias de tres cepas silvestres de *Trichoderma* no se adhieren a la pared interna del capilar y migran individualmente, obteniendo múltiples señales en los electroferogramas.
- ✓ En presencia del CaCl_2 se logró obtener una señal electroforética estrecha, definida y simétrica de conidias de *Trichoderma*, lo que indica la agrupación de células en presencia de dicho surfactante. Las esporas de *A. bisporus* en presencia del CaCl_2 no presentan movilidad electroforética, únicamente agregación celular debido a la posible neutralización de cargas presentes en su pared celular, mostrando las diferencias estructurales entre los dos géneros fúngicos.

X. CONCLUSIÓN

La movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma atroviride* y esporas de *Agaricus bisporus* presenta cambios al interactuar con aditivos como selectores quirales, surfactantes, presentando un mayor efecto en la movilidad al utilizar sales como CaCl_2 en el buffer de corrimiento, mostrando diferenciación entre las células de cada género fúngico.

XI. PERSPECTIVAS

- ❖ Utilizar aproximadamente 200 millones de conidias inyectadas en los corrimientos electroforéticos.
- ❖ Pruebas con diferentes tipos de buffer en el análisis de células de diferentes géneros fúngicos.
- ❖ Probar diferentes concentraciones de aditivos como β -CDs en el buffer de corrimiento.
- ❖ Cambiar la concentración de CaCl_2 y controlar el pH de la solución.
- ❖ Comparar las señales electroforéticas obtenidas al adicionar otros iones divalentes en el buffer de corrimiento o directamente en la muestra.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcon S., 2012. Buffer de Aguas Naturales. Manual de Modulo Experimental II. Universidad Mayor de San Simon. Colombia. 6
http://www.academia.edu/9246078/Capacidad_Buffer. Consultado 15 Junio 2016.
- Argumedo-Delira, R., Alarcon A., Ferrera-Cerrato R., Peña-Cabriales, JJ. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de Contaminación Ambiental*. UNAM. 25(4):257-269.
- Armstrong DW, Schneiderheinze JM. 2000. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE. *Analytical chemistry*; 72(18):4474-6.
- Badii, M.H., H. Rodríguez, E. Cerna, J. Valenzuela, J. Landeros & Y. Ochoa. 2013. Coevolución y Mutualismo: Nociones Conceptuales. *Daena: International Journal of Good Conscience*. 8(1)23-31.
- Balajee SA., Marr KA. 2002. Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(8):2741-5.
- Bao Y, Lantz AW, Crank JA, Huang J, Armstrong DW. 2008. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 29(12):2587-92.
- Blumenthal CZ. 2004. Producción de metabolitos tóxicos en *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, y *Trichoderma reesei*: justificación de las pruebas de micotoxinas en los preparados de enzimas de calidad alimentaria derivados de los tres hongos. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39: 214-228
- Bowman SM, Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell Wall. *BioEssays*. 28:799-808.
- Bradner JR., Nevalainen KM., 2003. Metabolic activity in filamentous fungi can be analysed by flow cytometry. *Microbiol Methods* 54(2):193-201.
- Calderón CV. 2007. Síntesis, caracterización, propiedades y aplicaciones de nuevas poliamidas aromáticas con Subestructuras Benzoeter corona y benzopodandos en la cadena lateral. Tesis Doctoral. Universidad de Burgos.
- Camacho YP. 2012. Crecimiento de *Agaricus bisporus var. portobello* sobre residuos agrícolas de Yucatan. Tesis profesional. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán, México. Publicada 27 de junio de 2012.

Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The Fungi. 2a ed. CA,USA: Academic Press.

Casado-Rio M. 2014. Aplicaciones de la electroforesis capilar en el estudio de errores congénitos del metabolismo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.

Castagnino JM. 1997. Electroforesis capilar. Bioquímica y fisicoquímica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. (33)297-329.

Castagnino JM. 2000. Electroforesis capilar. Bioquímica.; 25(1):13-32, 13-16, 28-29.

Castillo W., Robinson VA. 2017. Determinación de Ocratoxina A en maíz y productos derivados comercializados en la Ciudad de Morelia Michoacán. Avances de la Ciencia en México. Centro de Investigaciones en Óptica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cázares García SV. 2009. Movilidad electroforética de células fúngicas. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cázares García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de licenciatura en Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cifuentes EC. 2009. Estudio termodinámico y estructural de los complejos de inclusión luteolina-ciclodextrinas. Tesis de licenciatura. Universidad de Chile.

Cossette B., Smoragiewicz W., Boutard A., Bouchard G. 1992. Detección de micotoxinas tricotecenales. Trabajo y salud. 8, (1), 2-6.

Cruces C. 1998. Electroforesis capilar. Monografías. Ciencia y tecnología. Universidad de Almería.

De Bary, H.A. Die Erscheinung der Symbiose (Karl J. Trubner, Strasburg. 1879. citado en inglés en Relman, D.A. "Till death do us part": coming to terms with symbiotic relationships. Nature Reviews Microbiology 6, 721-724 (2008)

Desai, MJ, y Armstrong, DW. 2003. Separación, identificación y caracterización de microorganismos por electroforesis capilar. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 67 (1), 38-51. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.38-51.2003>

Díaz Murillo, H, & Pedemonte Campos, C. 2013. Aparición de Melanina como Pigmento Protector en el Encéfalo de *Xenopus laevis* para Protegerlo de los Efectos de la Radiación Ultravioleta. *International Journal of Morphology*, 31 (3), 1120-1123.

Dziubakiewicz E, Buszewski B. 2014. Capillary electrophoresis of microbial aggregates. *Electrophoresis*. 35:1160–1164.

Egbuta, MA, Mwanza, M., y Babalola, OO. 2017. Riesgos para la salud asociados con la exposición a los hongos filamentosos. *Revista Internacional de Investigación Ambiental y Salud Pública* , 14 (7), 719.

Ehgartner, D., Herwig, C., y Fricke, J. 2017. Análisis morfológico del hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* utilizando citometría de flujo: la alternativa más rápida al análisis microscópico de imágenes. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 101 (20), 7675-7688.<http://doi.org/10.1007/s00253-017-8475-2>

Fischer R, Kües U. 2006. Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. In: Esser K, editor. *The Mycota*. 2da ed. New York, EUA: Springer. 263-92.

Gallegos-Núñez CJ. 2016. Efecto de distintos tipos de buffer de corrimientos sobre la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma spp*. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

García Aguilar L. 2009. Determinación de las características electroforéticas de células miceliales. Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Gasper MP., Berthod, A., Nair BU., Armstrong DW. 1996. Comparison and Modeling Study of Vancomycin, Ristocetin A, and Teicoplanin for CE Enantioseparations. *Analytical Chemistry*. 68, 2501-2514.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2:43-56

Hayes MA, Kheterpal I, Ewing AG. 1993. Effects of buffer pH on electroosmotic flow control by an applied radial voltage for capillary zone electrophoresis. *Analytical chemistry*. 65(1):27-31.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111:509-47.

Horka M, Ruzicka F, Kubesova A, Hola V, Slais K. 2009. Capillary electrophoresis of conidia from cultivated microscopic filamentous fungi. *Analytical chemistry*. 81(10):3997-4004.

Horka M, Kubesova A, Salplachta J, Zapletalova E, Horky J, Slais K. 2012. Capillary and gel electromigration techniques and MALDI-TOF MS--suitable tools for identification of filamentous fungi. *Analytica chimica acta*. 716:155-62.

Hoyos-Carbajal L, Bissett J. 2011. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. In: Grillo O, Venora G, editors. The Dynamical processes of biodiversity-Case studies of evolution and spatial distribution. 1a ed. Rijeka, Croacia: In Tech. 303-20.

Jaklitsch WM. 2009. Especies europeas de *Hypocrea*. Parte I. Las especies verdes spored. *Studies Mycology* 63: 1-91

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ. 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443:818-22.

Klein D, Eveleigh DE. 2002. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, editors. *Trichoderma and Gliocadium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Pennsylvania, EUA: Taylor and Francis. 57-74.

Kuhn R., Wagner J., Walbroehl Y., Bereuter T. 1994. *Electrophoresis*. 15, 828-834.

Kuo, M. 2018. *Agaricus bisporus*. Retrieved from the MushroomExpert.Com Web site: http://www.mushroomexpert.com/agaricus_bisporus.html. Consultado 12 julio 2018.

Latge JP. 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology*. 12(7): 863-873.

Leyva E., Moctezuma E., Leyva R., Oros S. 2004. Estudio de los complejos de inclusión de ácido nalidíxico y ácido oxolínico con ciclodextrinas. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 48:189-195.

Li, Y. 2012. Present, development situation and tendency of edible mushroom industry in China. In: Zhang, J., H. Wang, M. Chen, (eds.), *Mushroom Science*. China Agriculture Press. 3-9.

López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares R. 2006. *Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 2ª edición ed. México, D.F.: Editorial Trillas; 192.

Luna T, Cabarcas A. 2013. Orgánicamente funcional. Éteres Corona. <http://organicamentefuncional.blogspot.mx/2013/04/eteres-corona.html>. Consultado el 18 de abril del 2017

Lynch J.M., Wilson K.L., Ousley M.A. y Whipps J.M. (1991). Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 12, 59-61.

Manson RH., Hernandez-Ortiz V., Gallina S., Mehltreter K. 2008. Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz. *Biodiversidad, Manejo y Conservación*. Capítulo 14. 193.

Marsán Suarez V., Del Valle Pérez L., Díaz Dominguez G., Macías Abraham C. 2015. Metodología y aplicaciones de la citometría de flujo para el inmunofenotipaje de

las leucemias agudas. Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter. 31(3): 242-253.

Mata G. 2010. Campos de estudio de la micología: El cultivo de los hongos comestibles, un ejemplo de micología aplicada. Actualidades Micología Medica. Editorial de la Facultad de Medicina, UNAM. Quinta edición. Mexico D.F. 39-45.

Martí-Sole MC., Alonso RM., Constans-Aubert A. 1999. NTP 351: Micotoxinas (aflatoxinas y tricotecenos) en ambientes laborales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Martínez B., Infante D., Reyes Y. 2013. *Trichoderma spp* y su función en el control de plagas en los cultivos. Revista de Protección Vegetal. [Internet]. [citado 2017 Abr 13]; 28(1):1-11. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es

Martínez-Carrera, D., M. Bonilla, W. Martínez, M. Sobal, A. Aguilar, E. Pellicer-González, 2001. Characterization and cultivation of wild *Agaricus* species from México. Micología Aplicada Internacional 13 (1): 9-24.

Martínez G., Gómez MA. 2007. Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, C.S.I.C. Revista Iberoamericana de Polimeros. 8(4). 301-312.

Mesquita N., Portugal A., Piñar G., Loureiro J., Coutinho AP., Trovao J. 2013. Flow cytometry as a tool to assess the effects of gamma radiation on the viability, growth and metabolic activity of fungal spores. ELSEVIER. 84:250-257.

Mellado E, Cuenca-Estrella M. 2002. Importancia clínica de los mecanismos de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 20(10):523-30.

Miki BLA, Poon NH, James AP, Seligy VL. 1982. Posible mecanismo para las interacciones de floculación gobernadas por el gen FLO1 en *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. 150 : 878-889.

Muñoz-Celaya AL., Ortiz-García M., Vernon-Carter EJ., Jauregui-Rincón J., Galindo E., Serrano-Carreón L. 2012. Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. ELSEVIER. 88:1141-1148.

Muñoz-Celaya AL., Meneses A., Tinoco R., Galindo E., Serrano-Carreón L. 2015. Cuantificación de la viabilidad y del daño celular en esporas de *Trichoderma harzianum*, secadas por aspersión, mediante citometría de Flujo. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad de Aguascalientes.

Ortuño, Noel, Miranda, Claudia, & Claros, Mayra. (2013). Selección de cepas de *Trichoderma spp.* generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(1), 16-32.

Osatinsky R., 2007. ¿Qué es la electroforesis capilar?. *Revista Bioquímica y Patología Clínica*. Asociación Bioquímica Argentina 71(2) 60-66.

Pineda-Rey A.M. 2017. Utilidad de las ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico. Trabajo de fin de grado. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 7-9.

Preston, J., Mark, H. F., Bikales, N. M., Overberger, C.G., Menges G., Wiley. 1998. Aromatic Polyamides en *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. 2º edn. Vol 11.

Ponton J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*. (25):78-82.

Ramirez O.L., Urrego F.A. 2013. Producción de celulosas a partir del hongo *Trichoderma sp* y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo. *Ingeniería en Alimentos*.

Ranque S, Garcia-Hermoso D, Michel-Nguyen A, Dumon H. 2008. Isolation of *Trichoderma atroviride* from a liver transplant. *Journal de Mycologie Medicale*. (8):234-236.

Rivera A. 2017. Cuantificación de beta-glucanos en diferentes especies de hongos: Hongo Robellón (*Lactarius deliciosus*), Hongo Blanco (*Boletus edulis*), Champiñón (*Agaricus bisporus*) y Shiitake (*Lentinus edodes*) y cuantificación de arabinosilanos en malta y bagazo de cerveza. Tesis de Maestría. Universidad de Girona.

Robinson Fuentes VA. 2006. Introducción a la Electroforesis capilar. Michoacán, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Pp 33, 34.

Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M., Railean-Plugaru, V., Król, A., Rafińska, K., Buszewski, B. 2018. The influence of different pH on the electrophoretic behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* modified by calcium ions. *Journal Scientific Reports-Nature*, 8, 7261.

Romero-Arenas O., Huerta M., Damian MA., Dominguez F., Arellano DA. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(2):143-151.

Salazar-Alcantar LY. Influencia de surfactantes en la movilidad electroforética de conidias de *Trichoderma* spp. 2015. Tesis de Licenciatura en QFB. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

Schwartz H, Guttman A. 2004. Separation of DNA by Capillary Electrophoresis. Beckman instruments, Inc. Palomal Analytical Services. Redwood city. Pp 1-15.

Salmones D., Ballesteros-Hernandez H., Zulueta R., Mata G. 2012. Determinación de las características productivas de cepas mexicanas silvestres de *Agaricus bisporus*, para su potencial uso comercial. Revista mexicana de micología, 36, 9-16. Recuperado en 17 de julio de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802012000200003&lng=es&tlng=pt.

Sandoval-Vega M., Noelting-Zenobio M. 2011. Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* rifai en dos medios de multiplicación. Fitosanidad. 15(4): 215-221.

Santa Cecilia Motilva B. 2014. Estudios sobre las hidrofobinas de clase II. Tesis fin de Grado. Universidad de Zaragoza. <http://zaguan.unizar.es/record/15002?ln=es#>

Saravanakumar K., Kathiresan k. 2014. Bioconversion of lignocellulosic waste to bioethanol by *Trichoderma* and yeast fermentation. 3 Biotech. 4(5): 493-499

Seguin P, Degeih B, Grulois I, Gacouin A, Maugendre S, Dufour T, Dupont B, and Camus C. 1995. Successful treatment of brain Abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after Surgical Resection. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (14):445-448.

Sivan A, Chet I. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. Journal of General Microbiology. 135:675-682

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2001. Principios de análisis instrumental. Capítulo 30. Electroforesis capilar y electrocromatografía. 5ª. ed Madrid, España: McGraw-Hill. Pag. 847

Stefanova, M., Leiva, A., Larrinaga, L., y Coronado, M.F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Revista Facultad de Agronomía (Luz) 16:509-516

Stratford M. 1989. Floculación de levadura: Especificidad del calcio. Levadura. 5 : 487-496.

Taxonomy ISoTaG. Viena, Austria 2013 [cited 2013 abril]; Available from: <http://isth.info/>. Fecha de consulta. 29/junio/2016

Vanhauteghem D., Demeyere K., Callaert N., Boelaert A., Haesaert G., Audenaert K., Meyer E. 2017. Flow Cytometry Is a Powerful Tool for Assessment of the Viability of Fungal Conidia in Metalworking Fluids. *Applied and environmental microbiology*. 1;83(16).

Villegas MA. 2005. *Trichoderma* Pers. Características generales y su potencial biológico en la agricultura sostenible. Orius Biotecnología. Colombia. (Consultado: 28 oct 2008). Disponible en: <http://www.oriusbiotecnologia.com/site/index.php?id=20,66,0,0,1,0> .

Walker, L., Sood, P., Lenardon, MD, Milne, G., Olson, J., Jensen, G. 2018. Las propiedades viscoelásticas de la pared celular fúngica permiten el tránsito de AmBisome como vesículas liposómicas intactas. *mBio* ,9 (1), e02383-17. <http://doi.org/10.1128/mBio.02383-17>

Wiater A, Szczodrak J, Pleszczyńska M. 2005. Optimización de las condiciones para la producción eficiente de *Streptococcus mutans* en cultivos de estreptococos y líquidos post-cultivo. *Acta Biologica Hungarica* 56: 137-150