



**Universidad Michoacana de  
San Nicolás de Hidalgo**  
*Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas*  
*“Dr. Ignacio Chávez”*  
*División de Estudios de Posgrado*

“ANÁLISIS DE CONIDIAS DE DIFERENTES CEPAS DE  
*Trichoderma spp* POR ELECTROFORESIS CAPILAR”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Maestro en Ciencias de la Salud**

PRESENTA:

**Q.F.B. JOSE LUIS AVILA QUINTERO**

DIRECTORA DE TESIS:

**D.C. VIRGINIA ANGELICA ROBINSON FUENTES**

MORELIA, MICHOACAN. AGOSTO DE 2013.



En el presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo Analítico, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, bajo la asesoría de la D.C. Virginia Angélica Robinson Fuentes.

Agradezco a la Coordinación de la Investigación Científica (CIC), al Consejo Estatal de Ciencia y tecnología (CECTI, antes COECYT) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la ayuda económica brindada para poder realizar el presente trabajo de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A mi padre *Amparo Avila Reyes* por estar al pendiente siempre de mí y nunca dejarme solo, gracias por todos los recuerdos y todos los consejos que nunca olvidaré.

A mi tía *Norberta Avila Reyes* por haberme cuidado de niño y darme ese calor materno que tanto necesitaba en esos tiempos.

A la familia *Martínez González* por creer en mí y sacarme adelante incluyéndome en su familia, gracias por esta valiosa herencia que ahora me dan que es una profesión la cual ejerceré con honestidad y constancia, sinceramente sin ellos esto no sería posible.

A la *D.C Virginia Angélica Robinson Fuentes* por permitirme continuar la investigación en su laboratorio y por su constante asesoramiento tanto en la instrumentación como en el desarrollo del presente trabajo.

A la *M.C. Saila Viridiana Cázares García* por instruirme de una forma clara y compartir sus metodologías conmigo, si hubiese tenido una instructora como ella antes la tesis habría sido más sencilla de hacer, más rápida y más amplia.

A la *D.C. Consuelo de Jesús Cortés Penagos* por el gran apoyo que me ha brindado y la oportunidad de realizar investigaciones en su laboratorio, pues gracias a ella tengo bases sólidas en microbiología, indudablemente sin su ayuda no estaría tan preparado como lo estoy ahora.

## INDICE

<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>11</b>
<b>II. MARCO TEORICO.....</b>	<b>14</b>
2.1 MICOLOGIA.....	14
2.1.1 Importancia de los hongos.....	14
2.1.2 Objeto de estudio.....	14
2.1.3 <i>Trichoderma</i> .....	15
2.1.3.1 Taxonomía de <i>Trichoderma</i> .....	15
2.1.3.2 Morfología.....	16
2.1.3.3 Nutrición.....	17
2.1.3.4. Ecología de <i>Trichoderma</i> .....	17
2.1.3.5 Ciclo de vida de <i>Trichoderma</i> .....	18
2.1.3.6 Conidias de <i>Trichoderma</i> .....	19
2.1.3.7 Importancia del estudio de <i>Trichoderma</i> .....	21
2.1.3.8 Identificación.....	21
2.2 ELECTROFORESIS CAPILAR.....	23
2.2.1 Antecedentes.....	23
2.2.2 Generalidades.....	23
2.2.3 Componentes de un sistema de EC.....	24
2.2.4 Factores que causan movilidad en los analitos.....	25
2.2.5 Características del buffer de corrimiento.....	26
2.2.6 Orden de migración de analitos.....	26
2.2.7 Aplicaciones.....	27
2.3 ELECTROFORESIS CAPILAR APLICADA A CELULAS INTACTAS.....	27
2.3.1 Investigación en células fúngicas intactas.....	28
2.3.2 Antecedentes en el Laboratorio de Desarrollo Analítico.....	30

<b>III. JUSTIFICACION.....</b>	<b>31</b>
<b>IV. HIPOTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
<b>VI. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>33</b>
6.1 MATERIALES.....	33
6.2 EQUIPO Y ACONDICIONAMIENTO DE CAPILAR.....	33
6.3 MORFOLOGIA Y CINETICAS DE CRECIMIENTO.....	35
6.4 DETERMINACION DE SEÑALES ELECTROFORETICAS.....	35
6.5 MIGRACION DE CONIDIAS.....	35
6.6 TIPO DE BUFFER.....	35
6.7 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y pH.....	35
6.8 EFECTO DEL VOLTAJE.....	36
6.9 PRUEBAS DE VIABILIDAD.....	36
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>37</b>
7.1 MORFOLOGIA Y CINETICAS DE CRECIMIENTO.....	37
7.2 DETERMINACION DE SEÑALES ELECTROFORETICAS .....	39
7.3 MIGRACION DE CONIDIAS.....	40
7.4 TIPO DE BUFFER.....	42
7.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y pH.....	44
7.6 EFECTO DEL VOLTAJE.....	47
7.7 PRUEBAS DE VIABILIDAD.....	49
<b>VIII. RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>54</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Trichoderma</i> .....	16
Tabla 2. Antecedentes de la técnica de EC.....	23
Tabla 3. Reactivos usados en la preparación de soluciones buffer.....	33
Tabla 4. Acondicionamiento inicial del capilar.....	34
Tabla 5. Lavado del capilar cada 3 corridas.....	34
Tabla 6. Lavado final del capilar.....	34
Tabla 7. Método utilizado para los corrimientos electroforéticos .....	34
Tabla 8. Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación.....	38

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Morfología de <i>Trichoderma atroviride</i> .....	13
Fig. 2. Micrografía electrónica de conidia de <i>T. saturnisporus</i> .....	15
Fig. 3. Componentes de un sistema de EC.....	20
Fig. 4. Factores que causan movilidad de los analitos.....	22
Fig. 5. Orden de migración de analitos.....	23
Fig. 6. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas de estudio.....	33
Fig. 7. Corrimientos electroforéticos de diferentes muestras.....	35
Fig. 8. Espectro de luz UV de analitos.....	36
Fig. 9. Electroforesis capilar acoplada a microscopio.....	37
Fig. 10. Efecto del tipo de buffer en voltaje positivo sobre las señales de conidias	38
Fig. 11. Efecto del tipo de buffer en voltaje negativo sobre las señales de conidias	39
Fig. 12. Efecto de la concentración del buffer sobre la corriente.....	39
Fig. 13. Efecto de la concentración de buffer en voltaje positivo sobre las señales	40
Fig. 14. Efecto de la concentración de buffer en voltaje negativo sobre las señales	41
Fig. 15. Efecto del pH del buffer en voltaje positivo sobre las señales de conidias	41
Fig. 16. Efecto del pH del buffer en voltaje negativo sobre las señales de conidias	42
Fig. 17. Efecto del voltaje sobre las señales de conidias.....	43
Fig. 18. Separación individual y en mezcla con voltaje positivo.....	44
Fig. 19. Separación individual y en mezcla con voltaje negativo.....	44
Fig. 20. Pruebas de viabilidad.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

CMU	Cepario Michoacano Universitario
CZE	Electroforesis capilar de zona
di	Diámetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Electroforesis capilar
FEO	Flujo electroosmótico
IBC	Congreso Internacional Botánico
ICBN	Código Internacional de Nomenclatura Botánica
ISTH	Subcomisión Internacional sobre Taxonomía de <i>Trichoderma</i> e <i>Hypocrea</i>
kV	Kilovoltio
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{A}$	Microamperes
$\mu_{\text{ap}}$	Movilidad electroforética aparente
MEA	Agar extracto de malta
$\mu_{\text{ep}}$	Movilidad electroforética
$\mu\text{m}$	Micrómetro
mM	Milimolar
PDA	Agar papa dextrosa
PEO	Oxido de polietileno
UV	Ultravioleta
$v$	Velocidad electroforética
$\zeta$	Potencial zeta

## RESUMEN

**Introducción:** La pared celular representa de 15-30% en peso seco de los hongos, da forma y protección contra daños físicos; está formada por proteínas, glucanas, melanina y quitina, estos componentes a un pH determinado ocasionan la presencia de cargas eléctricas en la superficie celular; las células fúngicas son anfóteras ya que a pH alto tienen carga neta negativa, pero en pH bajo tienen carga neta positiva; para poder estudiar la carga de superficie existen métodos basados en electroforesis capilar, en donde los analitos migran en un campo eléctrico dentro de un capilar de sílice debido a su movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) y por el flujo electroosmótico (FEO); la información encontrada permitirá comprender más a detalle las propiedades eléctricas de pared celular que participan en el fenómeno de atracción/repulsión, así como brindar una herramienta analítica mediante caracteres electroforéticos. **Objetivos:** analizar y caracterizar las conidias de diferentes cepas de *Trichoderma* mediante EC. **Materiales y Métodos:** se utilizó un capilar de sílice fundida de 50 cm de longitud y 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, las señales fueron leídas a una  $\lambda$  de 201 nm; se utilizaron las conidias de la cepa de referencia *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y de las cepas silvestres *Hypocrea lixii* CMU-1, *T. gamsii* CMU-8, *H. rufa* CMU-218 y *T. tomentosum* CMU-221, todas obtenidas del Cepario Michoacano Universitario perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología de Microorganismos del CMEB; las cepas fueron sembradas en agar Vogel e incubadas a 28° C durante 120 h, se colectaron las conidias y fueron lavadas con H<sub>2</sub>O destilada estéril para eliminar restos de micelio, agar y metabolitos; las diferentes condiciones electroforéticas ensayadas incluyeron el uso de soluciones buffer fosfato de potasio, MOPS, HEPES, MES y Tricina, en diferentes concentraciones y valores de pH; también se ensayó el uso de voltajes positivos y negativos. **Resultados:** Las 5 cepas utilizadas presentaron una morfología y tiempo de conidiación muy diferentes entre sí; las conidias presentaron una carga eléctrica neta de superficie negativa y migraron del polo positivo al polo negativo debido al FEO; las mejores condiciones en voltaje positivo fueron fosfato de potasio 10 mM, pH de 8.0 y (+)20 kV, con estas condiciones se encontraron señales poco eficientes pero reproducibles; las mejores condiciones en voltaje negativo fueron fosfato de potasio 20 mM, con pH de 6.8 y voltaje de (-)17 kV, se obtuvo una señal muy eficiente correspondiente a una molécula de pared celular, posiblemente melanina, esta señal fue observada en las 5 cepas estudiadas; las conidias de las 5 cepas mantuvieron su viabilidad después del proceso electroforético. **Conclusiones:** con estos resultados se propone utilizar a la molécula encontrada en voltaje negativo para la identificación de grupos de hongos.

## **ANALISIS DE CONIDIAS DE DIFERENTES CEPAS DE *Trichoderma spp.* POR ELECTROFORESIS CAPILAR**

### **I. INTRODUCCION**

Desde los comienzos de la humanidad, el hombre ha estado estrechamente relacionado con los hongos tanto macroscópicos como microscópicos; los hongos macroscópicos han tenido un importante peso en las diferentes culturas, siendo algunos de ellos utilizados como sustancias enteógenas en sus ritos, otros usados como alimento y algunos otros como veneno para causar la muerte a sus rivales, estos hongos debido a que presentan una morfología macroscópica han podido ser fáciles de reconocer, en torno a ellos se han creado muchas historias y mitos que han hecho del reino Fungi, un reino fantástico y misterioso. Por otra parte, los hongos microscópicos debido a su tamaño han sido más difíciles de reconocer pero han acompañado al ser humano a lo largo de su historia, ya sea fermentando sus cereales y frutos para producir bebidas alcohólicas empleadas en festejos en las diferentes culturas; otros ocasionándole diferentes infecciones e intoxicaciones al ser humano; algunos otros dañando los cultivos, generando así cambios en la dieta alimenticia de algunos pueblos e incluso ocasionando migraciones en masa debido a las hambrunas (1).

Como consecuencia de la invención del microscopio por Anton van Leeuwenhoek y los avances en microbiología por parte de Luis Pasteur, fue posible conocer mejor a estos seres; actualmente los hongos microscópicos son conocidos por causar infecciones de moderadas a graves y con alta tasa de mortalidad, donde un diagnóstico rápido puede aumentar las posibilidades de supervivencia de los pacientes afectados; otros llegan a producir toxinas en los alimentos; muchas de las conidias producidas por hongos microscópicos llegan a producir alergias, siendo los principales agentes alergénicos presentes en el polvo. Aunque también desde este mismo punto de vista antropocéntrico, pueden ser vistos de una forma positiva, ya que de ellos se obtienen muchos antibióticos utilizados para contrarrestar infecciones bacterianas, también son muy utilizados en la obtención de aditivos alimenticios, entre ellos está el ácido cítrico, diferentes enzimas, hormonas y vitaminas; otros usados en la fermentación de diferentes bebidas alcohólicas, además muchos de ellos por sus propiedades micoparásitas, son utilizados como biocontrol de hongos fitopatógenos en diferentes cultivos. El papel que tienen los hongos microscópicos en los ecosistemas también es muy importante, ya que ellos participan como degradadores de materia orgánica muerta, también como biocontrol evitando la sobrepoblación de otras especies, tienen una importante interacción con las plantas, algunos como mutualistas otros como parásitos, además de muchas otras funciones que aún no se han descubierto (2-4).

Para estudiar a los hongos microscópicos se emplean diferentes técnicas, tradicionalmente para identificarlos se requiere de estudiar su morfología tanto macroscópica como microscópica, actualmente las técnicas moleculares generan

más certeza y existen bancos de datos en internet para comparar los resultados obtenidos mediante secuenciación; otras técnicas mediante inmunoensayos permiten conocer más a detalle la variedad de enzimas con que cuentan los hongos en estudio; ahora bien, si lo que se quiere son los metabolitos secundarios, hay que apoyarse de técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con la que se pueden aislar, identificar y cuantificar estas sustancias; ahora que si lo que se quiere es conocer propiedades eléctricas de la pared celular, una técnica prometedora para este estudio es la Electroforesis Capilar (EC), ya que mediante las movilidades de las células en un campo eléctrico debidas a su relación carga/masa, se pueden obtener diferentes parámetros y así conocer más a detalle el comportamiento eléctrico de pared celular de estos seres (4-6).

Los hongos microscópicos son ubicuos, existe una gran variedad de muestras en las que pueden estar presentes: muestras clínicas, de suelo, de cultivos agrícolas, de alimentos, de biofilms, entre muchos otros; es importante considerar el tipo de muestra que se quiere estudiar pues de sus propiedades depende el tratamiento que se le dará para recuperar al analito sin interferencias de los componentes presentes en la matriz de la muestra (7, 8).

Un hongo microscópico de amplia distribución es *Trichoderma*; típicamente se encuentra en suelo y madera en descomposición, es un hongo muy estudiado ya que tiene una gran capacidad de metabolismo, también presenta una agresividad competitiva contra otros seres vivos en los diferentes ecosistemas, es un excelente aliado en los cultivos agrícolas pues aporta fitohormonas que ayudan en el crecimiento de las plantas, las protege contra bacterias al secretar antibióticos tanto locales como aéreos, las protege de hongos mediante su propiedad micoparásita; en estudios de biorremediación de ecosistemas dañados con hidrocarburos presenta un bajo nivel de biodegradación pero suficiente para apoyar al medio ambiente, posee una importancia económica por la obtención a gran escala de celulasas utilizadas en procesos industriales. Una desventaja es el micoparasitismo que producen en hongos de importancia comercial, como lo son los géneros *Pleurotus* y *Agaricus* (3, 9, 10).

Diversos grupos de investigación multidisciplinaria tienen muy bien estudiado a *Trichoderma*; cabe señalar que en las taxonomías clásicas mediante morfología macro y microscópica se había descrito a *Trichoderma* como un hongo anamorfo (que presenta fase asexual), posteriormente se observó que su teleomorfo (que presenta fase sexual) correspondía con las descripciones del género *Hypocrea*; en las clasificaciones taxonómicas actuales en base a caracteres moleculares, *Trichoderma* e *Hypocrea* pertenecen a una misma taxa a nivel de género; existen bases de datos muy completas con información de *Trichoderma* e *Hypocrea*, que incluye secuencias de nucleótidos, lista de enzimas, dendogramas, metabolómica, entre otros datos, todos ellos obtenidos mediante diferentes técnicas de estudio. Siendo más destacadas las pruebas morfológicas y moleculares (11).

Una cantidad importante de información se ha obtenido apoyándose en técnicas instrumentales, una de ellas el HPLC y en los últimos años, el empleo de Electroforesis Capilar (EC); esta última técnica permite conocer la importancia de las cargas eléctricas de superficie, en este caso de hongos microscópicos; según el valor de la carga neta de superficie, las células pueden adherirse o repelerse de otras células o de superficies (4, 11, 12).

Las cepas de *Trichoderma* tienen la ventaja de ser de rápido crecimiento, abundante conidiación y que la composición química de su pared celular es muy parecida a la de la mayoría de los ascomicetos filamentosos; la utilidad de realizar estos estudios es para buscar nuevas formas de identificación, cuantificación y comprensión de sus propiedades de atracción/repulsión, con esta técnica se obtendrán resultados en cortos tiempos de análisis, de manera económica y con buena sensibilidad.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1 MICOLOGIA

El término micología es una palabra compuesta por el prefijo mico- (del griego "mykes" que significa seta) y el sufijo -logía (del griego "logos", que significa tratado), es la ciencia que se encarga de estudiar a los hongos, estos organismos son eucariontes, heterótrofos, se alimentan mediante una digestión externa y posterior ingestión de nutrientes mediante absorción, contienen una pared celular conformada principalmente por glucanas, glicoproteínas y quitina; este último polisacárido está presente en todos los organismos fúngicos; en la membrana celular contienen ergosterol; estos organismos son en su mayoría aerobios, pero también existen anaerobios facultativos, pueden ser unicelulares (levaduras) o pluricelulares; el conjunto de células agrupadas de manera lineal forma una hifa, que puede ser cenocítica cuando el citoplasma se encuentra completamente comunicado entre célula y célula, o septado cuando existe una separación entre células denominada septo, el conjunto de hifas forma un micelio, este micelio es muy ramificado y gran parte de sus hifas se despliegan dentro y sobre el sustrato para alimentarse de él, denominándose esta región micelio vegetativo, mientras que la otra región que presenta estructuras diferenciadas para la reproducción recibe el nombre de micelio aéreo o reproductivo; la reproducción en el reino Fungi se puede efectuar mediante 2 mecanismos, un mecanismo sexual (teleomorfismo) generando esporas, o por un mecanismo asexual (anamorfismo) generando conidias (1, 2, 13).

#### 2.1.1 Importancia de los hongos

Los hongos son agentes causantes de gran parte de la desintegración de la materia orgánica, principalmente de los residuos vegetales debido a una importante actividad de degradación de celulosa por parte de una gran variedad de especies fúngicas; también afectan directamente a la sociedad al descomponer nuestros alimentos, prendas, y muchas pertenencias hechas a base de materia prima de naturaleza orgánica; causan diversas enfermedades en las plantas y así como en animales y en los seres humanos; constituyen la base de varios procesos industriales, entre ellos: elaboración de pan, vinos, cerveza, fermentación del cacao para producir chocolate, elaboración de ciertos quesos, etc; también son utilizados para obtener ácidos orgánicos, fármacos, vitaminas y antibióticos. Los hongos junto con las bacterias, a lo largo de su existencia se han encargado del reciclaje de muchos elementos químicos de importancia biológica, entre ellos están: el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y potasio; en los cultivos de hongos alimenticios es importante conocer su comportamiento y en base a eso mejorar su rendimiento en la producción (1).

#### 2.1.2 Objeto de estudio

Los hongos no son solo de interés para los micólogos, también existen trabajos realizados por citólogos, biólogos moleculares, bioquímicos, etc; los hongos son útiles en el estudio de procesos biológicos debido a la rapidez con que crecen y se

reproducen, se requiere de un tiempo corto para obtener un número de generaciones en comparación con otros organismos eucariontes como lo son plantas y animales; además de que los hongos pueden cultivarse en tubos de ensayo y requieren menos espacio, menos cuidados y menos equipo (1).

### 2.1.3 *Trichoderma*

Este grupo de hongos es de rápido crecimiento, presenta pigmentos conidiales de color verde brillante o blanco; las cepas de *Trichoderma* raramente están asociadas a enfermedades de las plantas, en cambio interactúan con ellas de manera mutualista protegiéndolas de microorganismos fitopatógenos, este tipo de hongos son muy agresivos en sus nichos ecológicos compitiendo contra los demás microorganismos; son necrófitos, se consideran descomponedores secundarios de biomasa (8, 9).

#### 2.1.3.1 Taxonomía de *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794, mientras que el género *Hypocrea* fue descrito por Fries en 1825; *Trichoderma* e *Hypocrea* son manifestaciones de un mismo organismo que históricamente han sido clasificados como géneros diferentes ya que las técnicas de identificación tradicionales están basadas en características morfológicas. Recientemente con técnicas moleculares se ha observado que corresponden a un mismo género: *Trichoderma* representa el estado anamorfo o estado asexual, mientras que *Hypocrea* representa el estado teleomorfo o estado sexual (11).

En el XVIII Congreso Internacional Botánico (IBC) realizado en julio de 2011 por parte del Código Internacional de Nomenclatura Botánica (ICBN), se estableció que a más tardar el primero de enero de 2013 se debería asignar un nombre oficial al holomorfo de organismos que presenten nombre diferente para su estado anamorfo y estado teleomorfo; en el caso del género *Hypocrea/Trichoderma* este asunto hasta el momento no se ha podido resolver y es que a pesar de existir un reglamento sobre la prioridad de género, existen algunos criterios que hacen que se incline más el nombre hacia *Hypocrea*, y otros criterios hacia *Trichoderma*; *Hypocrea* tiene la ventaja de ser el organismo que presenta la fase sexual además de tener una mayor diversidad de especies en comparación con el anamorfo *Trichoderma*; por otra parte, existe un gran número de citas en biotecnología y microbiología aplicada de *Trichoderma* debido a su gran uso en aplicaciones de importancia económica y otros aspectos. Comúnmente se utiliza el nombre de la primera descripción en los organismos, pero una nueva aprobación en el artículo 57.2 del ICBN menciona que el nombre del anamorfo (ej. *Trichoderma*) no es tomado en cuenta cuando se conoce al estado teleomorfo (ej. *Hypocrea*), una modificación en el artículo 14 menciona que se puede presentar una lista de los nombres preferidos ante el comité general del ICBN para su revisión y en base a eso decidir qué nombre utilizar (11, 14).

La Subcomisión Internacional sobre Taxonomía de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH) que forma parte del ICBN, es la encargada de establecer el nombre oficial para el género *Trichoderma/Hypocrea*; al momento reporta 104 especies entre *Trichoderma* e *Hypocrea*, mientras que MycoBank reporta 210 cepas de *Trichoderma* y 464 cepas de *Hypocrea*, Catalogue of Life reporta 54 especies de *Trichoderma* y 70 de *Hypocrea*; en la Tabla 1 se muestra la taxonomía reciente de *Trichoderma/Hypocrea* (11, 15, 16).

Tabla 1. Taxonomía de <i>Trichoderma</i> (17).	
<b>Reino</b>	Fungi
<b>División</b>	Ascomycota
<b>Subdivisión</b>	Pezizomycotina
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase</b>	Hypocreomycetidae
<b>Orden</b>	Hypocreales
<b>Familia</b>	Hypocreaceae
<b>Género</b>	<i>Trichoderma/Hypocrea</i>

#### 2.1.3.2 Morfología

En su morfología macroscópica (Fig 1A), el micelio inicialmente se encuentra sumergido en el sustrato, para posteriormente desarrollarse a un micelio aéreo de lanoso a algodonoso; su conidiación típicamente es verde, pero en algunas ocasiones es blanca, grisácea o café; su reverso puede no presentar alguna tonalidad, ser amarillento, ámbar o rojo opaco. En cuanto a su morfología microscópica (Fig 1B), las hifas vegetativas son usualmente hialinas, septadas, de pared lisa de 2-10  $\mu\text{m}$  de ancho, las hifas del micelio sumergido pueden presentar un tono amarillento y engrosamiento irregular de la pared de hasta 16  $\mu\text{m}$  de ancho; los conidióforos en la mayoría de las especies están a intervalos regulares en ramificación de las hifas; las fiálides están típicamente dispuestas en verticilos divergentes terminales o ramificados del conidióforo con terminación en punta; las conidias son unicelulares, típicamente verdes pero puede haber de colores grisáceos o cafés, son de lisas a rugosas; su forma puede ser subglobosa, ovoide, elipsoidal o cilíndrica; las clamidoconidias usualmente están presentes y en abundancia, especialmente en el micelio sumergido, pueden ser intercalares o terminales, con forma globosas a elipsoidal, de color amarillo pálido o gris, son lisas y algunas veces con pared muy gruesa de hasta 4  $\mu\text{m}$  (9).

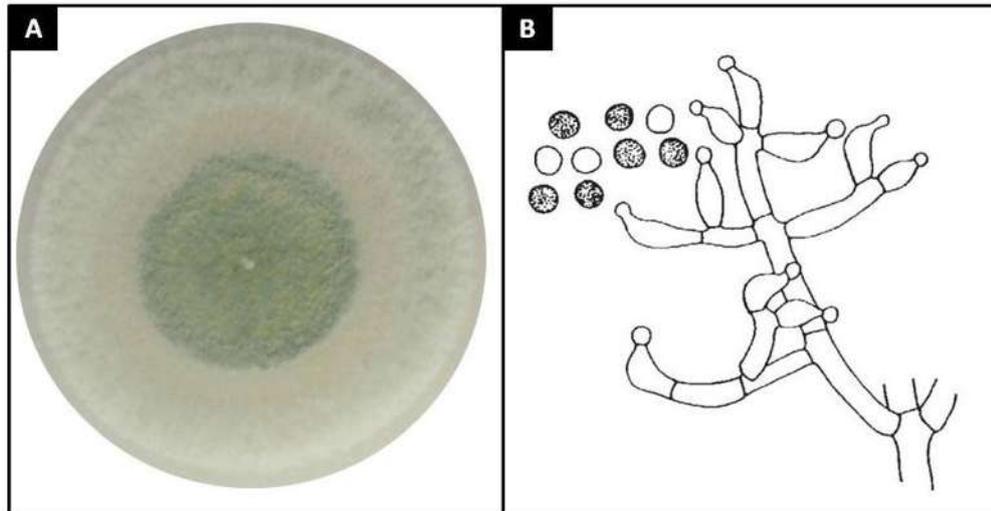


Fig 1. Morfología de *Trichoderma atroviride* (9)

#### 2.1.3.3 Nutrición

*Trichoderma* crece en una gran variedad de fuentes de carbono, siendo la glucosa la mejor fuente, seguido de fructosa, manosa, celobiosa, trealosa, galactosa y xilosa; la utilización de algunas fuentes de carbono, por ejemplo, inulina, almidón, xilano, pectina, lactosa, sacarosa, maltosa, algunos polioles, azúcares ácidos, algunos aminoácidos y algunas pentosas, pueden ser usados para propósitos quimiotaxonómicos; también degradan una gran variedad de polisacáridos y otros biopolímeros, las enzimas involucradas en los procesos de degradación de estos compuestos tienen una importancia comercial considerable, principalmente las celulasas. Como fuente de nitrógeno pueden aprovechar diferentes aminoácidos, principalmente alanina, ácido aspártico y ácido glutámico; existen cepas que también obtienen nitrógeno de bases nitrogenadas. Las fuentes de azufre y fósforo principalmente las obtienen de fosfatos inorgánicos y sulfatos. Los minerales son encontrados en pequeñas cantidades en la mayoría de los sustratos (ej. Hierro y calcio) y serán importantes para el crecimiento y la conidiación (18).

Además de sustratos ordinarios, hay cepas de *Trichoderma* que presentan una gran habilidad para transformar una amplia variedad de moléculas orgánicas, incluyendo varios xenobióticos peligrosos como Araclor, Malatión, Dalapón, DDT, dieldrín, endosulfán, pentacloronitrobenzoceno y pentaclorofenol; se ha reportado biotransformación de L-tirosina y aflatoxina, compuestos que son tóxicos para otros microorganismos. Algunas cepas degradan hidrocarburos, esta habilidad puede ser la principal causa de que estos hongos sean mayoría en la población fúngica de suelos contaminados con aceite (8, 18).

#### 2.1.3.4. Ecología de *Trichoderma*

*Trichoderma* comprende un grupo de hongos de rápido crecimiento típicamente encontrados en suelo y madera en descomposición, son muy comunes en tierras de cultivo agrícola, praderas, bosques, pantanos y desiertos; son saprófitos en la mayoría de los organismos, pero también tienen una propiedad parasítica hacia

algunos hongos, cumplen un importante rol en el mantenimiento del suelo y la salud de las plantas; ellos representan el mayor componente de biodiversidad de los suelos y particularmente integran el 3% de propágulos fúngicos aislados en suelo forestal y el 1.5% de hongos en suelo de pastizales; son aerobios obligados, su pH óptimo para el crecimiento es de 4.0-6.5, la temperatura óptima de crecimiento es de 25-30°C; son fácilmente aislados por métodos convencionales de muestras de suelo, producen un olor a coco debido a la formación del compuesto volátil 6-metil- $\alpha$ -pirona (7, 8).

Para sobrevivir en su nicho ecológico poseen una agresividad competitiva basada en la utilización de un arsenal de sustancias, entre ellas destacan las enzimas degradativas y más de 100 metabolitos con actividad antibiótica, incluyendo policétidos, polipéptidos, pironas, terpenos y metabolitos derivados de aminoácidos; el grupo de Klein (2003) han sugerido realizar una quimiotaxonomía en base a los metabolitos mencionados; también están asociados a deterioro de pintura, caucho, plastificantes y trabajos de mampostería. Algunas cepas de *Trichoderma* forman asociaciones endofíticas con la planta hospedera, actuando como agentes de biocontrol en la rizosfera contra otros hongos, produciendo antibióticos y estimulando los mecanismos de defensa de la planta; también estimulan el crecimiento de la planta aportando nutrientes y hormonas (7, 8).

#### 2.1.3.5 Ciclo de vida de *Trichoderma*

La mayoría de las cepas de *Trichoderma* no están asociadas a estados sexuales, y se consideran hongos mitóticos estrictos; el ciclo inicia con la germinación de la espora, conidia o clamidoconidia; la germinación involucra la iniciación de actividades bioquímicas, mismas que estuvieron ausentes en la fase de dormancia, es llevada a cabo con un incremento gradual en la velocidad de metabolismo hasta llegar a su nivel normal; los requerimientos para la germinación son: agua y humedad relativa suficientes, presencia de oxígeno, bióxido de carbono, una temperatura muy semejante a la ideal para el crecimiento vegetativo, nutrientes de bajo peso molecular como el azúcar y aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente; inmediatamente a la germinación se forma la primer hifa que recibe el nombre de tubo germinativo; este tubo germinativo se expande y forma hifas ramificadas, generando una colonia micelial que crece comúnmente de manera radial, aunque ciertos estímulos externos pueden dictar una alteración en esa forma de crecimiento; cuando las condiciones son ideales para el hongo, su micelio crece de manera continua; cuando los nutrientes comienzan a disminuir, el crecimiento del micelio vegetativo deja de crecer y comienza la conidiación, esto también depende de la competencia con otros microorganismos y factores como luz y temperatura; la conidiación es llevada a cabo en micelio aéreo a manera de conidias y en micelio vegetativo a manera de clamidoconidias; a nivel de laboratorio, esta fase asexual es la única que se presenta en los cultivos (19, 20).

El ciclo de vida completo anamorfo-teleomorfo tiene lugar bajo óptimas condiciones y tiene la característica de que los organismos que presentan ambos

estados sexuales comienzan a desarrollar al mismo tiempo estructuras reproductivas asexuales y sexuales, apareciendo primero conidias y posteriormente ascas con ascosporas dentro de un ascoma (14).

#### 2.1.3.6 Conidias de *Trichoderma*

La palabra conidia proviene del griego *konis* (polvo) e *idion* (pequeño), es una estructura formada mediante mitosis por una célula conidiógena o mediante la modificación de una célula hifal ya existente, los individuos que emergen de estas conidias son genéticamente idénticos al individuo que las produjo. Son las principales estructuras utilizadas para la identificación de especies fúngicas (1, 13).

Cada conidia (Fig 2), contiene nutrientes de reserva, que se encuentran localizados en vacuolas, o como gotas o gránulos; estas reservas pueden incluir polioles, trealosa y lípidos; durante el periodo de dormancia algunos de los nutrientes de reserva también cumplen el rol de proteger a la célula de estrés ambiental, entre ellos la radiación y la desecación; poseen en su parte más externa y al igual que el micelio fúngico, una pared celular (20).

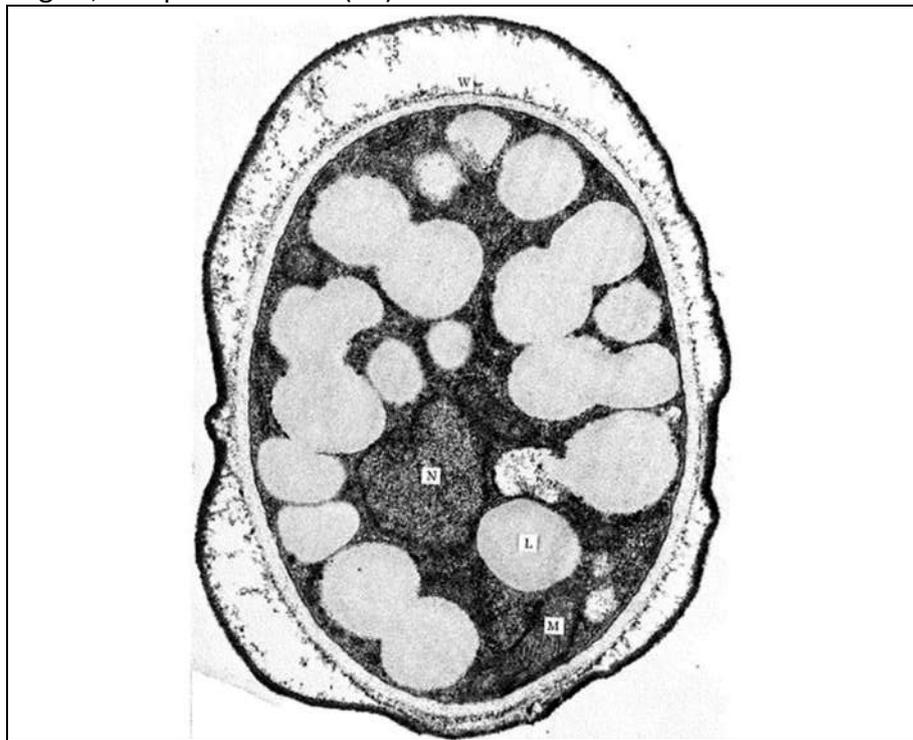


Fig 2. Micrografía electrónica de conidia de *T. saturnisporus*. N: núcleo, M: mitocondrias, L: reserva de lípidos, W: pared celular (1).

#### a. Moléculas de pared celular

La pared celular es un organelo formado por una red tridimensional de polisacáridos, anteriormente fue considerada como un exoesqueleto inerte, ahora se sabe que es una estructura dinámica que protege a la célula de cambios en la presión osmótica y otros tipos de estrés ambiental, permite que la conidia interactúe con el medio ambiente, da forma, ayuda en la adhesividad y protege contra la desecación. Se ha demostrado que los factores externos como la

composición de los medios de cultivo, el pH y la temperatura influyen profundamente en la composición de la pared celular. Mediante microscopía electrónica de pared celular en *Saccharomyces cerevisiae* se observaron 2 zonas, una interna cuyo aspecto es oscuro y está relacionada con una gran proporción de polisacáridos y una capa externa clara, donde las proteínas son las que se encuentran en mayor proporción, este resultado también es observable en las conidias. La pared celular de conidias de *Trichoderma viride* contienen moléculas similares a las de pared celular del micelio, como  $\beta$ -1,3-glucana,  $\beta$ -1,6-glucana y proteínas, sin embargo carece de quitina; la pared celular tiene un comportamiento aniónico (1, 18, 21).

Las glucanas son el componente mayoritario de pared celular, la  $\beta$ -1,3-glucana forma una continua cadena hidrogenada que funciona como una red elástica bajo condiciones osmóticas normales, actúa como andamio protector para la capa externa de manoproteínas, posee una terminación no reductora que puede actuar como aceptora de uniones  $\beta$ -1,6-glucana; *Trichoderma* carece de  $\alpha$ -1,3-glucana y  $\beta$ -1,4-glucana (2, 21).

Las melaninas son pigmentos coloidales de elevado peso molecular, formadas a partir de precursores fenólicos, indólicos o del naftaleno, al estar presentes en pared celular dan la coloración al micelio y/o conidias, protegen a la célula del estrés oxidativo, daño por luz UV y de electricidad al convertir estas energías en actividad vibracional y rotacional dentro su estructura para después liberarlas en forma de calor, también sirven de protección hacia algunos antimicóticos, las melaninas también están asociadas a virulencia en hongos causantes de infecciones en plantas o animales; existen melaninas fúngicas que forman parte de la arquitectura de la pared celular, mientras que hay otras que se encuentran en forma libre a manera de gránulos en el exterior de la pared celular (22-25).

La mayor parte de proteínas de pared celular (CWP) son glicosilfosfatidil inositol (GPI)-dependientes, son solubles en agua o detergentes, están enlazadas entre cadenas de  $\beta$ -1,6-glucana altamente ramificadas y  $\beta$ -1,3-glucana, formando el complejo CWP- $\beta$ -1,6-glucana- $\beta$ -1,3-glucana, se encuentran *N*- y *O*-glicosiladas, y su cadena lateral de carbohidratos participa significativamente en la masa total de la glicoproteína; aún se desconoce la función individual de la mayoría de las glicoproteínas presentes en pared celular. Las hidrofobinas son pequeñas proteínas secretadas con interesantes propiedades fisicoquímicas, se encuentran solamente en hongos filamentosos, son ricas en cisteína y residuos de aminoácidos alifáticos hidrofóbicos; a nivel de pared celular de micelio tienen un rol en el crecimiento como componente estructural y en la interacción del hongo con el ambiente disminuyendo la tensión superficial del agua para así permitir el crecimiento hifal aéreo, lo protegen de la desecación, permiten la dispersión de conidias y median la fijación de estructuras de infección fúngica a sus blancos (4, 18, 21, 26-28).

#### b. Origen de carga de superficie celular

Las conidias poseen una carga neta negativa debido a la ionización de grupos de superficie, por ejemplo, glicolípidos, grupos carboxilos y aminoácidos, así como por adsorción de iones presentes en la solución; esto permite que existan fuerzas fisicoquímicas de atracción/repulsión derivadas de fuerzas electrostáticas y fuerzas de van der Waals entre la carga de superficie de la conidia y el sustrato, la magnitud de estas cargas varía durante el día; la adhesión de conidias es el resultado de la interacción entre la naturaleza fisicoquímica de la superficie celular y de una superficie o tejido celular, es el primer paso antes de la germinación. La interacción entre conidias cargadas y el sustrato es tal, que a una baja concentración de electrolitos, una barrera significativa de energía debe ser superada para que la conidia se ponga en contacto con la otra superficie, cuando la concentración del analito aumenta, la barrera de energía disminuye y se produce una fuerte atracción entre la conidia y el sustrato (20, 29, 30).

#### 2.1.3.7 Importancia del estudio de *Trichoderma*

A nivel industrial, las celulasas producidas por *Trichoderma* son utilizadas en la elaboración de bioetanol a partir de restos de materia vegetal, reduciendo los costos de producción de manera importante; también las enzimas son utilizadas en la industria del papel y la industria textil; se utilizan algunas cepas de este género para la producción de aditivos alimenticios, sus  $\beta$ -glucanasas se han empleado para la mejorar el proceso de elaboración de la cerveza; las pectinasas, celulasas y hemicelulasas han funcionado como enzimas de maceración en la elaboración de jugos de frutas; las xilanasas se han usado como aditivos en el alimento de ganado y de mascotas (3).

En el área clínica, *T. longibrachiatum* es la especie más común de este género, es un hongo oportunista que ocasiona infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos, es resistente a la mayoría de los antimicóticos incluyendo anfotericina B; hay varios reportes, destacando el de un absceso cerebral debido a *T. longibrachiatum* en un paciente leucémico con neutropenia prolongada, también hay reportes de peritonitis causada por *T. viride*, *T. koningii* presente en falla renal crónica y *T. viride* causando micoma pulmonar; otras especies reportadas causando infección son *T. pseudokoningii* y *T. harzianum*, todas las especies reportadas fueron confirmadas mediante pruebas moleculares de regiones ITS (31, 32).

#### 2.1.3.8 Identificación

La identificación basada en caracteres morfológicos es el método primario para identificación y verificación de especies de *Trichoderma*, la forma del micelio puede ser distintivo y característico de cada especie, la forma del crecimiento también puede servir para diferenciar otras especies, así como los pigmentos; la desventaja es que se presenta un grado de dificultad debido a sus similitudes morfológicas haciendo esta identificación poco certera; además de que hay variaciones en morfología por las condiciones de sustrato, temperatura, humedad, iluminación entre otras condiciones en que sea cultivada la cepa; se estima que la sensibilidad

de este método es del 50%; con agar extracto de malta al 2% (MEA) se obtiene de manera satisfactoria la producción de conidias y se puede apreciar el complejo de conidióforos ramificados; mediante agar papa dextrosa (PDA) se puede observar la producción de pigmento y se puede cosechar micelio para aislar ADN. La identificación se lleva a cabo observando las características morfológicas con ayuda de claves dicotómicas y literatura taxonómica disponible (7, 9, 10, 28).

Existen varios métodos de análisis mediante pruebas moleculares que han servido para identificar con más precisión a las diferentes especies fúngicas incluyendo especies crípticas que por métodos tradicionales de identificación es imposible determinar, de esas técnicas destacaron inicialmente pruebas mediante regiones de espaciadores transcritos internos (ITS) de ADN ribosomal, métodos posteriores se basan en la identificación mediante análisis basados en filogenias por múltiples genes; pero recientemente se emplean también métodos complementarios correlacionando así a los rasgos morfológicos, biogeográficos, bioquímicos, ecológicos y filogenéticos (7).

Las cepas pueden ser identificadas, diferenciadas y ordenadas por análisis cladístico mediante una caracterización de isoenzimas, que son enzimas distintas en estructura pero con la misma actividad, se pueden distinguir a través de sus perfiles electroforéticos; estos test metabólicos están basados principalmente en perfiles de clases de enzimas particulares como son las quitinasas y celulasas, a pesar de que otras técnicas han sido desarrolladas para validar nuevas especies y que permiten proveer más datos de los roles ecológicos de las especies (7, 8).

Las técnicas instrumentales sofisticadas para el análisis y caracterización de microorganismos se han hecho comunes en las últimas 2 décadas, por ejemplo, citometría de flujo, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), dispositivos de microfluidos y técnicas basadas en electroforesis capilar (EC); esta última es una técnica prometedora para el análisis microbiano, pues tiene la característica de arrojar datos rápidos y realizar separaciones de alta resolución y eficiencia de moléculas biológicamente importantes utilizando una mínima cantidad de muestra, permite la caracterización, separación, identificación y cuantificación mediante la relación carga/masa de los diferentes analitos (5, 33).

## 2.2 ELECTROFORESIS CAPILAR

### 2.2.1 Antecedentes

Tabla 2. Antecedentes a la técnica de EC (34).	
<b>1809</b>	Reuss reporta el desplazamiento de partículas de sílice bajo acción de un campo eléctrico aplicado en arena.
<b>1816</b>	Porret observa el transporte de agua hacia el polo negativo por acción de corriente galvánica generada por la polarización negativa del capilar que une los 2 recipientes electródicos, a este fenómeno ahora se le conoce como flujo electroosmótico.
<b>1937</b>	Tiselius utiliza electroforesis en medio libre empleando un tubo de vidrio para separar proteínas en mezcla, se presentaron problemas de difusión térmica y convección, por eso a partir de entonces se optó por realizar electroforesis en medios anticonvectivos como la agarosa y poliacrilamida.
<b>1963</b>	Se realizan varios trabajos de investigación empleando capilares y realizan la medición por absorción UV.
<b>1967</b>	Hjerten emplea capilares milimétricos para la separación de sustancias neutras y sustancias cargadas eléctricamente.
<b>1979</b>	Virtaen y Mikkers desarrollan separaciones electroforéticas con capilares de 200 $\mu\text{m}$ de diámetro interno en vidrio y teflón respectivamente.
<b>1980</b>	Jorgenson y Lukacs logran elaborar capilares de sílice fundida de 75 $\mu\text{m}$ de diámetro interno, aplicaron voltajes elevados de 20-30 kV, controlando el calor con aire frío en el exterior del capilar, fue el inicio de la EC.

### 2.2.2 Generalidades

La electroforesis es el movimiento o desplazamiento de analitos dentro de un campo eléctrico; particularmente, en la técnica de EC se emplean capilares de sílice de 10 a 100  $\mu\text{m}$  de d.i. para realizar separaciones de alta eficiencia de moléculas empleando pequeñas cantidades de muestra, estas separaciones son facilitadas por el uso de elevados voltajes en el rango de los 10-30kV; con esta técnica es posible separar cationes, aniones, y sustancias no cargadas en forma simultánea. La EC es una técnica totalmente automatizada, es precisa para el análisis cualitativo y cuantitativo, consume poca cantidad de reactivos, permite la separación de volúmenes de muestra de 0.1 a 10 nL, por lo que resulta ser una técnica relativamente económica; es aplicable a una amplia gama de analitos comparado con otras técnicas de separación analíticas y es de fácil manejo (34-37).

Existen varios tipos de electroforesis capilar: electroforesis capilar de zona (CZE), enfoque isoeléctrico capilar (CIEF), electroforesis capilar en gel (CGE), isotacoforesis capilar (CITP), electrocromatografía capilar (ECC) y cromatografía capilar electrocinética micelar (MECC). Particularmente, la CZE es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y versatilidad; es la forma más simple de EC, la composición del buffer es constante en toda la zona de separación; el potencial aplicado hace que los diferentes componentes iónicos de la muestra migren cada uno según su propia movilidad y se

separen en zonas que pueden estar completamente resueltas o parcialmente solapadas; entre las zonas completamente resueltas hay huecos ocupados por el buffer; la separación de analitos catiónicos y aniónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Se pueden separar y analizar por CZE una gran variedad de moléculas de pequeño tamaño, tales como herbicidas sintéticos, pesticidas y fármacos, siempre que sean moléculas cargadas o puedan derivatizarse para dar un ión; proteínas, aminoácidos y carbohidratos se han separado en tiempos mínimos por CZE (37, 38).

### 2.2.3 Componentes de un sistema de EC

Un sistema de EC (Fig 3) consiste en un capilar de sílice de 10-100  $\mu\text{m}$  de d.i. y 300  $\mu\text{m}$  de diámetro externo, recubierto externamente con una película de poliamida para protegerlo de daños mecánicos, los capilares de d.i. muy reducido producen mejores separaciones pero con límites pobres de detección puesto que son propensos a bloquearse; 2 electrodos de platino, uno que funcionará como cátodo y otro como ánodo, conectados a una fuente de poder que alcanza hasta 30 kV, el empleo de campos eléctricos muy elevados permite reducir drásticamente el tiempo de análisis; un sistema refrigerante que regula la temperatura del capilar y de las muestras; un detector que puede ser de fluorescencia, electroquímico o de absorbancia, este último es el más común debido a que su campo de aplicación es mayor; viales que funcionan como depósito en donde son colocados los electrodos y el buffer de corrimiento respectivamente. El capilar y los viales de corrimiento son rellenos con solución buffer, la muestra es introducida mediante inyección electrocinética o presión, los extremos del capilar son sumergidos en los 2 viales, se introducen los 2 electrodos de platino y se aplica un voltaje continuo; los analitos migran debido al campo eléctrico a través del capilar y se separan en zonas discretas conforme a su relación carga/masa; en la parte distal del capilar se encuentra una ventana por la que el detector capta el momento en el que pasan los analitos por esa zona del capilar, arrojando los resultados en un gráfico denominado electroferograma en el que cada pico corresponde a una señal (34, 37-39).

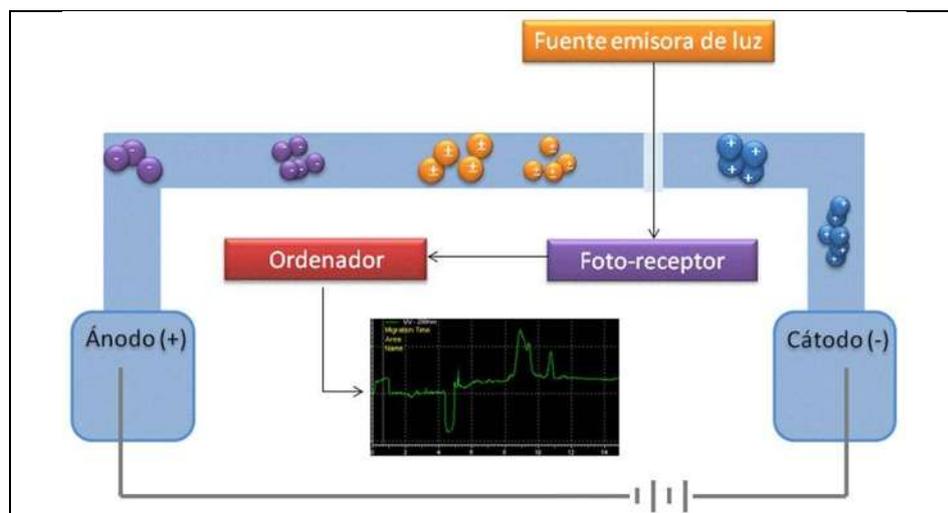


Fig 3. Componentes de un sistema de EC

#### 2.2.4 Factores que causan movilidad en los analitos

Están presentes 2 factores que causan la movilidad del analito dentro del sistema de EC, la movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) y el flujo electroosmótico (FEO).

La  $\mu_{ep}$  es el movimiento bajo la acción de un campo eléctrico donde un analito migra en base a su relación carga/masa, esta movilidad es discriminatoria y está presente en aniones y cationes, pero ausente en especies neutras; la  $\mu_{ep}$  depende de la carga, forma y tamaño del analito, es directamente proporcional a la fuerza eléctrica del analito e inversamente proporcional a los factores de retardo por rozamiento; la  $\mu_{ep}$  aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente la magnitud de la carga depende del pH; entre los electrodos la corriente en la disolución es conducida completamente por los iones del buffer y de la muestra, por lo que la velocidad de migración es proporcional a la intensidad de corriente; el voltaje regula la corriente y por lo tanto la velocidad de migración es proporcional a la diferencia de potencial eléctrico existente dentro del sistema de EC; la  $\mu_{ep}$  de un analito, en  $\text{cm}^2/\text{Vmin}$  es igual al cociente de la intensidad de campo ( $E$ ), dada en  $\text{V/cm}$ , sobre la velocidad electroforética aparente ( $v_{ap}$ ), dada en  $\text{cm/min}$  menos el FEO dado en  $\text{cm}^2/\text{Vmin}$  (35, 37, 38).

$$\mu_{ep} = v_{ap}/E - \text{FEO}$$

El FEO es el movimiento de todos los solutos presentes en el seno del capilar, este flujo no es discriminatorio ya que desplaza por igual a aniones, cationes y especies neutras, la dirección de este flujo es hacia el electrodo negativo (cátodo); este fenómeno que se ilustra en la Fig 4, surge como consecuencia de la ionización de los grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) presentes en la pared interna del capilar a  $\text{Si-O}^-$  cuando entran en contacto con el buffer en valores de pH por encima de 2, es entonces que una porción de los cationes del buffer es atraída hacia los grupos  $\text{Si-O}^-$  formando una doble capa, una de ellas llamada capa fija que se encuentra completamente adsorbida a la pared interna del capilar y una capa difusa compuesta por cationes atraídos hacia la pared pero no adsorbidos, los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, generando un movimiento global del fluido; el FEO es generalmente mayor que la  $\mu_{ep}$  de los analitos, un aumento de la concentración del buffer da lugar a una disminución del FEO; el incremento del voltaje aumenta el FEO, mejora la eficiencia de los analitos, pero puede aumentar la temperatura; la suma de  $\mu_{ep}$  y FEO da como resultado a la movilidad electroforética aparente ( $\mu_{ap}$ ) (34, 35, 37, 40).

$$\mu_{ap} = \mu_{ep} + \text{FEO}$$



aniónicos que presenten una  $\mu_{ep}$  superior al FEO no podrán migrar a través del capilar en un voltaje positivo (37).

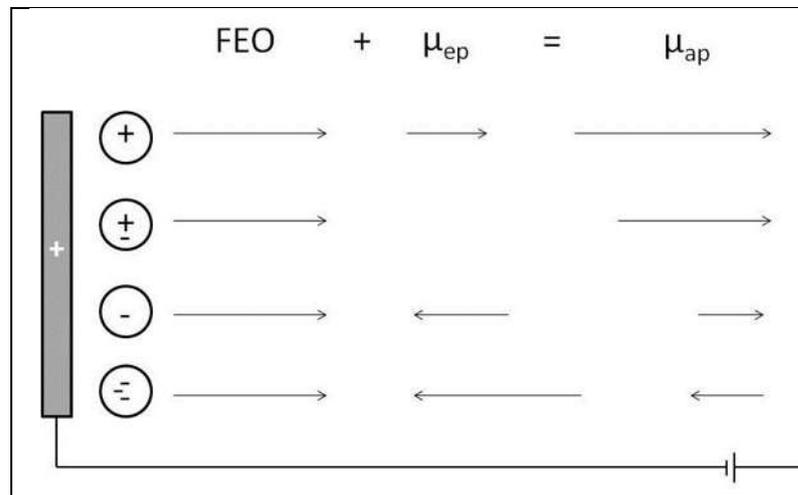


Fig 5. Orden de migración de analitos.

### 2.2.7 Aplicaciones

El principal uso que se le da a la EC es el análisis de biomoléculas, apoyando así a diversas áreas y permitiendo resolver gran variedad de problemas analíticos; en el área biofarmacéutica se puede utilizar en cada uno de los pasos de producción de medicamentos como control de calidad, también en estudios farmacocinéticos y química forense; en la industria alimentaria se pueden realizar análisis cualitativos y cuantitativos de carbohidratos, proteínas y aminoácidos, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, colorantes y pigmentos; en control ambiental se usa para la identificación de contaminantes y metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos; en área biomédica es empleada para el análisis de proteínas, ADN, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos; particularmente la CZE ha sido usada para la separación de proteínas de suero humano, péptidos como la insulina, hemoglobinas normales y patológicas (34, 38).

### 2.3 ELECTROFORESIS CAPILAR APLICADA A CELULAS INTACTAS

CZE y CIEF son herramientas con un gran potencial para el estudio de células intactas, el área de cada pico es proporcional al número de células detectadas, las células tienen un comportamiento anfótero ya que en disolución son capaces tanto de ceder como de aceptar protones; debido a estas características, los microorganismos pueden ser considerados biocoloides, ya que un coloide es una partícula o agregado de partículas de un tamaño aproximado de nm a pocos  $\mu\text{m}$  y que usualmente están cargados; la carga eléctrica de superficie es dependiente del pH, fuerza iónica y composición iónica de la solución en que están suspendidos dichos microorganismos, la modificación de la carga de superficie se da por ionización de los grupos de superficie como resultado de protonación o deprotonación y por adsorción de iones; los microbios a pH alto tienen carga neta negativa y en bajo pH tienen carga neta positiva; además la carga de superficie también puede variar con el tiempo; pequeños cambios en la concentración del pH

y las condiciones ambientales pueden contribuir a resultados irreproducibles. La identificación por CZE se basa usualmente en comparación de  $t_m$  y espectro UV, puede ser insuficiente si la muestra contiene varios tipos de microorganismos, por lo mismo no garantiza su identificación, pero si funciona para propósitos de muestreo y determinación de familias específicas de microorganismos con similar comportamiento electroforético (5, 33, 37, 42, 43).

La reproducibilidad en los análisis se ve afectada por varios fenómenos, uno de ellos es la hidrofobicidad que tiene la tendencia a formar agregados no polares de células, esta formación de agregados y con diferentes relaciones carga/masa dificultarán el análisis generando electroferogramas poco reproducibles con múltiples picos, esto se puede prevenir utilizando aditivos; Armstrong y col (2000) evidenciaron la importancia de la sonicación para separar a las células de los agregados y lograr señales más eficientes; la reproducibilidad de análisis de microorganismos también se ve afectada por el fenómeno de adsorción, este fenómeno fue probado por Buszewski y col (2008) al teñir células de *Helicobacter pylori* con naranja de acridina y emplear un sistema de EC acoplado a estereomicroscopio de fluorescencia, compararon un capilar lavado después del corrimiento con NaOH 1M en donde observaron que no quedaron células y un capilar sin lavar donde hay fluorescencia correspondiente a las células bacterianas adheridas a la pared interna del capilar; hay 3 posibles vías para evitar la adsorción de células, la primera es el uso de aditivos de revestimiento dinámico, otra es el uso de revestimiento catiónico que invierte la dirección del FEO y otra el uso de revestimiento covalente de la pared del capilar; de los aditivos, los surfactantes han sido usados para alterar el FEO y eliminar la adsorción de moléculas a la pared capilar, aunque se sabe que son agentes que causan lisis celular (4, 5, 42-47).

### 2.3.1 Investigación en células fúngicas intactas

Armstrong y col (2000), lograron observar el comportamiento en la migración a través del capilar en una suspensión sin sonicar y otra suspensión sonicada de *S. cerevisiae*, demostrando la importancia de la sonicación para romper los aglomerados celulares que ocasionan múltiples señales, obteniendo así señales muy eficientes; emplearon un capilar de sílice con 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 27 cm de  $L_t$  y 30 cm de  $L_d$ , se aplicó un voltaje de (+)10 kV, la detección se realizó a 214 nm; el buffer fue TBE (Tris 4.5 mM, ácido bórico 4.5 mM y EDTA 0.1 mM) al 0.0125%, PEO 0.5%, ajustado a pH 8.4 (48).

Posteriormente Moon y Kim (2003), estudiaron mediante ECZ dos cepas de *S. cerevisiae* empleadas como probióticos: una obtenida de un medicamento en presentación de tableta, la otra fue adquirida de un proveedor de reactivos también en presentación tableta; ambas preparadas a una concentración de 1 mg/mL en 0.5X TBE (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM, pH 8.4); en los  $t_m$  se observó una ligera variación entre ambas cepas, esto fue atribuido al sustrato en que se encontraban anteriormente ambas cepas; en corrimientos realizados sin sonicación se observaron señales múltiples debido a la formación de agregados

celulares, en cambio en los corrimientos con sonicación se observó una sola señal muy eficiente; además hicieron una curva de calibración a diferentes concentraciones de muestra, entre 0 y 1 mg/mL, y graficando concentración contra área relativa de pico, lograron una línea con coeficiente de correlación (r) de 0.993, demostrando una excelente precisión del aparato en cuantificación; utilizaron un capilar de sílice de 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 50 cm de  $L_t$  y 40 cm de  $L_d$ , detector UV a 214 nm; voltaje de (+)15 kV; el buffer utilizado fue TBE 0.5X con PEO 0.0125% (49).

En el 2008, el equipo de Armstrong utilizó CZE para analizar muestras con células de *S. cerevisiae* suspendidas en caldo nutritivo a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC; encontraron que a 280 nm tiene poca absorbancia el caldo nutritivo y buena absorbancia las levaduras; a 214 nm hay absorbancia considerable del microorganismo y del caldo nutritivo; la cantidad mínima de células detectadas fue de 200; se utilizó un capilar de sílice de 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 30 cm de  $L_t$ , 20 cm de  $L_d$  y un voltaje de (-)20 kV; el buffer empleado fue Tris 1 mM y ácido cítrico 0.33 mM, CTAB a una concentración de 6 mg/mL y el pH fue ajustado a 7.0 (50).

En 2009, Horká y col lograron mediante ECZ la separación en mezcla de conidias de diferentes especies fúngicas, con excelente eficiencia y resolución; emplearon un capilar de sílice de 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 30 cm de  $L_t$ , 15 cm de  $L_d$ , detector UV a 280 nm, un voltaje de (-)20 kV; el buffer de corrimiento fue taurina-Tris 2 mM, a pH 8.4, etanol 3%, PEG-1000 0.3%, Brij 35 0.1% (4).

En ese mismo año, Petr y col separaron mediante CZE, células de *S. cerevisiae* y *Escherichia coli*, con buena eficiencia y una excelente resolución; también se observa que conforme aumenta la fuerza iónica, disminuye la movilidad electroforética en *E. coli*, pero se mantiene en *S. cerevisiae*, conforme aumenta el pH, incrementa la movilidad electroforética notablemente en *E. coli*, y ligeramente en *S. cerevisiae*; se emplearon capilares de sílice con recubrimiento y sin recubrimiento, de 50  $\mu\text{m}$  de d.i.,  $L_t$  de 33 cm,  $L_d$  de 24.5 cm, un detector de arreglo de diodos y voltajes de separación de (+)30 kV y (-)30 kV; el buffer empleado fue de Tris, ácido bórico y EDTA en diferentes concentraciones y pH, PEO 0.0125% en el caso del capilar con recubrimiento (42).

Y consecutivamente en 2011, el equipo de Horká separó mediante CZE diferentes cepas de *Candida*, tanto cepas biofilm(+) como biofilm(-), destacando la separación en mezcla de *C. metapsilosis* (+) y *C. metapsilosis* (-); utilizaron un capilar de sílice fundida de 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 35 cm de  $L_t$  y 15 a 20 cm de  $L_d$ , detector de luz UV a 280 nm y voltaje de (-)20 kV; el buffer de corrimiento fue de fosfatos ajustado a pH 8.4, etanol, PEG 4000 0.6% o 10,000 0.3% (51).

Después en 2012, el equipo de Horká separó mediante CZE una mezcla de conidias de 4 especies de *Monilinia* previamente identificadas por secuenciación, posteriormente hacen un corrimiento con conidias obtenidas de una manzana con podredumbre, al comparar los  $t_m$  de ambos electroferogramas observan que

coincide con el  $t_m$  de *M. fructigena*, dato confirmado posteriormente mediante pruebas moleculares; utilizaron un capilar de sílice fundida de 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 30 cm de  $L_t$  y 15 cm de  $L_d$ , detector de luz UV a 280 nm y un voltaje de (-)20 kV; el buffer de corrimiento fue de fosfatos 2 mM ajustado a un pH 8.0, con 5% de etanol, 0.3% de PEG-1000 y 0.3% de Brij 35, tanto la concentración de conidias de cepas aisladas como de obtenidas directo de la manzana fue de  $1 \times 10^8$  células/ml (6).

### 2.3.2 Antecedentes en el Laboratorio de Desarrollo Analítico

En 2007, Cázares realizó un estudio mediante EC utilizando *Botryosphaera rhodina* y *Trichoderma sp*; obtuvo señales características de células fúngicas en su forma micelial con  $t_m$  específicos para cada cepa, así como un pico definido y simétrico bajo las condiciones electroforéticas ensayadas, demostrando la factibilidad de estudiar células fúngicas mediante esta técnica (41).

Para el 2009, Aguilar buscó controlar la longitud de las células miceliales, encontrando que se obtenían señales electroforéticas características en tiempos de migración relativamente cortos utilizando germínulas de *Trichoderma sp.* y *Neurospora crassa*; en un afán de obtener células miceliales más uniformes, se ensayaron diferentes condiciones para lograr obtener tamaños específicos: crecimiento en presencia de surfactantes, rompimiento del micelio de manera mecánica, etc; sin embargo, se obtuvieron mejores resultados al trabajar con germínulas (52).

En ese mismo año, Cázares logró caracterizar tanto conidias de *T. atroviride* como esporas de *Amylomyces rouxii* y *Agaricus bisporus*, obteniendo excelentes resultados en las diferentes condiciones (pH, longitud de capilar, diámetro de capilar, tipo de buffer, concentración de buffer y voltaje) y de esta manera obteniendo las mejores condiciones electroforéticas y sus respectivos tiempos de migración, además se pudieron separar conidias de *T. atroviride* y esporas de *Agaricus bisporus* en mezcla con una excelente resolución. Se demostró la viabilidad de esporas y conidias después de ser sometidas al proceso electroforético; se usaron capilares de sílice fundida de 75 y 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 20 y 38 cm de  $L_d$ , detector de luz UV a 201 nm y voltajes de (+)10, (+)15, (+)17 y (+)20 kV; el buffer de mejores resultados fue de fosfatos ajustado a pH 8.4 (35).

Para 2011, Avila estudió el comportamiento electroforético de macroconidias de los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Pestalotiopsis*, aislados de hojas y frutos enfermos de guayaba; se logra encontrar señales características para una de las cepas de *Alternaria* pero no para las cepas de *Pestalotiopsis*, debido a las diferencias de relación carga/masa así como por fenómenos de adsorción; se demuestra que no pierden su viabilidad las macroconidias después de migrar a lo largo del capilar durante el proceso electroforético; se empleó un capilar de sílice de 100  $\mu\text{m}$  de d.i., 50 cm de  $L_t$  y 40 cm de  $L_d$ , detector de luz UV a 201 nm y un voltaje de (+)17 kV; los buffer de corrimiento fueron de fosfatos a diferentes concentraciones y pH (53).

### III. JUSTIFICACION

Algunos hongos filamentosos son responsables de ocasionar infecciones y alergias, contaminación en alimentos y enfermedades en plantas; otros hongos filamentosos son de interés a nivel industrial, en agricultura, en biorremediación y a nivel de investigación sobre ecología; uno de estos hongos de importancia es *Trichoderma*, muy usado como modelo de estudio de hongos filamentosos en trabajos multidisciplinarios y muy valorado en la industria por la obtención de diferentes enzimas y metabolitos secundarios. Las conidias son el medio de propagación de los hongos filamentosos microscópicos, el primer paso antes de la germinación es la adhesión de las conidias a una superficie debido a la interacción de cargas eléctricas presentes en pared celular, esta propiedad fisicoquímica es muy importante ya que de ella depende el fenómeno de atracción/repulsión hacia células o superficies; por otra parte, las conidias también son la principal estructura para la identificación mediante caracteres morfológicos.

La EC es una herramienta analítica que proporciona datos muy precisos y en poco tiempo de moléculas orgánicas e inorgánicas, utiliza poca cantidad de reactivo y muestra, permite la separación, identificación y cuantificación de analitos. Es una técnica muy prometedora para el estudio de propiedades electroforéticas de células intactas; caracterizar especies de *Trichoderma* mediante esta técnica permitirá establecer las condiciones adecuadas para crear un método que servirá para realizar separación, identificación y cuantificación de especies fúngicas a partir de muestras de diferente origen, con buena precisión, en poco tiempo de análisis y de manera económica; además se podrán conocer más a detalle las propiedades de atracción/repulsión de células.

#### IV. HIPOTESIS

Se pueden separar, identificar y cuantificar cepas fúngicas estableciendo las condiciones adecuadas mediante un método de EC.

#### V. OBJETIVOS

##### 5.1 OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar las conidias de diferentes cepas de *Trichoderma* mediante EC.

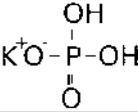
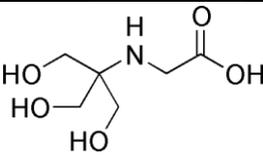
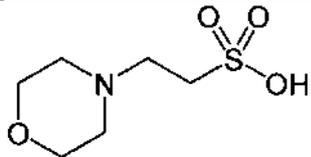
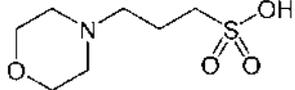
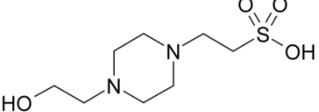
##### 5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto de diferentes tipos de buffer de corrimiento en la movilidad electroforética de las conidias de diferentes cepas de *Trichoderma*.
- Determinar el efecto de las distintas variables electroforéticas en la movilidad de las conidias de diferentes cepas de *Trichoderma*.
- Utilizar las condiciones electroforéticas obtenidas para caracterizar las conidias de las distintas cepas de *Trichoderma* en forma individual y en mezcla.

## VI. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 MATERIALES

Todas los reactivos empleados para la preparación de las soluciones buffer son de grado analítico y se muestran en la Tabla 3. Para el lavado de capilar y ajuste de pH se utilizó NaOH 1M, HCl 1M y metanol; para los cultivos de las cepas de estudio se utilizó agar Vogel que fue preparado con 15 g de agar, 15 g de dextrosa, 20 mL de Stock 50X de Vogel compuesto por vitaminas y minerales traza, en 1 L de agua.

Tabla 3. Reactivos usados en la preparación de soluciones buffer.				
Nombre	Fórmula	Intervalo de pH	pKa (25 °C)	Marca
Fosfato de potasio		6.0-8.0	6.8	JT BAKER
Tricina		7.4-8.8	8.1	SIGMA
MES		5.5-6.7	6.1	SIGMA
MOPS		6.5-7.9	7.2	SIGMA
HEPES		6.5-8.5	7.5	SIGMA

### 6.2 EQUIPO Y ACONDICIONAMIENTO DE CAPILAR

Para los corrimientos electroforéticos se utilizó un equipo *BECKMAN COULTER* P/ACE con un capilar de sílice fundida de 100 µm de d.i., 50 cm de  $L_t$  y 40 cm de  $L_d$ , detector de arreglo de diodos con una  $\lambda$  de 201 nm y detector UV con una  $\lambda$  de 200 nm, una temperatura controlada de 25 °C, antes de iniciar diariamente con el análisis electroforético se realizó un acondicionamiento inicial de capilar (Tabla 4), también se realizaron lavados cada 3 corridas para limpiar el capilar antes del cambio de muestra o condición electroforética (Tabla 5), al finalizar cada jornada de trabajo se realizó un lavado final al capilar (Tabla 6). El método utilizado para los corrimientos electroforéticos se describe en la Tabla 7.

Tabla 4. Acondicionamiento inicial del capilar		
t (min)	Solución	Presión (kg/cm <sup>2</sup> )
2	H <sub>2</sub> O destilada	1.4
40	NaOH 1M	1.4
5	H <sub>2</sub> O destilada	1.4
10	Buffer de corrimiento	1.4

Tabla 5. Lavado del capilar cada 3 corridas		
t (min)	Solución	Presión (kg/cm <sup>2</sup> )
2	NaOH 1M	1.4
2	H <sub>2</sub> O destilada	1.4
2	Buffer de corrimiento	1.4

Tabla 6. Lavado final del capilar		
t (min)	Solución	Presión (kg/cm <sup>2</sup> )
2	NaOH 1M	1.4
2	H <sub>2</sub> O destilada	1.4
2	Aire	1.4

Tabla 7. Método utilizado para los corrimientos electroforéticos			
t (min)	Solución	Presión (kg/cm <sup>2</sup> )	Voltaje
3	Buffer de corrimiento	1.4	-
0.18	Muestra	1.4	-
10-15	Buffer de separación	-	17 kV

#### Muestras

Para este trabajo se utilizó la cepa de referencia *Trichoderma atroviride* IMI-206040 y las cepas silvestres aisladas de los alrededores de Morelia *Hypocrea lixii* CMU-1, *T. gamsii* CMU-8, *H. rufa* CMU-218 y *T. tomentosum* CMU-221, obtenidas del Cepario Michoacano Universitario perteneciente al Laboratorio de Conservación y Biotecnología del CMEB-UMSNH.

Se realizaron subcultivos de las 5 cepas de *Trichoderma* en agar Vogel y se incubaron a 25 °C, a las 72 h se realizó daño mecánico al micelio de cada cepa para estimular la germinación de manera sincronizada, las conidias fueron colectadas a las 120 h con una espátula de 1 cm estéril y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, se adicionó 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril a cada tubo y se agitaron en Vortex (ICA MS1 Minishaker®) durante 5 minutos para que las conidias se desprendieran del micelio, posteriormente se dejaron reposar 10 min los tubos de manera vertical para permitir que sedimentaran los restos de micelio y poder eliminarlos, recuperando únicamente el sobrenadante que es donde se encontraban suspendidas las conidias, posteriormente se realizaron 3 lavados a las conidias, cada lavado consistió en centrifugación a 12,000 rpm durante 10 min, recuperación del sedimento y resuspensión en H<sub>2</sub>O destilada estéril;

posteriormente a los lavados, mediante diluciones y conteo en cámara de Neubauer se ajustó la suspensión a una concentración de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL, se llenó un vial especial para EC con la suspensión obtenida y se colocó en un Sonicador Branson 1510 durante 10 min para eliminar agregados de conidias.

### 6.3 MORFOLOGIA Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Las cepas fueron subcultivadas por triplicado en cajas de Petri de forma individual en agar Vogel mediante rasgadura en el centro de la caja, se incubaron a 28 °C y se les realizaron mediciones en cm con ayuda de un vernier a las 24, 48 y 72 h, también se registró el tiempo en el que apareció la conidiación.

### 6.4 DETERMINACION DE SEÑALES ELECTROFORETICAS

Se realizaron varias pruebas por triplicado para conocer el comportamiento de las señales correspondientes a las conidias y conocer que tan estable era la línea base, también se observó el espectro UV de los analitos; se utilizó fosfato de potasio 10 mM y pH de 6.8, voltaje de (+)17 y (-)17 kV, con detector de arreglo de diodos con una  $\lambda$  de 201 nm; las muestras fueron a) buffer, b) agua, c) DMSO y d) conidias suspendidas en agua de la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040.

### 6.5 MIGRACION DE CONIDIAS

Mediante un equipo de electroforesis capilar acoplado a microscopio óptico montado en el laboratorio, se capturaron videos con ayuda de una cámara digital Celestron 44420 para microscopio con la finalidad de observar el comportamiento de las conidias al aplicar un campo eléctrico; para este estudio se utilizó una suspensión de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL de la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040 teñidas con azul de metileno, buffer fosfato de potasio 1M con pH de 6.8 y un voltaje de (+) 0.11 kV.

### 6.6 TIPO DE BUFFER

Se evaluó el efecto que tienen los buffer propuestos para este estudio (fosfato de potasio, HEPES, MES, MOPS y tricina) sobre la  $\mu_{ap}$  de las conidias, cada solución buffer fue preparada a una concentración 10 mM y el pH se ajustó a su pKa correspondiente; para reducir la cantidad de variables se propuso únicamente emplear el buffer con el que se obtuvieran señales más eficientes; se utilizó una suspensión de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL de la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040, detector UV con una  $\lambda$  de 201 nm, y voltajes de (+)17 y (-)17 kV.

### 6.7 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y pH

Con el buffer seleccionado se probó el efecto de diferentes concentraciones (1, 5, 10, 20 y 30 mM) sobre la  $\mu_{ap}$  de las conidias; se utilizaron suspensiones a una concentración de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL de cada una de las cepas de estudio, cada una en su respectivo vial, el pH se ajustó al respectivo pKa del buffer, se utilizó detector UV con una  $\lambda$  de 200 nm y voltajes de (+)17 y (-)17 kV.

Después de conocer la mejor concentración con el buffer seleccionado, se procedió a realizar corrimientos electroforéticos con 5 diferentes valores de pH, dejando como valor central el correspondiente al pKa y evitando que los valores quedaran fuera del intervalo de amortiguamiento del buffer. Se buscó observar el efecto del pH sobre la  $\mu_{ap}$  de las conidias para lo cual se utilizaron suspensiones a una concentración de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL de cada una de las cepas de estudio, se empleo la concentración de buffer que dio mejores señales, detector UV con una  $\lambda$  de 200 nm y voltajes de (+)17 y (-)17 kV.

#### 6.8 EFECTO DEL VOLTAJE

Se probó el efecto del voltaje sobre la  $\mu_{ap}$  de las conidias, para este estudio se utilizaron voltajes de (+)10, (+)17, (+)20 y (+)25 kV; se utilizaron conidias suspendidas en H<sub>2</sub>O destilada estéril a una concentración de  $1 \times 10^6-3 \times 10^6$  conidias/mL de la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040, el buffer de corrimiento fue preparado de acuerdo a las mejores condiciones experimentales encontradas en este trabajo, se utilizó detector UV con una  $\lambda$  de 200 nm.

#### 6.9 PRUEBAS DE VIABILIDAD

Conforme a los resultados obtenidos de Cázares 2009 y Avila 2011 en donde se demostró la viabilidad de esporas y conidias de diferentes géneros fúngicos luego de migrar a través del capilar durante el proceso electroforético, se realizaron pruebas de viabilidad por triplicado para verificar si se mantiene la viabilidad después del proceso electroforético de conidias de *Trichoderma*; para ello se recuperaron los viales de entrada y salida que contenían el buffer de corrimiento después de realizar el proceso electroforético, se resuspendieron las conidias colocando los viales en vortex por 2 min, el buffer se recuperó en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min, el sedimento obtenido fue cultivado en agar Vogel e incubado a 28 °C durante 120 h, para reportar finalmente desarrollo positivo o negativo de micelio. Se utilizó buffer fosfato de potasio 10 mM con pH de 6.8, se aplicaron voltajes de (+)17 y (-)17 kV, se utilizó detector de arreglo de diodos con una  $\lambda$  de 201 nm.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 MORFOLOGÍA Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

La 5 cepas utilizadas presentaron una morfología tanto macroscópica como microscópica muy diferentes entre sí (Fig. 6), al igual que su velocidad de crecimiento, tiempo y forma de conidiación; en general presentaron un micelio algodonoso blanco, con conidiación color verde y verde amarillenta, esto se debió a diferentes concentraciones de melanina en la pared celular, no se observó pigmento en el medio de cultivo, al microscopio se observaron hifas septadas y hialinas; particularmente, *T. atroviride* IMI-206040 presentó conidiación a manera de anillos concéntricos, los anillos de conidiación centrales fueron de una tonalidad verde, mientras que los anillos más externos presentaron una tonalidad verde amarillento, al microscopio se observaron conidióforos alargados y con muchas ramificaciones, fiálides cortas y conidias esféricas verdes; *H. lixii* CMU-1 mostró una conidiación muy difusa de tonalidad verde, al microscopio se observaron conidióforos cortos y con pocas ramificaciones, fiálides cortas y conidias esféricas verdes; *T. gamsii* CMU-8 presentó una morfología macroscópica parecida a *T. atroviride* IMI-206040, los primeros anillos de conidiación formados fueron de una tonalidad verde oscuro mientras que los anillos producidos al final y más externos mostraron una tonalidad verde amarillento, al microscopio presentó conidióforos muy alargados y con muchas ramificaciones, fiálides alargadas y conidias ovoides verdes; *H. rufa* CMU-218 fue de crecimiento lento, su conidiación fue verde y solo apareció en regiones del micelio donde se realizó daño mecánico, al microscopio se observaron conidióforos muy alargados con pocas ramificaciones, fiálides delgadas y conidias ovoides verdes; *T. tomentosum* CMU-221 presentó una conidiación muy difusa con tonalidad verde, al microscopio se observaron conidióforos muy alargados y con pocas ramificaciones, fiálides alargadas y conidias ovoides verdes.

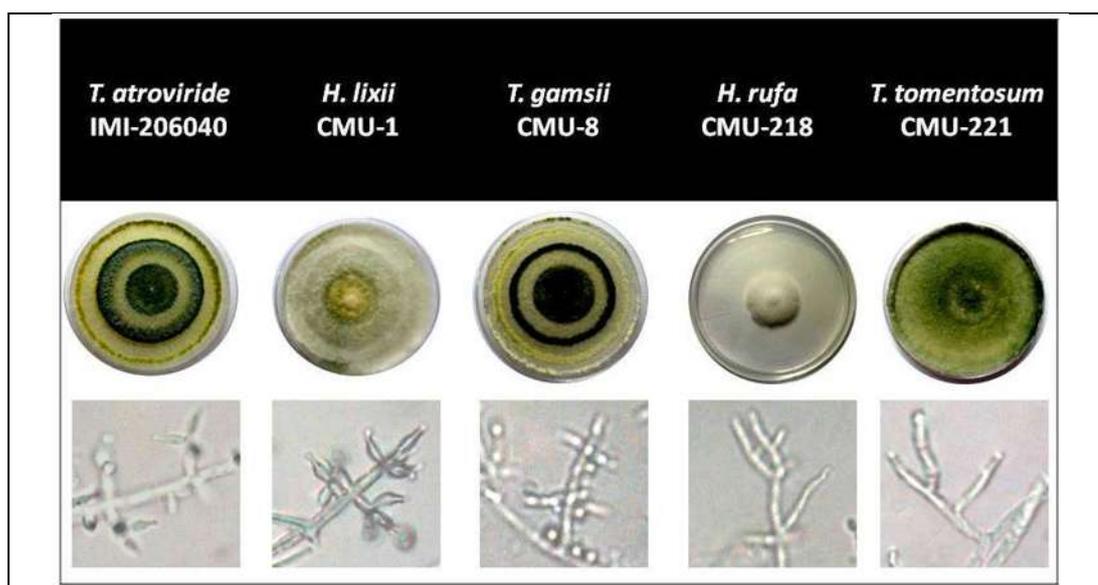


Fig 6. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas de estudio. Microcultivos realizados en agar Vogel, incubación 28 °C/120 h.

Las cinéticas de crecimiento mostraron una velocidad de desarrollo muy diferente para cada cepa (Tabla 8), *T. tomentosum* presentó la mayor velocidad de crecimiento con 8.46 cm en 72 horas, seguida por *H. lixii* con 7.23 cm, posteriormente *T. atroviride* y *T. gamsii* con 5.76 y 5.56 cm respectivamente y al final *H. rufa* con 1.26 cm; al parecer las condiciones de sustrato y temperatura no fueron las óptimas para el desarrollo de *H. rufa* ya que son totalmente diferentes a las encontradas en su nicho ecológico, en cambio *T. tomentosum* mostró su potencial de adaptabilidad a las condiciones establecidas *In vitro* ya que su velocidad de crecimiento fue mayor que el resto de las cepas.

Por otra parte, un estudio clave para la estandarización en la preparación de muestra fue el tiempo de conidiación, en este estudio se pudo apreciar que los tiempos de conidiación fueron muy diferentes en cada cepa; la cepa de *T. gamsii* fue la que presentó más tempranamente su conidiación en 72 h, le siguió *T. atroviride* a las 96 h y posteriormente *T. tomentosum* a las 120 h, la cepa de *H. lixii* conidió hasta las 192 h, mientras que *H. rufa* no presentó conidiación; se pudo comprobar que las cepas de *Trichoderma* tienden a conidiar entre las 72 y 120 h ya que son especies que en la naturaleza presentan un estado asexual, esto les permite adaptarse rápidamente a condiciones tanto ambientales como de laboratorio, mientras que en las cepas de *Hypocrea* la conidiación fue muy retrasada o nula, esto posiblemente fue debido a que el estado asexual no es común en estas especies y estando *In vitro* solo pueden presentar este modo de reproducción. Para poder sincronizar el tiempo de conidiación se buscaron varias formas, hasta que se encontró que la manera ideal era realizando daño mecánico en el micelio a las 48 h de incubación, esto estimuló que las 5 cepas de estudio presentaran su conidiación a las 96 h. En un estudio realizado en 2003 por Chaverry y col, utilizaron como medios de cultivo PDA y agar sintético deficiente en nutrientes (SNA) para realizar cinéticas de crecimiento a diferentes temperaturas utilizando 20 cepas de *Trichoderma* y de *Hypocrea*; encontrando que la mayoría de las cepas presentaban un mayor desarrollo de micelio entre los 25 y 30 °C, no se observó un patrón de crecimiento específico para cepas de *Trichoderma* como de *Hypocrea*; de las especies utilizadas en ese estudio, solamente una coincide con el presente trabajo, esta fue *T. tomentosum*, que en PDA a 28 °C creció 3.5 cm aprox. en 72 h, mientras que en SNA creció 4.5 cm aprox., siendo resultados muy diferentes comparados con los 8.46 cm que creció en agar Vogel (54).

Tabla 8. Cinéticas de crecimiento y tiempo de conidiación.

Cepa	Velocidad de crecimiento (cm/72 h)	Tiempo de conidiación (h)
<i>T. atroviride</i> IMI-206040	5.76 ± 0.20	96
<i>H. lixii</i> CMU-1	7.23 ± 0.28	192
<i>T. gamsii</i> CMU-8	5.56 ± 0.05	72
<i>H. rufa</i> CMU-218	1.26 ± 0.28	Sin conidiación
<i>T. tomentosum</i> CMU-221	8.46 ± 0.05	120

## 7.2 DETERMINACION DE SEÑALES ELECTROFORETICAS

Se identificaron las diferentes señales observadas en los electroferogramas. Se utilizó buffer de fosfatos en una concentración 10 mM y pH de 6.8 y se aplicó un voltaje de (+)17kV; al realizar corrimientos únicamente con buffer se encontró una línea base estable que sirvió para comprobar el correcto acondicionamiento del capilar así como un buen comportamiento del buffer durante el proceso electroforético (Fig 7A); la señal correspondiente al H<sub>2</sub>O destilada fue de valor inferior al de la línea base ya que el agua destilada no absorbe luz pero si diluye en ese punto al buffer de corrimiento (Fig 7B); después se analizó una muestra diluida de DMSO, que tiene la característica de ser una sustancia neutra, y por ende únicamente migra dentro del capilar por la fuerza del FEO (Fig 7C), se pudo verificar que el H<sub>2</sub>O destilada y el DMSO presentan el mismo  $t_m$ , la señal del H<sub>2</sub>O destilada sirvió para detectar la zona de los analitos neutros en el resto de los corrimientos electroforéticos; posteriormente se inyectó una suspensión de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, observando señales muy dispersas correspondientes a las conidias después de la señal del H<sub>2</sub>O destilada, por lo que se comprueba que poseen carga eléctrica negativa tal y como lo reportó Klis y col en 2007 (Fig. 7D). Después se realizaron corrimientos electroforéticos cambiando el voltaje a (-)17 kV, en donde se procesaron las mismas muestras, nuevamente se observó una línea base estable del buffer (Fig 7E); las señales del agua (Fig 7F) y del DMSO (Fig 7G) no se observaron pues el FEO con este voltaje viaja en sentido contrario, regresando consigo al vial de entrada a estos analitos; en cambio sí se observó una señal al inyectar las conidias y que se trata de un analito con una gran relación carga/masa negativa que logró superar el arrastre del FEO (Fig. 7H) (21).

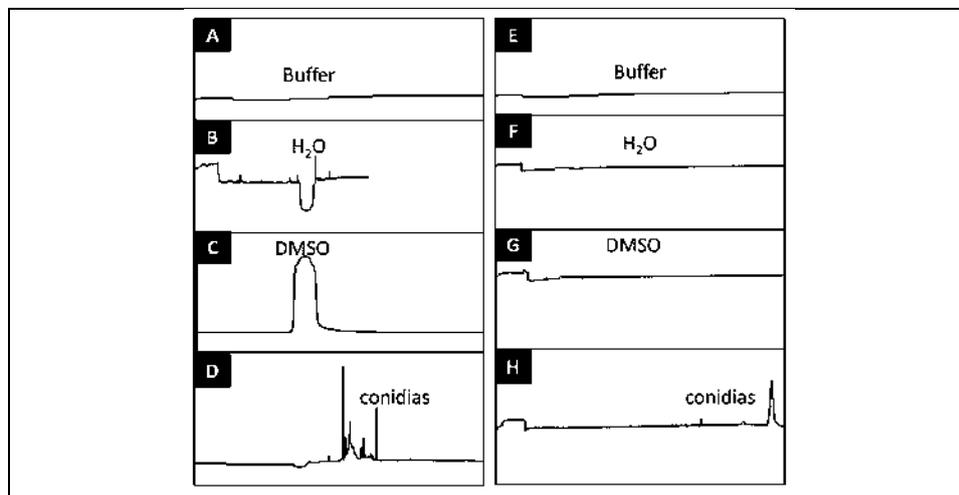


Fig 7. Corrimientos electroforéticos de diferentes muestras. Aplicando voltaje de (+)17 kV en los corrimientos de los paneles A-D, mientras que se aplicó un voltaje de (-)17 kV en los corrimientos de los paneles E-H; se utilizó buffer fosfato de potasio 10mM, pH 6.8.

Se revisó el espectro de luz UV de la señal encontrada con voltaje de (-)17 kV de las conidias de *T. atroviride* y se observó que su mayor absorbancia la presentó entre los 190 y 210 nm (Fig 8). En los trabajos de Cázares (2007 y 2009), Aguilar (2009) y Avila (2011), se demostró que las esporas y conidias migran a través del capilar en

voltajes positivos y sin uso de aditivos en una dirección que va del cátodo al ánodo apoyados por el FEO, las señales fueron leídas a 201 nm; mientras que en los trabajos de Horká y col (2009, 2011 y 2012), se encontraron las señales de las conidias en voltaje negativo debido al efecto de los aditivos, entre ellos PEG-1000 que recubre la pared interna del capilar y de esta manera elimina el FEO, permitiendo que las conidias migraran únicamente por su  $\mu_{ep}$  en dirección del ánodo al cátodo, las señales fueron leídas a 280 nm; en este estudio se observó que las múltiples señales obtenidas en voltaje positivo de muestra de conidias de *T. atroviride* pueden ser leídas tanto en 201 como en 280 nm, mientras que la señal muy eficiente obtenida en voltaje negativo no puede ser leída a 280 nm, por lo que se descarta que esta señal corresponda a las conidias. De acuerdo a Szpoganicz y col (2002), que reportan que las melaninas según su estructura química presentan regiones de mayor absorbancia en 210-250 nm y en 380-420 nm a un pH de 6.7, y de acuerdo con Butler y Day (1998), que describen 2 tipos de melanina, la que forma parte de la estructura de pared celular y la que se encuentra libre dentro de depósitos ubicados en la superficie de la pared celular, se sugiere que el analito encontrado en voltaje negativo corresponde a melanina libre que se desprende al aplicar un campo eléctrico (24, 25).

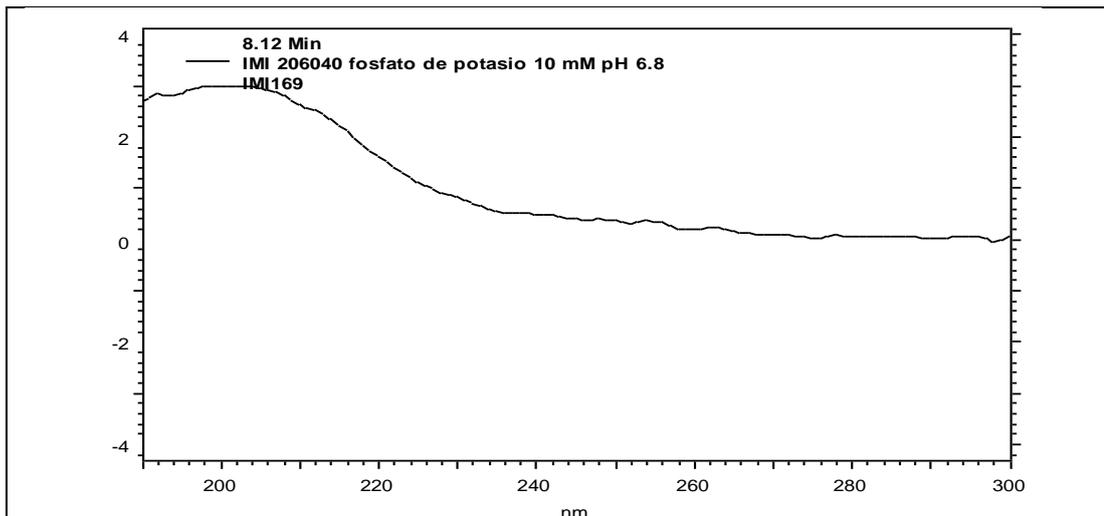


Fig 8. Espectro de luz UV de analitos. La señal corresponde posiblemente a una molécula de pared celular presente en las conidias de *T. atroviride* IMI-206040 aplicando un voltaje de (-)17 kV, encontrado en el min 8.12, fosfato de potasio 10 mM, pH 6.8.

### 7.3 MIGRACION DE CONIDIAS

Se logró hacer migrar conidias a través de un dispositivo de electroforesis acoplado a microscopio montado en el laboratorio. Se capturó la migración de conidias en video y de este video se realizaron los fotogramas en 0, 3, 6 y 9 s. Se analizaron conidias de *T. atroviride* IMI-206040 (Fig 9) utilizando fosfato de potasio 1M, pH 6.8 y voltaje de (+)0.11 kV; se observó de forma visual el comportamiento de las conidias dentro del capilar, destacando que con la sonicación se lograron eliminar los agregados celulares y que las conidias migran hacia el polo negativo tal y como se describió en los trabajos de Cázares (2007 y 2009), Aguilar (2009) y Ávila (2011). La conidia encerrada en círculo verde no presentó una  $\mu_{ap}$  observable,

posiblemente debido al fenómeno de adsorción a la pared interna del capilar, mientras que las conidias encerradas en círculo amarillo y rojo mostraron un desplazamiento constante hacia el polo negativo, la conidia encerrada dentro del círculo amarillo mostró una velocidad electroforética menor en comparación con la conidia encerrada en círculo rojo; esta diferencia de velocidades es la que ocasiona una dispersión de señales en el electroferograma o una señal con poca eficiencia; Armstrong y col (2003), justifica que este fenómeno es debido a la adsorción de iones y deformación al considerar a las células como partículas coloidales; debido a esta característica, no tendrán la misma forma, ni tamaño ni distribución de cargas las conidias a pesar de que sean producidas por el mismo microorganismo, y por consiguiente, no tendrán la misma relación carga/masa. La composición de pared celular es también variada. Uno de los componentes que es observable a simple vista es la melanina ya que las conidias de una misma cepa presentan una coloración que va del amarillo al verde.

Se propone realizar la caracterización electroforética de conidias mediante este dispositivo utilizando un objetivo micrométrico para medir el desplazamiento de las conidias. Este valor sería el equivalente a la  $L_d$  del equipo de *EC Beckman Coulter*, el tiempo del corrimiento que en este estudio fue de 9 s (0.15 min) sería el equivalente al  $t_m$ , la  $L_t$  fue de 10 cm y el voltaje 0.11 kV, con estos valores se puede obtener la  $\mu_{ap}$  de varias conidias y reportar como resultado final el promedio de movilidades.

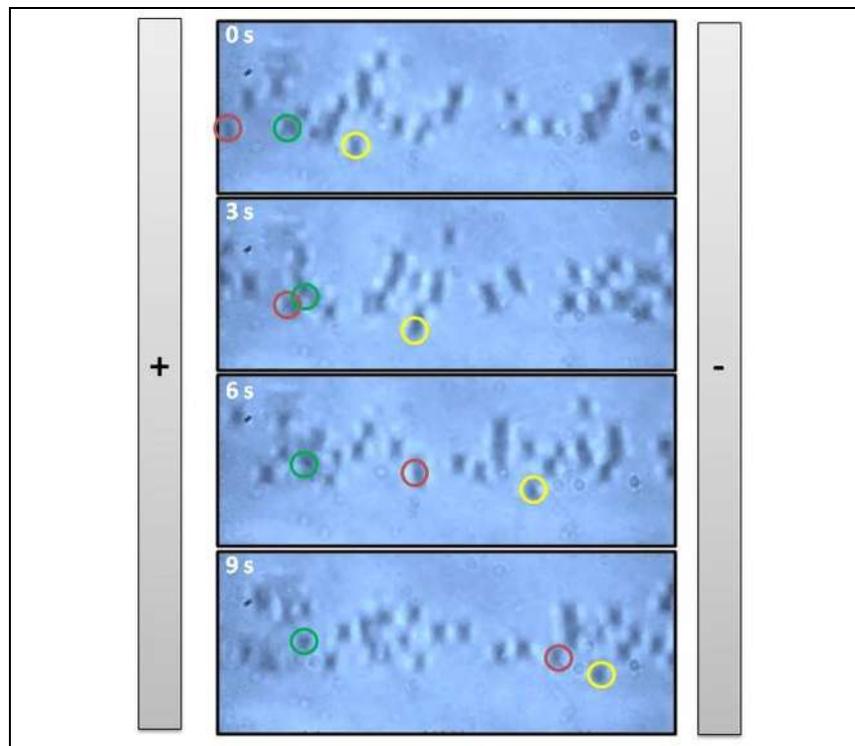


Fig 9. Electroforesis capilar acoplada a microscopio. Conidias de *T. atroviride* IMI-206040, fosfato de potasio 1 M, pH 6.8, voltaje de (+)0.11 kV.

#### 7.4 TIPO DE BUFFER

Se probó el efecto de los diferentes buffer propuestos para este trabajo, estos fueron fosfato de potasio, y los buffer switteriónicos HEPES (ácido *N*-(2-hidroxi-etil)-piperazin-*N*-etanosulfónico), MES (ácido 2-(*N*-morfolino)-etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(*N*-morfolino)-propanosulfónico), y tricina; cada uno de ellos a una concentración 10 mM, se les ajustó el pH a su respectivo pKa y se utilizó una suspensión de  $1-3 \times 10^6$  conidias/mL de la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040. Al aplicar voltaje de (+)17 kV (Fig 10), el valor del FEO fue muy parecido en los diferentes buffer utilizados, las señales de las conidias aparecieron después de las señales de analitos neutros, el comportamiento de la  $\mu_{ep}$  de las conidias fue muy diferente en cada solución buffer; particularmente, en HEPES se observó una gran dispersión de señales en un intervalo de 3.7-7.5 min; mientras que con MOPS y MES se encontró una dispersión de señales un poco menor que en HEPES, con un intervalo de 3.7-6.5 y 3.7-6.2 respectivamente, el comportamiento de las conidias fue muy similar con estos 2 buffer debido a que MOPS y MES presentan una estructura similar, ambos tienen un anillo de morfolina y un radical que contiene ácido sulfónico, con la diferencia que el radical de MOPS tiene 3 carbonos mientras que el radical de MES tiene solo 2 carbonos; el buffer de tricina no dio los resultados esperados porque sus características fisicoquímicas no interactuaron adecuadamente con la superficie de las conidias, ya que se formó una línea base inestable en el momento que pasaron las conidias por el detector, esto fue posiblemente debido a la diferencia en la fuerza iónica de estos 2 componentes; fosfato de potasio fue el buffer que interactuó de mejor manera con la pared celular, permitiendo un mejor agrupamiento de señales con un intervalo de 4-5 min.

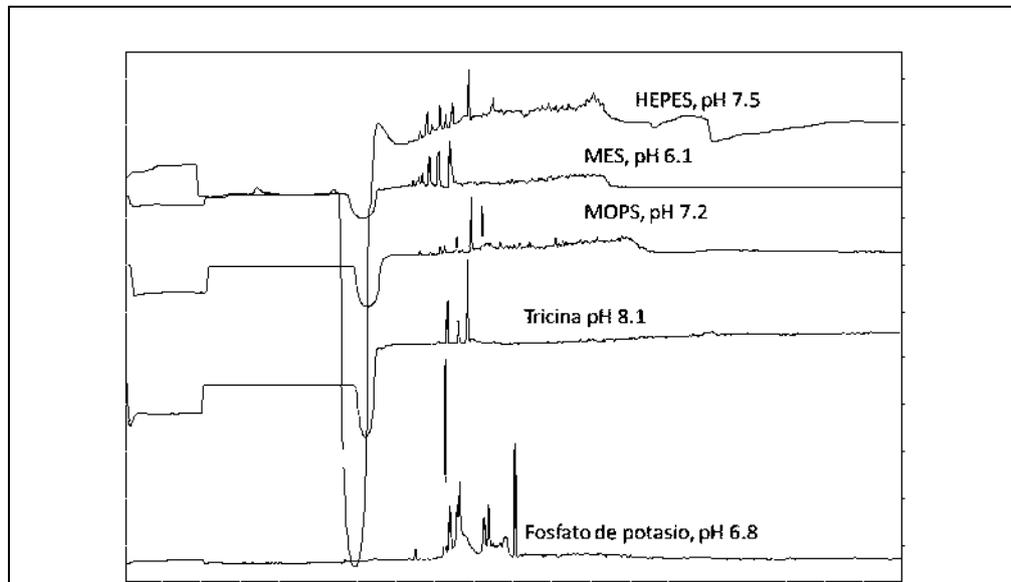


Fig 10. Efecto del tipo de buffer en voltaje positivo sobre las señales de conidias. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, voltaje de (+)17 kV, buffer de corrimiento 10 mM y pH ajustado a su pKa.

Al aplicar voltaje de (-)17 kV (Fig 11); en HEPES se observó una señal con asimetría negativa y un  $t_m$  de 15.5 min; mientras que con MES se observaron 2 señales no resueltas con  $t_m$  de 11.2 y 12.1 min respectivamente; en MOPS se encontró una señal con asimetría negativa y un  $t_m$  de 12.5 min; mientras que con tricina se encontró una señal poco eficiente con asimetría positiva y un  $t_m$  de 12 min, además de una línea base muy inestable del electroferograma; con fosfato de potasio se encontró una señal muy eficiente y simétrica, con un  $t_m$  de 10.6 min; de acuerdo con Revilla y col (2005), la asimetría se forma en las señales de los electroferogramas como resultado de diferencias en la conductividad de los analitos con respecto al buffer, por eso los buffer recomendados para el análisis son los que tengan una conductividad cercana a la del analito, la simetría que se observó en la señal obtenida en fosfato de potasio demostró que el analito y el buffer tienen una conductividad parecida.

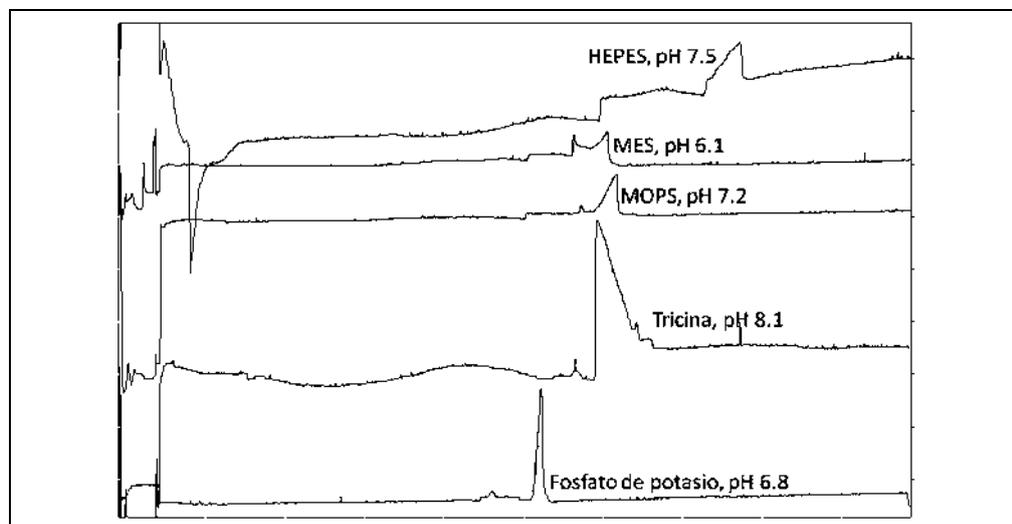


Fig 11. Efecto del tipo de buffer en voltaje negativo sobre las señales de conidias. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, voltaje de (-)17 kV, buffer de corrimiento 10 mM y pH ajustado a su pKa.

Los buffer switteriónicos fueron propuestos en un inicio debido a que son inertes en la interacción con las moléculas de pared celular así como de aditivos; además, de que se han utilizado mucho para la separación de proteínas por electroforesis y estudios metabólicos en cultivos celulares sin ocasionar interferencia en el estudio, tal y como lo describe Good e Izawa (1972). En este caso con los buffer switteriónicos no se lograron buenos resultados posiblemente debido a la diferencia en la fuerza iónica y en la conductividad en comparación con el analito, ocasionando una línea base inestable, gran dispersión de señales así como asimetría; todo esto puede deberse a que su fuerza amortiguante es reducida en comparación con otras sales como es el caso de fosfato de potasio. Las conidias intactas pudieron ser analizadas por EC utilizando éste último buffer con el que se obtiene una línea base estable y señales simétricas; para mejorar la eficiencia de las señales con voltaje positivo se requirió posteriormente de probar diferentes condiciones en cuanto a concentración, pH y voltaje (55).

### 7.5 EFECTO DE LA CONCENTRACION Y pH

Se utilizó fosfato de potasio a un pH de 6.8 y aplicando un voltaje de (+)17 kV, inicialmente se midió el efecto que tiene la concentración de buffer sobre la corriente, considerando concentraciones que no produjeran una corriente mayor a 200  $\mu\text{A}$ , en la Fig 12 se encontró que concentraciones 40 mM o mayores sobrepasan este valor; en base a este resultado obtenido se utilizaron concentraciones inferiores a dicha concentración; estas fueron 1, 5, 10, 20 y 30 mM. Exceder los 200  $\mu\text{A}$  produce una cantidad de calor que ya no puede ser controlada con el refrigerante contenido en el sistema de EC, este calor altera el sistema y produce señales irreproducibles.

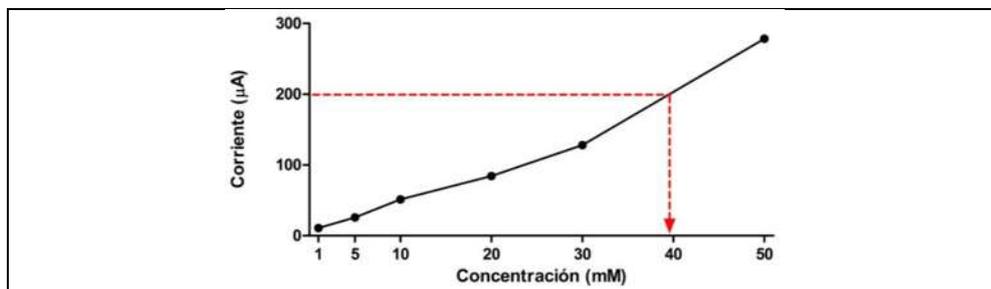


Fig 12. Efecto de la concentración sobre la corriente. Fosfato de potasio, pH 6.8, (+)17 kV. La línea punteada roja horizontal indica el límite recomendado de corriente.

Al aplicar voltaje de (+)17 kV utilizando fosfato de potasio con un pH de 6.8 (Fig 13); con una concentración de 1 mM, se obtuvieron señales muy dispersas con un intervalo de 6.0-10.0 min; mientras que con una concentración 5 mM se logró una dispersión menor a la anterior, con un intervalo de 9.0-10.5 min. En cambio, con una concentración 10 mM se encontró una menor dispersión, que fue de un intervalo de 7.7-9.2 mientras que con una concentración 20 mM aumentó la dispersión a un intervalo de 9.0-11.0; con una concentración 30 mM, se observó una mayor dispersión de señales con intervalo de 8.7-11 min. Debido a la dispersión de estas señales encontradas, no fue posible determinar la  $\mu_{ap}$ , se encontró que la concentración de fosfato de potasio que interactúa de mejor manera con las conidias de *T. atroviride* IMI-206040 para permitir una migración más homogénea es de 10 mM, posiblemente esta concentración logra un equilibrio en las características fisicoquímicas de los componentes de pared celular de las conidias, logrando casi igualar la relación carga/masa de las conidias.

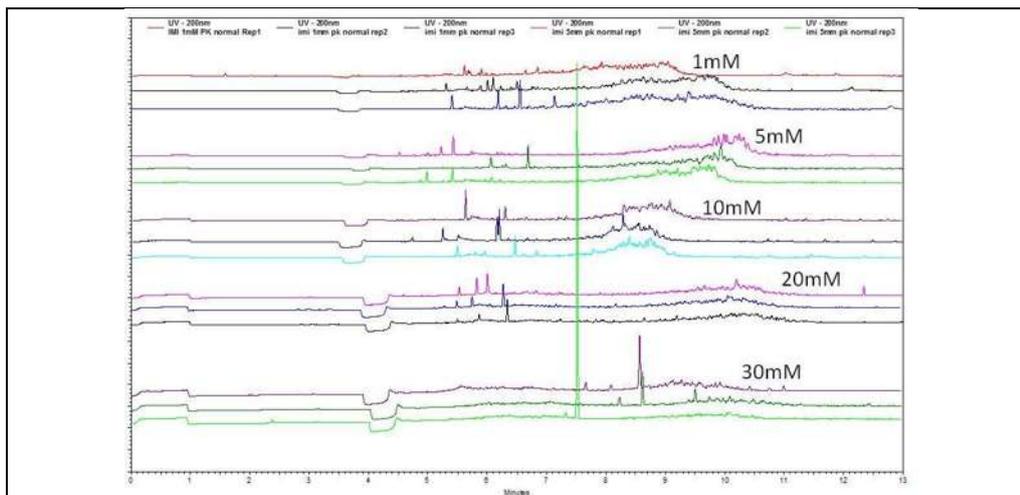


Fig 13. Efecto de la concentración de buffer en voltaje positivo sobre las señales. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, fosfato de potasio, pH 6.8, voltaje de (+)17 kV.

Se analizaron la conidias de las 5 cepas en buffer fosfato de potasio con un pH de 6.8 y voltaje de (-)17 kV (Fig 14); se observó que la  $\mu_{ap}$  es directamente proporcional a la concentración, y que no existe una diferencia significativa entre las movilidades de cada una de las cepas de estudio; entre las diferentes concentraciones, se encontraron señales más eficientes a una concentración de buffer de 20 mM.

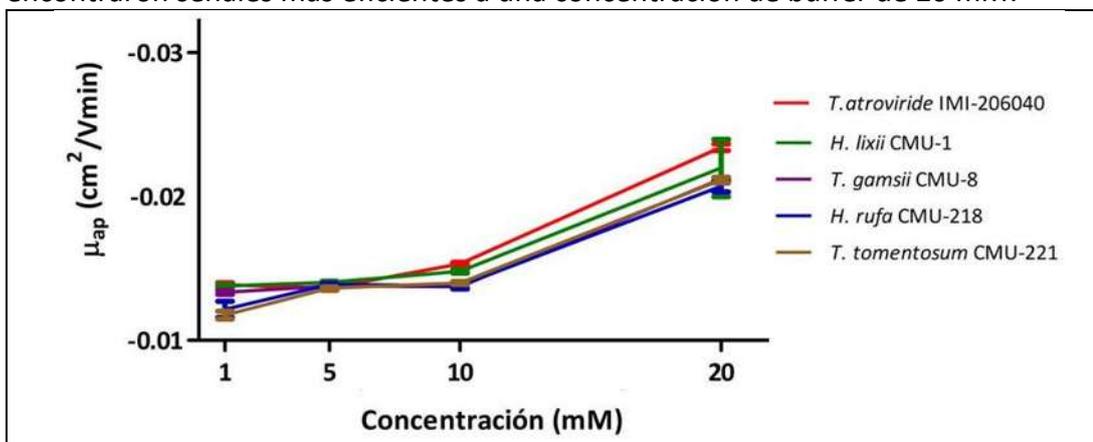


Fig 14. Efecto de la concentración de buffer en voltaje negativo sobre las señales. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, fosfato de potasio, pH 6.8, voltaje de (-)17 kV.

Posteriormente se probó el efecto del pH sobre el comportamiento de la migración de conidias, se utilizó a la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040 con buffer fosfato de potasio con una concentración 10 mM y un voltaje de (+)17 kV (Fig 15); se observaron señales dispersas en los diferentes valores de pH, destacando que a mayor valor de pH existía menor dispersión; en pH de 6.4 se observó un intervalo de dispersión de 6.0-8.0 min, en pH 6.8 fue de 6.5-8.5 min, en pH 7.2 fue de 7.0-8.7 min, en pH de 7.6 fue de 6.5-8.2 min, mientras que en pH 8.0 presentó una mejor eficiencia con un intervalo de 6.0-7.0 min; el valor del pH participa en la ionización tanto del capilar como de los analitos, en esta prueba se observó que un pH de 8.0

logró una ionización más homogénea de las conidias, permitiendo que migraran con una menor dispersión.

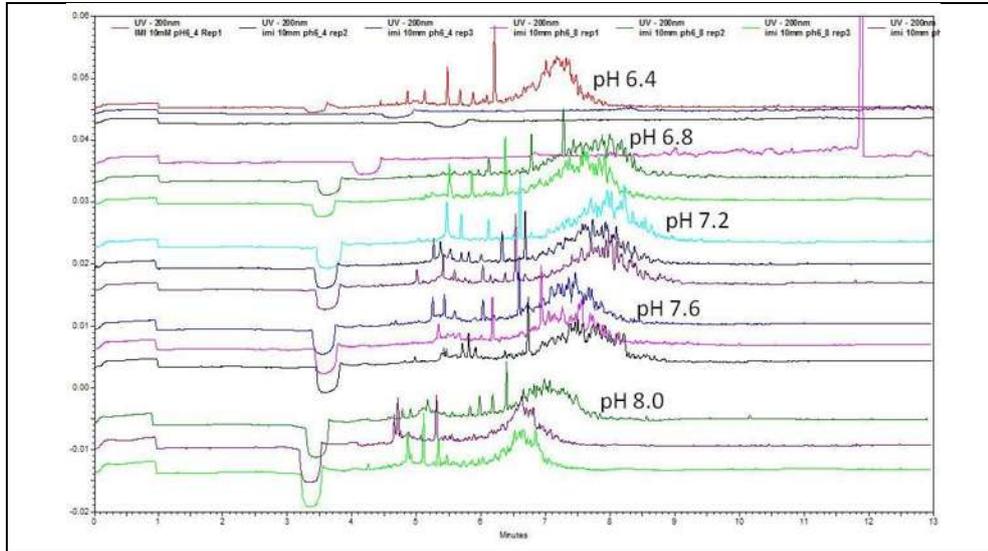


Fig 15. Efecto del pH del buffer en voltaje positivo sobre las señales de conidias. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, fosfato de potasio 10 mM, voltaje de (+)17 kV.

Al aplicar voltaje de (-)17 kV con las condiciones electroforéticas anteriormente citadas, se pudo caracterizar a la molécula encontrada en voltaje negativo (Fig 16); se observó que el  $\mu_{ap}$  es inversamente proporcional al valor del pH; esto es debido a que el FEO en voltaje negativo viaja en sentido contrario a la migración de las señales. En la evaluación del efecto del pH se encontró que las mejores condiciones electroforéticas en voltaje positivo se encuentran en un valor de 8.0, pues permitieron una menor dispersión de las señales. En voltaje negativo no se vio afectada la eficiencia de la señal encontrada, pero si se encontró que a mayor pH, menor  $\mu_{ap}$ .

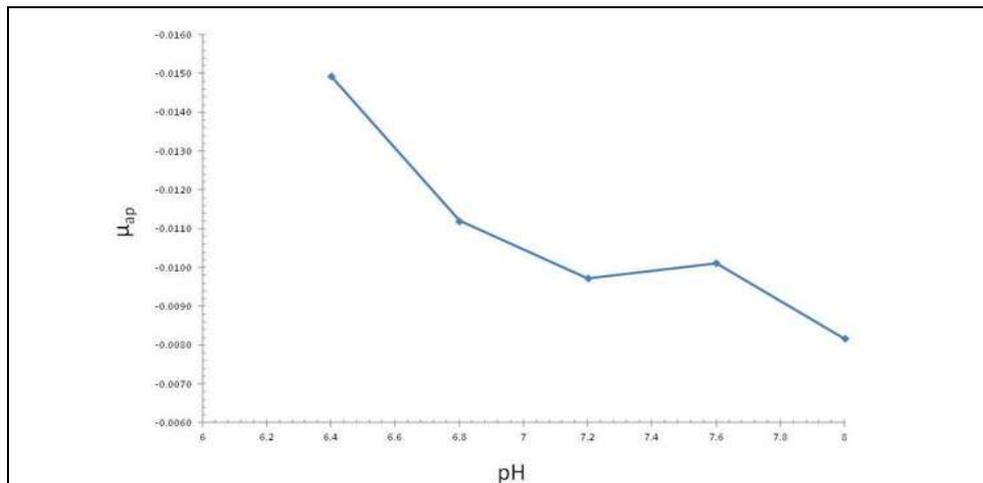


Fig 16. Efecto del pH de buffer en voltaje negativo sobre las señales de conidias. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, fosfato de potasio 10 mM, voltaje de (-)17 kV.

## 7.6 EFECTO DEL VOLTAJE

Se buscó mejorar la eficiencia de las señales con voltaje positivo, ya que en los resultados anteriores mostraban una gran dispersión, se aplicaron voltajes de (+)10, (+)17, (+)20 y (+)25 kV, se utilizaron conidias de *T. atroviride* IMI-206040, buffer fosfato de potasio 10 mM y pH de 8.0 (Fig 17); se observó que la  $\mu_{ap}$  es directamente proporcional al voltaje, ya que se encontraron señales dispersas en (+)10, (+)17, (+)20 y (+)25 kV con intervalos de 11.7-14.3 min, 6.1-7.1 min, 5.9-6.6 min y 4.6-5.2 min respectivamente, si bien, en (+)25 kV se encontró mejor eficiencia, existió mayor reproducibilidad y estabilidad con (+)20 kV.

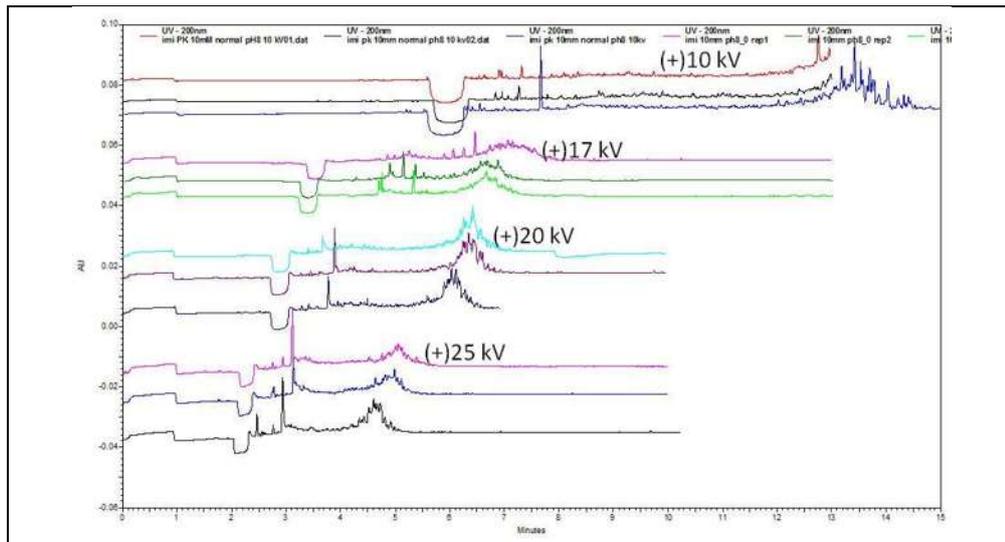


Fig 17. Efecto del voltaje sobre las señales de conidias.  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL de *T. atroviride* IMI-206040, fosfato de potasio 10 mM, pH 8.0.

Teniendo las mejores condiciones electroforéticas con respecto a la cepa de referencia, se procedió a estudiar las 4 cepas restantes realizando corrimientos individuales y en mezcla. Siendo las condiciones ideales en voltaje positivo con buffer fosfato de potasio 10 mM, pH 8.0 y voltaje de (+)20 kV. Las muestras fueron las 5 cepas de *Trichoderma* mediante corrimientos individuales y un corrimiento en mezcla conidias de las 5 cepas, todas ellas a una concentración de  $1$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL; se obtuvieron señales poco eficientes en los corrimientos individuales, destacando *T. atroviride*, *T. gamsii* y *T. tomentosum* como los analitos con menor dispersión, mientras que las señales en los corrimientos de *H. lixii* e *H. rufa* presentaron una gran dispersión; en el caso de la separación en mezcla, debido a la baja concentración resultante de cada cepa, el electroferograma no mostró señales características de ninguna de las cepas (Fig 18); las conidias de cada cepa presentaron características totalmente diferentes dentro del sistema de EC, esto fue resultado de un estudio sin aditivos que tuvo como fin encontrar características de pared celular de células intactas y sin alterar sus propiedades mediante el uso de aditivos, las condiciones más apropiadas en cuanto a voltaje, concentración, tipo de buffer y pH encontradas correspondieron únicamente a la cepa de referencia *T. atroviride* IMI-206040, y se pudo encontrar que a pesar de tener características diferentes, las cepas *T. gamsii* y *T. tomentosum*, respondieron adecuadamente a

esas condiciones electroforéticas, mientras que las cepas de *H. lixii* e *H. rufa* presentaron un comportamiento totalmente diferente; con estos resultados encontrados se sugiere que las conidias de *Trichoderma* e *Hypocrea* tienen componentes de pared celular diferentes en cuanto a porcentaje, además de que se debe recordar que en su nicho ecológico las cepas de *Trichoderma* presentan una reproducción asexual, mientras que las cepas de *Hypocrea* presentan una reproducción sexual, y en medios sintéticos se adapta más fácil el género *Trichoderma*. Otro factor importante fue la manera de inducir la conidiación en las cepas mediante daño mecánico al micelio, la cepa con mayor dispersión en las señales fue precisamente la cepa de *Hypocrea* que no presentaba conidiación *In vitro* sin realizar daño mecánico; será importante la utilización de aditivos para mejorar la eficiencia en las señales y así poder encontrar más información acerca de las propiedades de superficie de las conidias de estas cepas.

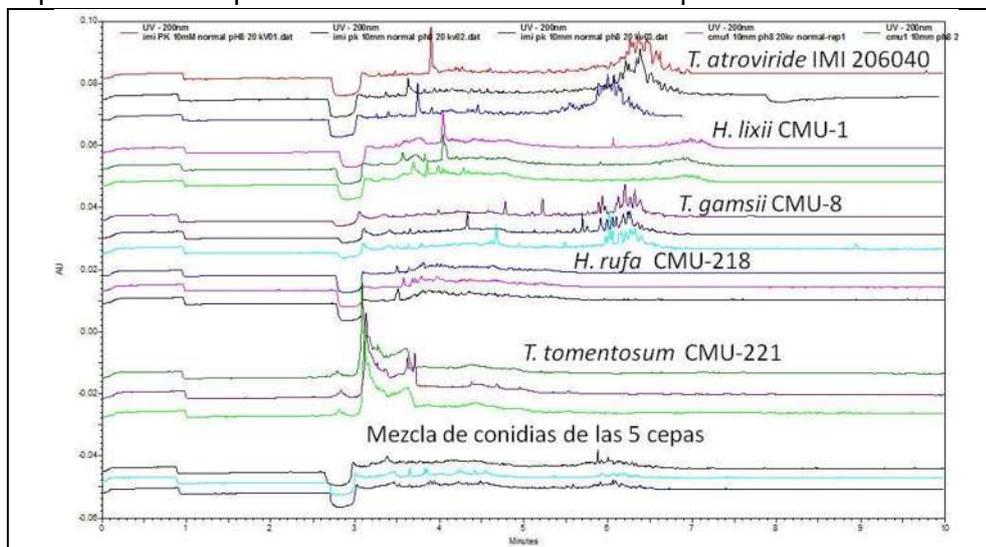


Fig 18. Separación individual y en mezcla con voltaje positivo. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL, fosfato de potasio 10 mM, pH 8.0, (+)20 kV.

Para la prueba de separación con voltaje negativo, debido a la buena eficiencia en las señales en las diferentes condiciones electroforéticas, se utilizó un buffer que no produjera una elevada corriente, se determinó emplear el buffer fosfato de potasio 20 mM, con pH de 6.8 y voltaje de (-)17 kV; en los electroferogramas individuales dio la impresión de existir selectividad, pero al realizar la separación en mezcla, se observó una sola señal (Fig 19); se pudo confirmar que la molécula de pared celular presente en las 5 cepas es la misma, se sugiere que esta señal que posiblemente es melanina, puede funcionar para una identificación rápida mediante EC de grupos de hongos, permitiendo realizar un análisis presuntivo rápido y económico a partir de muestras ambientales, clínicas, de alimentos, entre otras.

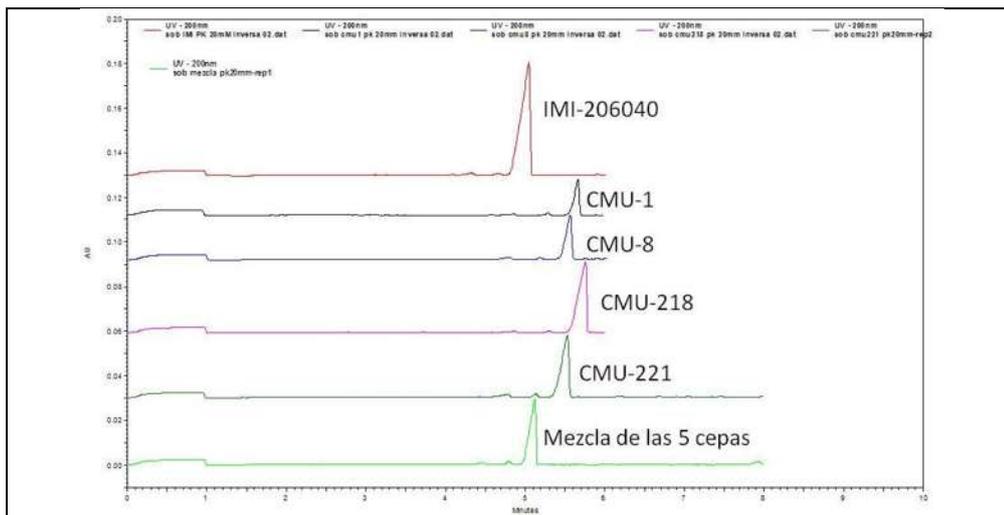


Fig 19. Separación individual y en mezcla en voltaje negativo. Se utilizó una concentración de  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^6$  conidias/mL, fosfato de potasio 20 mM, pH 6.8, (-)17 kV.

### 7.7 PRUEBAS DE VIABILIDAD

Se verificó que las conidias de *T. atroviride* IMI-206040 mantienen su viabilidad después del proceso electroforético; se observó un desarrollo positivo de micelio en los cultivos de sedimento de los viales tanto de entrada como de salida recuperados luego de los corrimientos electroforéticos realizados con un voltaje de (+)17 kV, demostrando que las conidias migran a lo largo del capilar; mientras que solo se observó desarrollo positivo de micelio en el cultivo de sedimento del vial de entrada recuperado de corrimientos electroforéticos realizados con voltaje de (-)17 kV, siendo desarrollo negativo del vial de salida (Fig 20); con lo que se pudo demostrar que las conidias no pasaron a través del capilar en voltaje negativo, pero lo sobresaliente del estudio es la resistencia que presentan las conidias a elevados voltajes, consideramos que la corriente no atraviesa la conidia, sino que la rodea, además conforme a Butler y col (1998), la melanina además de proteger contra radiación, también protege contra descargas eléctricas al convertir la energía eléctrica en calor, calor que es rápidamente disipado dentro del equipo de EC con ayuda del refrigerante; las conidias obtenidas tanto en viales de entrada como en viales de salida estuvieron expuestas al elevado voltaje durante todo el proceso electroforético, razón por la cual al germinar desarrollaron un micelio con crecimiento irregular y abundante conidiación debida al estrés producido en el hongo (24).

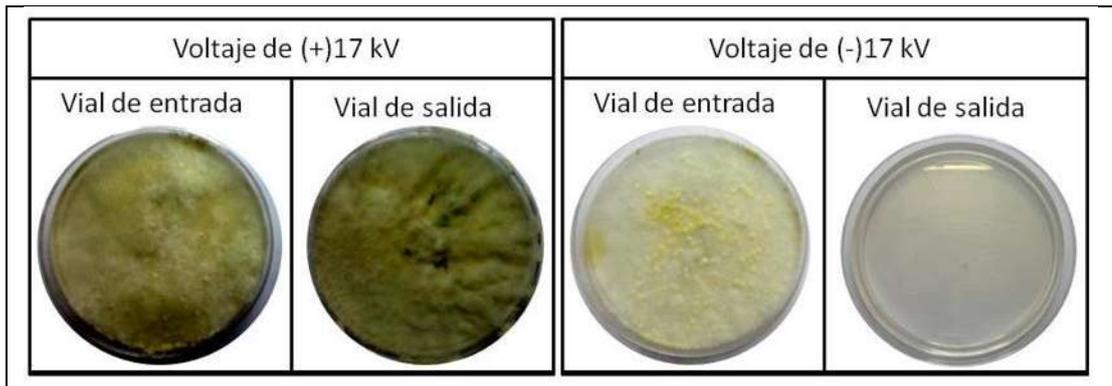


Fig 20. Pruebas de viabilidad

## VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

### ➤ Morfología y cinéticas de crecimiento

Las 5 cepas utilizadas presentaron una morfología tanto macroscópica como microscópica muy diferente entre sí. Cada cepa tuvo tanto una velocidad de crecimiento diferente como su tiempo de conidiación; el tiempo de conidiación se logró sincronizar mediante daño mecánico en el micelio a las 48 h de incubación, esto estimuló que las 5 cepas de estudio presentaran su conidiación a las 96 h.

### ➤ Determinación de señales electroforéticas

Se encontró una línea base estable con el buffer de fosfatos con una concentración 10 mM y pH de 6.8, se comprobó mediante voltaje positivo que DMSO y agua destilada tienen un comportamiento electroforético neutro, mientras que las conidias se comportaron como bioanalitos aniónicos; mediante voltaje negativo se verificó que sólo migran analitos aniónicos con una relación carga/masa que permite que la  $\mu_{ep}$  sea mayor que el FEO, en este voltaje se encontró una señal muy eficiente y simétrica que en su espectro UV presentó un máximo de absorbancia de 190-210 nm, se sugiere que esta señal corresponde a melanina que se desprende de pared celular.

### ➤ Migración de conidias

Mediante EC acoplada a microscopio óptico se analizaron conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040, utilizando fosfato de potasio 1 M, a un pH de 6.8, se observó que las conidias se desplazaron hacia el electrodo negativo a diferente velocidad electroforética, debido a este fenómeno es que se apreciaron múltiples señales en los electroferogramas obtenidos en el equipo de EC.

### ➤ Tipo de buffer

Se probaron los 5 buffer propuestos (HEPES, MOPS, MES, tricina y fosfato de potasio) a una concentración 10 mM y pH correspondiente al pKa de cada buffer, se utilizaron conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040; se observó que el FEO es parecido en los 5 buffer empleados; en voltaje positivo se encontraron señales menos dispersas de las conidias con fosfato de potasio; en voltaje negativo se encontró una señal muy eficiente pero asimétrica con los buffer switteriónicos, mientras que con fosfato de potasio se encontró una señal tanto eficiente como simétrica; se utilizó buffer de fosfatos en el resto del estudio debido a la excelente interacción con las conidias de *Trichoderma*.

### ➤ Efecto de la concentración y pH

Se demostró que concentraciones mayores de 40 mM elevan la corriente por encima de 200  $\mu$ A, esta corriente elevada puede ocasionar aumento en la temperatura, por consiguiente se estudiaron concentraciones 1, 5, 10, 20 y 30 mM de fosfato de potasio a un pH de 6.8, se utilizaron conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040; en voltaje de (+)17 kV se obtuvieron señales poco eficientes debido a la alta dispersión de conidias, no se pudo determinar la  $\mu_{ap}$ , las señales se

agruparon de mejor manera con la concentración 10 mM; con voltaje de (-)17 kV se obtuvieron señales muy eficientes de la molécula de pared celular, se encontró que la  $\mu_{ap}$  y la eficiencia son directamente proporcionales a la concentración; las señales de las 5 cepas tuvieron un comportamiento muy semejante, esto nos indicó que se trataba de la misma molécula; se estableció que la concentración 20 mM fue la más adecuada. El intervalo de amortiguamiento de fosfato de potasio es de 6.0-8.0, por eso mismo se utilizaron los valores de pH 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 y 8.0; en voltaje positivo se observó menos dispersión de las señales al utilizar pH de 8.0; con voltaje negativo se observó que la  $\mu_{ap}$  es inversamente proporcional al pH.

➤ Efecto del voltaje

Al utilizar fosfato de potasio 10 mM con pH de 8.0 y voltajes de (+)10, (+)17, (+)20 y (+)25 kV, utilizando conidias de *Trichoderma atroviride* IMI-206040; se observó que la  $\mu_{ap}$  es directamente proporcional al voltaje, encontrando que el voltaje de (+)20 kV mostró mejor eficiencia y estabilidad.

Las mejores condiciones en voltaje positivo fueron fosfato de potasio 10 mM, pH de 8.0 y (+)20 kV, no se logró separar las señales de las 5 cepas en mezcla debido a la gran dispersión de señales de las conidias; las mejores condiciones en voltaje negativo fueron fosfato de potasio 20 mM, con pH de 6.8 y voltaje de (-)17 kV, se encontró que la molécula de pared celular es la misma en las 5 cepas, y podría ser utilizada para identificación de poblaciones fúngicas.

➤ Pruebas de viabilidad

Las conidias de las 5 cepas mantuvieron su viabilidad después del proceso electroforético, el desarrollo del micelio fue irregular debido al estrés producido durante la aplicación de voltaje.

## IX. CONCLUSIONES

Al establecer las mejores condiciones en cuanto a tipo de buffer, concentración y pH, estudiando a la cepa de referencia *Trichoderma atroviride* IMI-206040 tanto en voltaje positivo como en voltaje negativo; no fue posible realizar una separación de conidias en mezcla de diferentes cepas debido a la heterogeneidad que presentan en su tamaño, forma y carga eléctrica cada conidia, sin embargo se encontró que al aplicar voltaje negativo existe una señal muy eficiente y simétrica presente en las 5 cepas, sugerimos que se trata de melanina, esta señal es muy importante porque puede servir para determinar la microbiota presente en muestras clínicas, de alimentos, ambientales, entre otras, de acuerdo a su tipo de melanina. Se propone mejorar las condiciones electroforéticas en polaridad positiva con la utilización de aditivos y llevar a cabo el análisis en ambas polaridades; de esta manera, en polaridad inversa se podrán separar e identificar los grupos de hongos presentes en una muestra y con la polaridad normal se podrán cuantificar.

Al caracterizar las conidias mediante EC, se observó que todas las conidias de las cepas de *Trichoderma* presentan un patrón semejante en su dispersión, al igual que todas las cepas de *Hypocrea* que también presentan un patrón de dispersión característico. Las características fisicoquímicas de los buffer switteriónicos no tuvieron la interacción esperada con las conidias, factor que si tuvo el buffer de fosfatos, logrando una línea base más estable y mejores señales, pero se debe tener cuidado al agregar aditivos a este buffer pues es reactivo a varias sales.

Con la técnica de electroforesis capilar acoplada a microscopio se logró observar en tiempo real la migración de las conidias a través del capilar, observando directamente que el desplazamiento no es uniforme. Se sugiere incluir un objetivo micrométrico a esta técnica para medir el desplazamiento de las conidias en un tiempo determinado así como buscar alguna partícula neutra visible al microscopio para medir el FEO, así se podrán realizar estudios de potencial zeta de una manera económica y precisa.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alexopoulos CJ, Mims CW. 1985. Introducción a la micología. 3ª ed. Ediciones Omega. Barcelona, España.
2. López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F, Castañón Olivares R. 2006. Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. 2ª edición ed. Editorial Trillas. México, D.F.
3. Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M. 2012. Special issue: *Trichoderma*-from basic Biology to Biotechnology. *Microbiology*. 158:1-2.
4. Horká M, Ruzicka F, Kubesová A, Holá V, Slais K. 2009. Capillary electrophoresis of conidia from cultivated microscopic filamentous fungi. *Analytical chemistry*. 81(10):3997-4004.
5. Desai MJ, Armstrong DW. 2003. Separation, identification, and characterization of microorganisms by capillary electrophoresis. *Microbiology and molecular biology reviews*. 67(1):38-51.
6. Horká M, Kubesová A, Salplachta J, Zapletalová E, Horký 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.
7. Hoyos-Carbajal L, Bissett J. 2011. Biodiversity of *Trichoderma* in Neotropics. En: Grillo O, Venora G, editors. *The Dynamical processes of biodiversity-Case studies of evolution and spatial distribution*. 1a ed. Rijeka, Croacia. 303-20.
8. Klein D, Eveleigh DE. 2002. Ecology of *Trichoderma*. En: Kubicek CP, Harman GE. *Trichoderma and Gliocadium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Editorial Taylor and Francis. Pennsylvania, EUA. 57-74.
9. Gams W, Bissett J. 2002. Morphology and identification of *Trichoderma*. En: Kubicek CP, Harman GE. *Trichoderma and Gliocadium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Editorial Taylor and Francis. Pennsylvania, EUA. 3-34.
10. Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek CP. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol Res*. 106(7):11.
11. Druzhinina I, Kopchinskiy. 2013. Taxonomy ISoTaG. Viena, Austria. De: <http://isth.info/>.
12. Soni KA, Balasubramanian AK, Beskok A, Pillai SD. 2008. Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media. *Current microbiology*. 56(1):93-7.
13. Fischer R, Kües U. 2006. Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. En: Esser K. *The Mycota*. 2da ed. Editorial Springer. New York, EUA. 263-92.
14. Jaklitsch WM. 2009. European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in mycology*. 63:1-91.
15. Roskov Y, Kunze T, Paglinawan L, Orrell T, Nicolson D, Culham A, Bailly N, Kirk P, Bourgoin T, Baillargeon G, Hernandez F, De Wever A. (2013). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013 Annual Checklist. Reino Unido. De: <http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/browse/tree>.
16. Robert V, Stegehuis G, Stalpers J. 2013. The MycoBank engine and related databases. De: <http://es.mycobank.org>.
17. Kirk P. 2013. Fungorum I. *Trichoderma* Pers. De: <http://www.indexfungorum.org>.
18. Kubicek Pranz EM. 2002. Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in *Trichoderma* and *Gliocadium*. En: Kubicek CP, Harman GE. *Trichoderma and Gliocadium: Basics biology, taxonomy and genetics*. Editorial Taylor and Francis. Pennsylvania, EUA. 95-119.

19. Comisión Europea. 2008. *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (formerly *T. harzianum* IMI 206040). Directorate E – Safety of the food chain. Unit E.3 – Chemicals, contaminants, pesticides.
20. Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. *The Fungi*. 2a ed. Editorial Academic Press . California, USA.
21. Klis FM, Ram AFJ, De Groot PWJ. 2007. A Molecular and Genomic View of the Fungal Cell Wall. En: Esser K. *The Mycota*. 2da ed. Editorial Springer. New York, EUA. 97-120.
22. Carzaniga R, Fiocco D, Bowyer P, O'Connell RJ. 2002. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Molecular plant-microbe interactions*. 15(3):216-24.
23. Youngchim S, Morris-Jones R, Hay RJ, Hamilton AJ. 2004. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of medical microbiology*. 53:175-81.
24. Butler MJ, Day AW. 1998. Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol*. 44:1115-36.
25. Szpoganicz B, Gidianian S, Kong P, Farmer P. 2002. Metal binding by melanins: studies of colloidal dihydroxyindole-melanin, and its complexation by Cu(II) and Zn(II) ions. *Journal of inorganic biochemistry*. 89:45-53.
26. Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Penttilä ME. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*. 29(5):877-96.
27. Bowman SM, Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 28(8):799-808.
28. Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular microbiology*. 66(2):279-90.
29. Shaw BD, Hoch HC. 2007. Ions Regulate Spore Attachment, Germination, and Fungal Growth. En: Esser K. *The Mycota*. 2da ed. Editorial Springer. New York, EUA. 219-36.
30. Girardin H, Paris S, Rault J, Bellon-Fontaine MN, Latgé JP. 1999. The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Letters in applied microbiology*. 29(6):364-9.
31. Chouaki T, Lavarde V, Lachaud L, Raccourt CP, Hennequin C. 2002. Invasive infections due to *Trichoderma* species: report of 2 cases, findings of in vitro susceptibility testing, and review of the literature. *Clinical infectious diseases*. 35:1360-7.
32. Seguin P, Degeilh B, Grulois I, Gacouin A, Maugendre S, Dufour T, Dupont B, Camus C. 1995. Successful treatment of a brain abscess due to *Trichoderma longibrachiatum* after surgical resection. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis*. 14:445-8.
33. Simonet BM, Rios A, Valcarcel M. 2008. Capillary electrophoresis separation of microorganisms. *Methods Mol Biol*. 384:569-90.
34. Castagnino JM. 2000. Electroforesis capilar. *Bioquímica*. 25(1):13-32.
35. Cázares García SV. 2009. Movilidad electroforética de células fúngicas. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.
36. García-Cañas V, Cifuentes A. 2007. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. *Electrophoresis*. 28(22):4013-30.
37. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. 2001. *Principios de análisis instrumental*. 5ta ed. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España.
38. Castillo Rodríguez MA, Revilla Vázquez AL, López Arellano R, Rivera García P. 2005. *Fundamentos de electroforesis capilar*. 1a ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
39. Lin Y, Trouillon R, Safina G, Ewing AG. 2011. Chemical analysis of single cells. *Analytical chemistry*. 83(12):4369-92.

40. 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.
41. Cázares García SV. 2007. Estudio de la Factibilidad del Análisis de Células Fúngicas por Electroforesis Capilar. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.
42. Petr J, Ryparová O, Ranc V, Hinnerová P, Znaleziona J, Kowalska M, Knob R, Maier V, Frébort I, Lemr K, Sevcík J. 2009. Assessment of CE for the identification of microorganisms. *Electrophoresis*. 30:444-9.
43. Subirats X, Blaas D, Kenndler E. 2011. Recent developments in capillary and chip electrophoresis of bioparticles: Viruses, organelles, and cells. *Electrophoresis*. 32(13):1579-90.
44. Petr J, Ryparová O, Znaleziona J, Maier V, Sevcík J. 2009. On-line combination of CE and microscopy: an insight into the migration of microorganisms. *Electrophoresis*. 30(22):3863-9.
45. Jackowski M, Szeliga J, Klodzinska E, Buszewski B. 2008. Application of capillary zone electrophoresis (CZE) to the determination of pathogenic bacteria for medical diagnosis. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 391(6):2153-60.
46. Szumski M, Klodzińska E, Buszewski B. 2009. Application of a fluorescence stereomicroscope as an in-line detection unit for electrophoretic separation of bacteria. *Microchim Acta*. 164:287-91.
47. Schneiderheinze JM, Armstrong DW, Schulte G, Westenberg DJ. 2000. High efficiency separation of microbial aggregates using capillary electrophoresis. *FEMS microbiology letters*. 189:39-44.
48. Armstrong DW, Schneiderheinze JM. 2000. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE. *Analytical chemistry*. 72:4474-6.
49. Moon G, Kim Y. 2003. Analysis of health-related microbes by capillary electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc*. 24:1203-6.
50. 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*. 29:2587-92.
51. Horká M, Ruzicka F, Kubesová A, Nemcová E, Slais K. 2011. Separation of phenotypically indistinguishable *Candida* species, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. parapsilosis*, by capillary electromigration techniques. *Journal of chromatography A*. 1218:3900-7.
52. García Aguilar L. 2009. Determinación de las características electroforéticas de células miceliales. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.
53. Avila Quintero JL. 2011. Hongos fitopatógenos aislados de cultivar de guayaba (*Psidium guajava*): Sensibilidad a fungicidas y caracterización electroforética de conidios. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.
54. Chaverri P, Castlebury LA, Overton BE, Samuels GJ. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*. 95:1100-40.
55. Good NE, Izawa S. 1972. Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol*. 24:53-68.