



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHAVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS:
**"DETERMINACIÓN DE LAS
CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS
DE CÉLULAS MICELIARES"**

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

PRESENTA:
Q. F. B. LETICIA GARCÍA AGUILAR

DIRECTORA DE TESIS:
D. C. VIRGINIA A. ROBINSON FUENTES

MORELIA MICHOACAN, OCTUBRE 2009.



PROYECTO 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” DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la D. C Virginia Robinson Fuentes, quien me inicio en la investigación y me ha brindado la oportunidad de continuar por este camino. Gracias por su amistad, confianza, enseñanzas y consejos, que han contribuido significativamente a mi experiencia como científica.

Un agradecimiento muy especial a la D. C Soledad Vázquez Garcidueñas y al D.C Gerardo Vázquez Marrufo, gracias por su amistad y motivación, experiencia y conocimientos.



A la D. C Edith Higareda Mendoza por su valiosa colaboración y tiempo.

A mis padres por su extraordinario ejemplo de vida y apoyarme en cada paso.

A mis hermanas Miriam y Viridiana por su generosidad, alegría y comprensión.

A mis niños Luis Fernando, Jimena, Samanta, Karina y Viri por brindarme su cariño y ternura.

A Erik, por ser mi luz e inspiración, gracias mi cielo.

A Zaida, mi mejor amiga y cómplice, gracias por tu sinceridad.

A mis grandiosos amigos y compañeros de laboratorio, por compartir divertidos y maravillosos momentos de convivencia, aventura y aprendizaje. Gracias Andrei, Araceli, Gaby, Idalia, Ignacio, Iliana, Juan Carlos, Lety P., Raquel, Saila y Sonia.

A Dios, por estas bendiciones

RESUMEN

Los hongos filamentosos o miceliales representan para el hombre una entidad biológica de gran impacto. Estos organismos figuran como importantes causales de enfermedades en el hombre, los animales y las plantas, a la vez que constituyen una fuente de compuestos de importancia farmacológica. El estudio de los hongos en general, se ha abordado principalmente a través de técnicas microscopia, cultivo, inmunoensayos y técnicas moleculares; sin embargo, ninguna de estas técnicas ha satisfecho todos los aspectos de la necesidad del conocimiento e identificación de estos organismos. Por lo que continua la búsqueda de técnicas alternativas que puedan aportar avances en el estudio de los hongos miceliales. La electroforesis capilar está sirviendo como una herramienta alternativa en el análisis de microorganismos, pero en general son pocos los estudios electroforéticos que se refieren a los hongos. La gran mayoría de los estudios electroforéticos se han enfocado al primordialmente a hongos levaduriformes y conidias. Por lo que éste trabajo contribuye al estudio de hongos filamentosos por electroforesis capilar. Como modelos de estudio se utilizaron a los hongos *Tricoderma atroviride* y *Neurospora crassa* ambos tienen en común que son hongos filamentosos de crecimiento rápido y no patógenos. Además, *Tricoderma atroviride* representa un importante agente de biocontrol contra fitopatógenos y *Neurospora* es el hongo filamentoso modelo para el estudio de los más diversos problemas biológicos. Para analizar el comportamiento electroforético de células miceliales se utilizaron fragmentos de hifas y germínulas de ambos hongos. En principio se buscaron las condiciones adecuadas de cultivo y fragmentación para obtener muestras de fragmentos de hifas relativamente homogéneas. Por medio de un molino de aspas y cultivos sumergidos estáticos se obtuvieron muestras de fragmentos de hifas menores a 50µm. En el análisis electroforético, los buffers de fosfatos de concentración 10 a 80mM y pH 7 permitieron una mejor observación de la migración a través del capilar de fragmentos de hifas, contenidos celulares y germínulas. Cada una de éstas proporcionó señales características.

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Introducción	1
1.2 Importancia de los hongos	4
1.3 Características generales	6
1.3.1 La pared celular	8
1.4 Descripción general de los hongos filamentosos utilizados como modelos de estudio	12
1.4.1 <i>Neurospora crassa</i>	12
1.4.2 <i>Trichoderma atroviride</i>	13
1.5 Fundamentos de electroforesis capilar	16
1.6 Origen de la carga de un microorganismo	19
1.7 Caracterización de microorganismos por electroforesis capilar	20
1.8 Estudio de hongos por electroforesis capilar	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. ESTRATEGIA	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Cultivos fúngicos	31
6.2 Cinética de crecimiento del micelio	31
6.3 Crecimiento de germínulas	31
6.4 Obtención de fragmentos homogéneos de hifas en cultivo líquido	32
6.4.1 Lisis química	32
6.4.2 Lisis mecánica	32
6.5 Electroforesis capilar	34
6.5.1 Instrumentación	34
6.5.2 Condiciones	34
6.5.3 Preparación de la muestra	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Cinética de crecimiento de <i>Neurospora crassa</i>	35
7.2 Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	40
7.3 Crecimiento de germínulas de <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Neurospora crassa</i>	44
7.4 Obtención de fragmentos homogéneos de hifas en cultivo líquido	48
7.4.1 Lisis química	48
7.4.2 Lisis mecánica	51
7.5 Electroforesis capilar para fragmentos de hifas	57
7.6 Electroforesis capilar en germínulas	71
8. RESUMEN DE RESULTADOS	74
9. CONCLUSIONES	75
10. PERSPECTIVAS	76
11. REFERENCIAS	77



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Resumen de actividades de los hongos	5
2	Morfología y componentes estructurales de células fúngicas	6
3	Ciclo de vida de hongos filamentosos	7
4	Organización de la pared celular fúngica	8
5	Estructuras químicas de los principales compuestos que integran de la pared celular fungica.	11
6	Componentes básicos de un sistema de electroforesis capilar	16
7	Flujo electrosmótico	18
8	EFG que ilustra los cálculos de resolución y eficiencia	18
9	EFG que muestra la separación de <i>S. cerevisiae</i> y tres bacterias <i>P. fluorescens</i> , <i>E. aerogenes</i> y <i>M. luteus</i>	20
10	EFG que muestran la separación simultanea <i>B. infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>S. cerevisiae</i>	21
11	EFG que muestran los diferentes tiempos de migración de <i>S. saprophyticus</i> y <i>E. coli</i> ,	22
12	EFG de muestras de hojuelas de maíz y jugo	24
13	EFG de <i>Botriosphaerea rodina</i> y <i>Trichoderma sp</i>	26
14	Fotografías en microscopio óptico de muestras de micelio durante la cinética de crecimiento de <i>Neurospora crassa</i>	37
15	Fotografías en microscopio óptico de muestras de micelio durante la cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	42
16	Fotografías en microscopio óptico de germínulas para <i>Neurospora crassa</i>	46
17	Fotografías en microscopio óptico de germínulas de <i>Trichoderma atroviride</i>	47
18	Fotografías al microscopio óptico de <i>Neurospora crassa</i> y <i>Trichoderma atroviride</i> en el tratamiento con surfactantes.	50
19	Muestras tomadas de la masa primaria de micelio en cultivo estándar después de 24 y 48h de incubación para <i>Neurospora crassa</i> y <i>Trichoderma atroviride</i>	54
20	Formas dispersas de micelio en un cultivo estándar de <i>Neurospora crassa</i> y <i>Trichoderma atoviride</i> .	55
21	Matraces de cultivo sumergido incubados en agitación continua a 120rpm e incubación estática	55
22	Muestras de micelio de cultivos sumergidos incubados estáticos	56
23	Fragmentos de micelio de cultivos estáticos obtenidos con molino de aspas	56
24	Diversidad de los fragmentos de micelio en una muestra	61
25	EFG de las hifas de <i>Neurospora crassa</i> que migraron a través del capilar	62
26	EFG de las hifas de <i>Trichoderma atroviride</i> que migraron	62
27	EFG de las hifas vacías de <i>Trichoderma atroviride</i> que migraron a través del capilar	62
28	EFG de las hifas vacías de <i>Neurospora crassa</i> que migraron a través del capilar	63
29	Algunos de los contenidos celulares recuperados después del proceso electroforético en distintas condiciones	64

30	Esquemas de migración propuestos para los componentes celulares de <i>Trichoderma atroviride</i> y <i>Neurospora crassa</i> .	65
31	EFG de contenidos celulares de <i>Trichoderma atroviride</i> , migración de los componentes como paquetes de partículas	65
32	EFG de contenidos celulares de <i>Neurospora crassa</i> , migración de los componentes como paquetes de partículas	66
33	EFG de contenidos celulares de <i>Trichoderma atroviride</i> , migración y separación por componentes	66
34	EFG de contenidos celulares de <i>Neurospora crassa</i> , migración y separación por componentes	67
35	EFG de contenidos celulares de <i>Neurospora crassa</i> y <i>Trichoderma atroviride</i> , diferencias en sus espectros de absorción	67
36	EFG del efecto del pH de los contenidos celulares de <i>Trichoderma atroviride</i> .	68
37	EFG del efecto del pH de los contenidos celulares de <i>Neurospora crassa</i>	68
38	EFG de los contenidos celulares de <i>Trichoderma atroviride</i> sobre el efecto de la concentración del buffer	69
39	EFG de los contenidos celulares de <i>Neurospora crassa</i> del efecto la concentración del buffer	70
40	EFG de germínulas de <i>Trichoderma atroviride</i>	72
41	Fotografías al microscopio óptico de germínulas de <i>Trichoderma atroviride</i> después de su análisis electroforético	72
42	Espectro de absorción de germínulas de <i>Trichoderma atroviride</i> .	72
43	EFG de germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	73
44	Espectro de absorción de germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	73
45	Fotografías al microscopio óptico de germínulas de <i>Neurospora crassa</i> , después del análisis electroforético	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

1	Condiciones experimentales de estrés mecánico	33
2	Biomasa generada durante la cinética de crecimiento de <i>Neurospora crassa</i>	39
3	Grosor de las hifas de <i>Neurospora crassa</i> durante la cinética de crecimiento	40
4	Biomasa generada durante la cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	43
5	Grosor de las hifas durante la cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	44
6	Longitud de las germínulas de <i>Trichoderma atroviride</i>	45
7	Longitud de las germínulas de <i>Neurospora crassa</i>	45
8	Reporte de resultados de los experimentos de fragmentación por métodos de estrés mecánico	52
9	Condiciones de concentración y pH del buffer ensayadas en ambos hongos	60

ÍNDICE DE GRÁFICOS

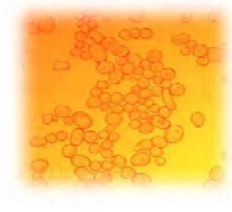
Grafica

1	Cinética de crecimiento de <i>Neurospora crassa</i>	36
2	Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma atroviride</i>	41

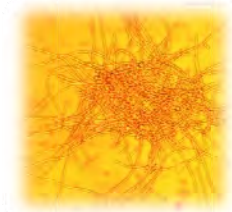
ABREVIATURAS

DI	Diámetro interno
EC	Electroforesis capilar
EFG	Electroferograma
EOF	Flujo electrosmótico
KV	Kilo volts
L_d	Longitud al detector
L_T	Longitud total
LIF	Fluorescencia inducida por laser
M	Micelio
MO	Microorganismo
μ	Velocidad de crecimiento
N	Platos teóricos
PDA	Agar papa dextrosa
PDB	Caldo papa dextrosa
R_s	Resolución
SDS	Dodecil sulfato de sodio
t_d	Tiempo de duplicación
t_{in}	Tiempo de incubación
t_m	Tiempo de migración
$W_{1/2}$	Ancho del pico a la mitad
W_b	Ancho del pico en la base





DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES



1. MARCO TEÓRICO

1.1 Introducción

Durante la década pasada la Electroforesis Capilar (EC) ha sido desarrollada como una técnica estándar en múltiples disciplinas. La química, biología, biotecnología y microbiología, entre muchas otras, se han servido de ésta para el análisis de una amplia variedad de moléculas, con o sin carga. Las distintas modalidades de electroforesis capilar han permitido el estudio de carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, iones, moléculas de interés clínico y farmacológico, y recientemente entidades biológicas tales como células y microorganismos.

La EC es una poderosa herramienta analítica que permite separaciones rápidas y altamente eficientes. Sin duda una de sus mayores cualidades es su capacidad para el análisis de gran diversidad de analitos en matrices complejas con un mínimo de preparación y consumo de muestra; y aunque es predominantemente usada para el análisis de moléculas, recientemente ha posibilitado la separación, identificación y cuantificación de microorganismos [Armstrong et al, 2001; Desai et al, 2003]. Además, usando EC han posibilitado el estudio de propiedades de las superficies de células microbianas con el fin de obtener información de la manera en que se comportan e interactúan con el medio ambiente [Burtkus, 2003]. Las propiedades superficiales proporcionan información sobre la composición celular, sus puntos isoeléctricos, velocidad con la que captan nutrientes y fármacos antimicrobianos del medio, adhesión a diferentes superficies o su aglutinación [Berthod et al, 2002; Lytle et al, 1999; Pointevin et al, 2007; Van Der Mei et al, 2001]. A través de estos estudios se pueden hacer modificaciones que permitan aprovechar mejor las propiedades de tales microorganismos.

Es bien sabido que a lo largo de las últimas décadas, la patología fúngica ha experimentado un considerable aumento, esto debido a diversos factores como cambios climato-ecológicos, socio-económicos, migratorios, uso y abuso de antibióticos, pacientes inmunodeprimidos (por VIH, trasplantes, procesos cancerosos, etc.), o la realización de una medicina cada vez más agresiva

[Mayayo, 2004]. Es por esto que ahora se requiere que los ensayos microbiológicos sean más rápidos, más sensibles y más selectivos. Varios autores se han enfocado a estudiar la posibilidad de analizar los microorganismos como células usando diferentes técnicas tales como los inmunoensayos, fluorescencia y PCR, además de diversas técnicas moleculares [Orbera, 2004; Yeo and Wong, 2002]. Todas estas técnicas instrumentales, que pueden considerarse sofisticadas se están volviendo cada vez más comunes por las razones antes descritas; sin embargo, no podrán sustituir las técnicas tradicionales que involucran cultivos, microscopia, etc. pero si representan una herramienta para el diagnóstico rápido de microorganismos. Toda vez que se ha observado la posibilidad de utilizar la EC para estudiar las propiedades superficiales de las células microbianas, se vio que era posible analizarlos directamente de diferentes muestras. Actualmente, la EC y los dispositivos de análisis de microfluidos representan los métodos de ensayo microbiológico más prometedores [Desai et al, 2003]. Sakamoto y cols. [2005] reportaron un sistema de cuantificación rápido y simple para el conteo de bacterias en muestras en cultivo y ambientales. Las cuentas bacterianas obtenidas fueron similares a aquellas que se obtuvieron por microscopia directa, con la diferencia que con este método, que incluye un dispositivo de microfluidos, donde se analizaron 6 muestras en 30 min. Girod y Armstrong [2002] obtuvieron picos muy bien definidos por EC en la separación de dos bacterias y de una levadura que generalmente se adicionan como suplementos en alimentos. En otro estudio, Armstrong y Schneiderheinze [2000] pudieron distinguir los patógenos responsables de la mayor parte de las infecciones de tracto urinario, inyectando en el instrumento orina sin tratar. Palenzuela y cols. [2004] desarrollaron un método para la separación de bacterias que contaminan alimentos. Para lograr una mejor resolución, usaron iones calcio y mioinositol y de esta manera pudieron analizar 8 diferentes tipos de bacterias en tan solo 25 min.

En general, son pocos los estudios electroforéticos que se refieren a la determinación de células microbianas, bacterias y virus, y casi nulos los que se refieren a células fúngicas. Aunque, para estas últimas, existen varios estudios en los que se utiliza EC con otras técnicas moleculares; estos se enfocan en analizar

los productos de PCR o metabolitos [Margraf et al, 2004; De Beare et al, 2005; Lim et al, 2001]. Entre estos, de los pocos estudios electroforéticos que analizan exclusivamente hongos como células, solo se reportan trabajos con hongos levaduriformes [Bao et al, 2008, Girod y Armstrong, 2002].

Si bien son de suma importancia los estudios sobre hongos levaduriformes, también tomemos en cuenta que los hongos filamentosos representan importantes patógenos, alternativas en la terapéutica, alternativas en fitoremediación, la producción de antibióticos, la industria alimenticia, etc. [Alexopoulos et al, 1996; Herrera y Ulloa, 2004; Lindequist, 2005; Ruan-Soto et al, 2006]. Por ello es importante toda información que pueda conducir al conocimiento de sus propiedades, tales que permitan suponer su comportamiento e interacción biológica. En este sentido la electroforesis capilar pudiera representar una valiosa herramienta para el estudio de los hongos filamentosos. Cazares [2007], ha sido la única en demostrar que es factible el análisis por electroforesis capilar de hongos filamentosos, esto en *Botriosphaerea rodina* y *Trichoderma sp.* Sin embargo, es necesario explorar más condiciones necesarias para llevar a cabo estudios electroforéticos aplicados. Partiendo de esta premisa, este trabajo pretende aportar mayor información acerca del comportamiento electroforético de hongos filamentosos.

1.2 Importancia de los hongos

Los hongos constituyen un grupo muy diverso de microorganismos que ocupan numerosas posiciones ambientales. Representan para el hombre una entidad biológica de gran impacto, que lo beneficia y/o perjudica directa o indirectamente (Fig.1).

La relación perjudicial y benéfica de los hongos con el hombre y su entorno puede verse desde diversos ángulos. Estos organismos son responsables de enfermedades (micosis) potencialmente peligrosas para el ser humano, animales y plantas. Las micosis en humanos y animales abarcan graves infecciones sistémicas y/o cutáneas (Ej. histoplasmosis y candidiasis), respuestas alérgicas y envenenamiento por micotoxinas [Murray et al, 1999; Yeo y Wong, 2002]. Además, aunque la mayoría de las enfermedades conocidas en las plantas son causadas por hongos, ambos pueden establecer relaciones ampliamente beneficiosas, a través del intercambio de materiales esenciales para el desarrollo de ambos [Alexopoulos et al, 1996; Herrera y Ulloa, 2004].

Los hongos son los principales responsables de la desintegración de la materia orgánica y como tales contribuyen al deterioro de los alimentos, productos textiles y diversos materiales sintéticos. Pero también numerosas especies son consumidas regularmente por su sabor y cualidades nutricias, en México y alrededor del mundo [Ruan-Soto et al, 2006]. Los hongos constituyen la base de varios procesos industriales, intervienen en la elaboración del pan, diversas bebidas alcohólicas (Ej. tempe, vino), quesos y otros productos a través de la fermentación y producción de diversas cetonas, aldehídos y ácidos orgánicos que aparecen como consecuencia de sus actividades metabólicas [Alexopoulos et al, 1996; Herrera y Ulloa, 2004]. De manera sobresaliente los hongos se utilizan para la producción de esteroides, antibióticos y otros compuestos de importancia farmacológica. Por ejemplo, los antibióticos penicilina y cefalosporina son producidos por los hongos filamentosos *Penicillium chrysogenum* y *Aspegillus chrysogenum*, respectivamente; y diversos nucleosidos, producidos por *Lentinus*

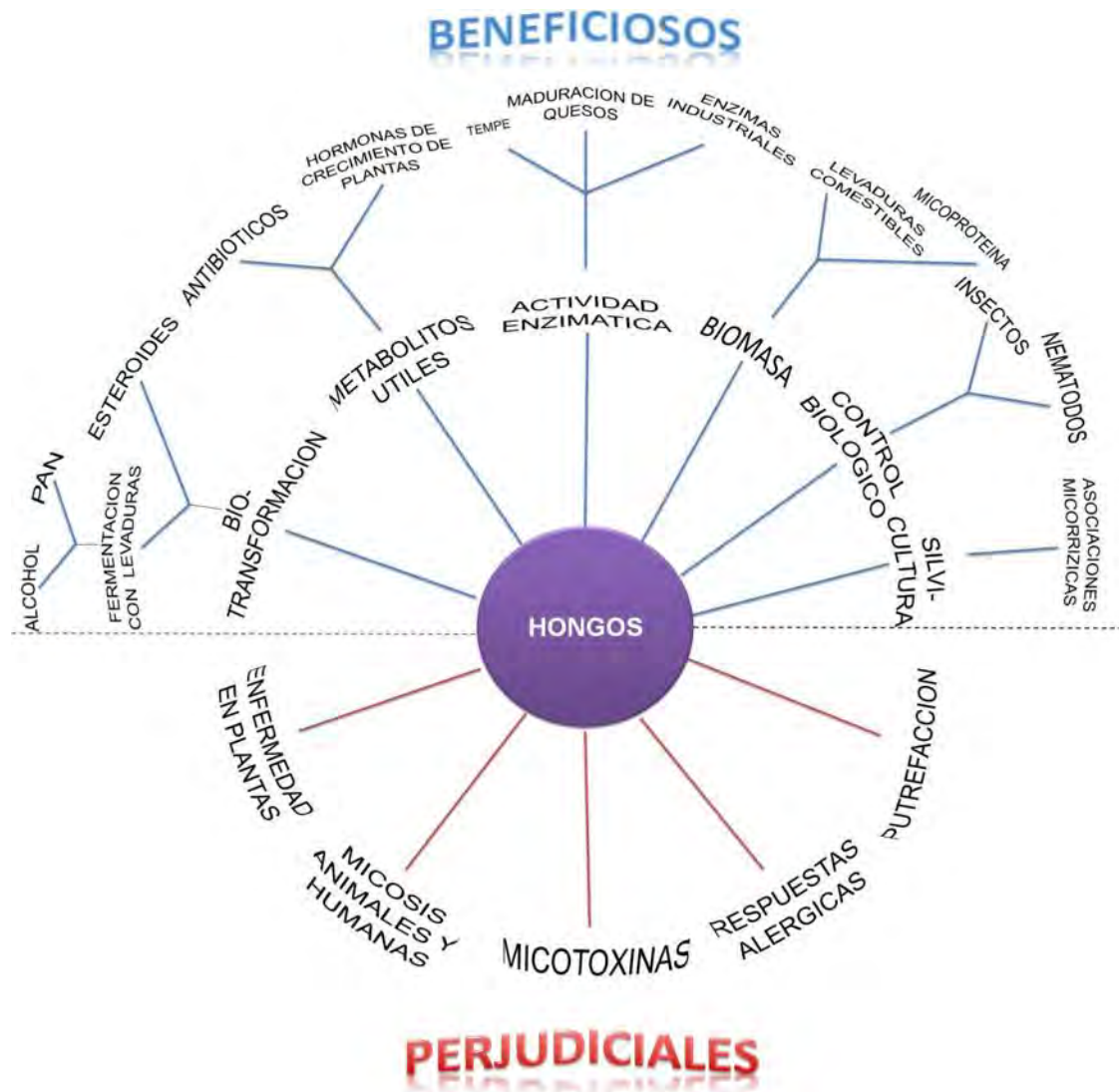


Figura 1. Resumen de actividades de los hongos (Esquema basado en Alexopoulos et al, 1996).

sp y sesquiterpenos de *Pleurotellus sp*, se producen por su efecto antifúngico y antiviral [Brizuela et al, 1998; Gutiérrez, 2000]. Además de los compuestos de hongos que se producen extensamente a nivel comercial, extractos de polisacaridos obtenidos de *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa* y *Schizophyllum commune* (entre muchos otros) han mostrado actividad antitumoral e inmunoestimulante contra diferentes tipos de cáncer [Dabba y Ezeronye, 2003; Lindequist, 2005; Lull et al, 2005].

Finalmente, los hongos se consideran importantes modelos científicos para el estudio de procesos biológicos fundamentales en genética, bioquímica, relaciones entre parásitos y huéspedes, etc. [Alexopoulos et al, 1996; Murray et al, 1999].

1.3 Características generales

Los hongos se definen como organismos eucariotes que no poseen clorofila, portan esporas y pueden reproducirse de manera sexual y/o asexual. Debido a que no poseen clorofila viven como saprófitos, simbioses, comensales o parásitos. Morfológicamente presentan dos formas básicas: la unicelular o levadura y la multicelular o filamentosa (Fig.2). La mayoría de los hongos son de ordinario filamentosos, estos se describen como tubos cilíndricos de longitud variable que pueden presentar ramificaciones. Individualmente a cada uno de estos filamentos tubulares se le denomina hifa y al conjunto de éstas, micelio [Alexopoulos, 1996; Herrera y Ulloa, 2004; Murray et al, 1999].

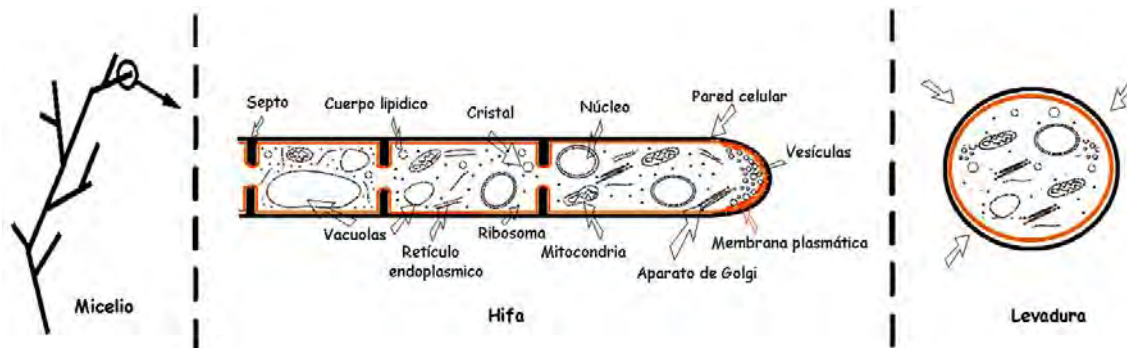


Figura 2. Morfología y componentes estructurales de los hongos.

<https://eapbiofield.wikispaces.com/file/view/hypha.gif>

Ultraestructuralmente (Fig.2) los hongos poseen un citosol complejo que contiene básicamente vesículas, microtúbulos, ribosomas, mitocondrias, aparato de Golgi, un retículo endoplásmico de doble membrana y núcleos rodeados por una membrana nuclear. El citosol se encuentra rodeado por una membrana plasmática, formada por glúcoproteínas, fosfolípidos y ergosterol. Inmediatamente por fuera de ésta los hongos poseen una pared celular rígida y formada por múltiples capas. La pared celular es estructural y bioquímicamente compleja y se

tratará a detalle en el siguiente apartado. El citoplasma de las hifas está interrumpido a intervalos regulares por paredes transversales, que dividen a cada hifa en compartimientos o células. Estos tabiques transversales se denominan septos y se forman por crecimiento centrípeto desde la pared hifal hacia la parte interna. Las hifas pueden ser septadas y aseptadas o cenocíticas [Alexopoulos, 1996; Herrera y Ulloa, 2004; Murray et al, 1999].

Por su función el micelio se clasifica en: micelio vegetativo (también llamado de nutrición, se encarga de la absorción y transformación de nutrientes), y micelio reproductivo o aéreo (la porción que se proyecta por encima del sustrato, se encarga de soportar las estructuras y formas de reproducción) [Bonifaz, 2002]. En general el micelio se reproduce cuando las hifas aumentan su longitud mediante crecimiento apical, por lo que un fragmento diminuto de cualquier parte del hongo es capaz de producir un nuevo punto de crecimiento y dar origen a un nuevo individuo [Ruiz-Herrera, 2001]. Además de esta forma de propagación, llamada reproducción asexual somática, los hongos se reproducen también asexualmente, por medio de conidias producidas por meiosis; y para la reproducción sexual, los hongos forman uniones de hifas (plasmogamia), cariogamia y mitosis, para producir esporas o micelio somático [Herrera y Ulloa, 2004].

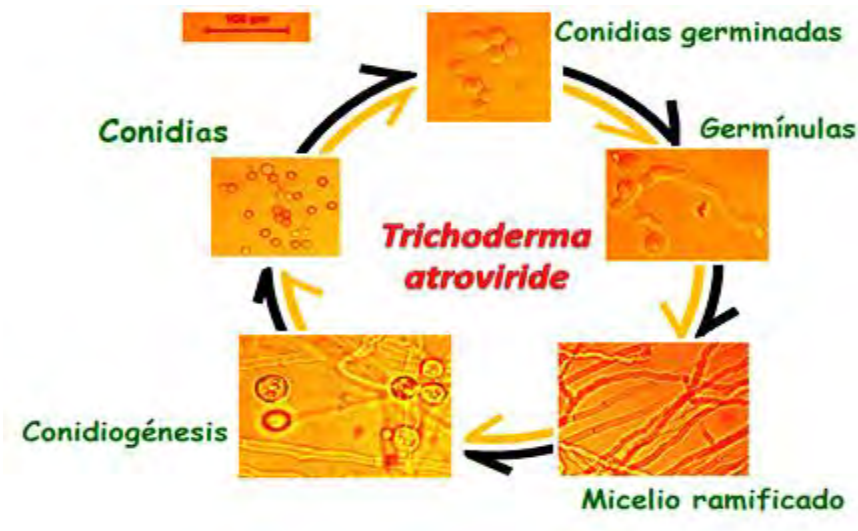


Figura 3. Etapas del ciclo de vida (asexual) de hongos filamentosos, las imágenes ilustran el ciclo del hongo *Trichoderma atroviride*, (fotografías en el microscopio Leica DLMB, 40x)

1.3 1 La pared celular

La principal característica que distingue a los hongos de otros organismos es su pared celular. La pared celular de los hongos está compuesta por capas multilaminadas embebidas en una matriz gelificada de glucopolisacáridos (Fig. 4). Las laminillas que la integran están formadas por fibrillas diversamente orientadas, que se componen principalmente por polisacáridos, pero lípidos, proteínas y otras sustancias constituyen también la pared celular [Alexopoulos, 1996; Neil, 1995]. La composición y estructura de la pared celular es muy parecida tanto en hongos filamentosos como en levaduras [Latgé JP, 2007; Pitarch et al, 2008]

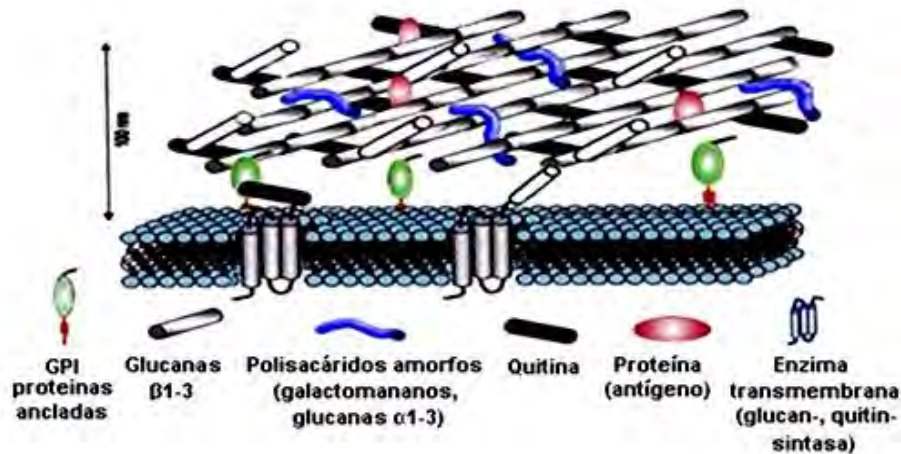


Figura 4. Organización de la pared celular fúngica.
www.pasteur.fr/.../RAR/RAR2003/Aspergil-en.html

La forma de una célula fúngica es la forma de su pared, ya que la rigidez y fuerza mecánica de sus paredes permite que el hongo asuma una gran variedad de formas, tales como hifa ramificada, penetrativa, célula de levadura proliferante, esporas de muchas formas y tamaños, etc. La constitución física y química de la pared da protección al citoplasma contra gran número de estresores ambientales, tales como medios con grandes diferencias osmóticas, radiación ultravioleta, lisis enzimática, solventes orgánicos, químicos tóxicos y desecación [Neil, 1995; Ruiz-Herrera, 1997]. La superficie externa de la pared celular es la interfase primaria entre la célula y su medio ambiente, y de ninguna manera se considera una estructura estática, pues esta transmite al citoplasma la información necesaria que

permite regular respuestas positivas o negativas de un sinúmero de funciones como crecimiento, división nuclear, liberación de diversas enzimas líticas, ramificaciones y formación de estructuras especializadas (haustorios, rizoides, etc.), además es el sitio de antígenos y moléculas involucradas al acoplamiento y adhesión a sustratos, huéspedes y otras células [Latgé, 2007; Neil, 1995; Ruiz-Herrera, 1997].

En su mayor parte, las paredes celulares de los hongos están constituidas de polisacáridos que comprenden típicamente cerca del 80% de su peso seco [Farkas, 1979]. Las proteínas están presentes en baja proporción, aproximadamente del 3 al 20%, y en cantidades más pequeñas lípidos, pigmentos y sales inorgánicas [Ruiz-Herrera, 1997]. Cabe destacar que la composición química no es la misma en todos los hongos, pero las regularidades observadas entre éstas sirven como un importante criterio para fundamentar relaciones entre distintos grupos de hongos [Adams, 2004; Alexopoulos, 1996; Pontón, 2008].

El carbohidrato más abundante es la glucosa, en forma de α - y β -glucanas, seguida muy de cerca por la N-acetilglucosamina (o quitina), ambos azúcares están estrictamente presentes en todas la paredes celulares de los hongos. Otros carbohidratos encontrados regularmente en casi todas las paredes celulares son lactosa y manosa; mientras que, galactosamina, quitosana, ácido glucurónico, ramnosa y xilosa estan presentes en menor cantidad en grupos taxonómicos selectos. Además, en taxones muy específicos y en cantidades traza, se han encontrado arabinosa, fucosa y ribosa [Neil, 1995; Ruiz-Herrera, 1997]. Todos estos carbohidratos forman diversas y características combinaciones de polisacáridos, por ejemplo, la quitina representa del 1-2% (peso seco) de la pared celular de las levaduras, mientras que en los hongos filamentosos puede haber desde un 10 al 20%, o las α -glucanas que se encuentran en *Schizosaccharomyces*, pero no se conoce en otras levaduras [Pitarch et al, 2008; Pontón, 2008].

El polisacárido más característico de las paredes celulares fúngicas es la quitina, pero las β -glucanas son sus mayores constituyentes (Fig. 5). La quitina es

un polímero no ramificado hecho de N-acetilglucosamina unida por enlaces de puentes de hidrógeno β -1, 4 y de la misma forma que otros polisacáridos ésta se une covalentemente a otras cadenas de glucanas u otros polisacáridos adyacentes formando fibras con arreglos antiparalelos. Las β -glucanas comprenden polímeros de glucosa β -1,4 (celulosa), glucosa β -1,6, y glucanas β -1,3; α -1,3 y α -1,4 [Ruiz-Herrera, 1997]. Las β -glucanas son las principales responsables de la fuerza mecánica que posee la pared celular [Farkas, 1979; Pontón, 2008].

Las proteínas que conforman la pared celular de los hongos pueden tener un rol estructural o funcional. Básicamente las proteínas estructurales son componentes esenciales de matriz de la pared celular y están covalentemente unidas a polisacáridos, formando complejos de glucopolisacáridos, como manoproteínas, galactomanoproteínas, glucanoproteínas, xilomanoproteínas, etc. [Latgé, 2007; Neil, 1995; Ruiz-Herrera, 1997]. Entre las proteínas no estructurales se han encontrado diversas especies de proteínas involucradas en funciones de transporte de Ca^{++} o fosfato, proteínas de fenómenos de reconocimiento (acoplamiento e invasión al huésped), glicoproteínas como enzimas responsables de la formación de heterocarión, enzimas líticas, de liberación y dispersión de esporas, etc. [Pontón, 2008; Ruiz-Herrera, 1997]. Entre estas proteínas podemos mencionar por ejemplo, las variedades de enzimas quitinasas y glucanasas producidas por *Trichoderma*, que son capaces de atacar los polímeros de la pared celular de otros hongos; o las glucanasas producidas por *Saccharomyces cerevisiae*, que hacen posible la separación celular durante su reproducción [Adams, 2004]. También podemos mencionar diversas adhesinas e hidrofobinas que intervienen en el proceso de interacción con el huésped, producidas por *Pleurotus sp* y *Cladosporium fulvum*, entre muchos otros hongos [Peñas et al, 2002; Ruiz-Herrera, 2001].

Los lípidos son componentes minoritarios de las paredes celulares de los hongos, sus concentraciones varían de 1 al 10% del peso seco de la pared celular. Los lípidos más comunes encontrados hasta ahora son los ácidos grasos C_{16} y

C₁₈, el ácido mirístico, el oleico, ácido palmítico, esteroides, ésteres de esteroles, triglicéridos, fosfatidil serina, ácidos grasos libres y fosfolípidos. Aunque todavía no se han revelado características importantes de los lípidos en la pared celular, se piensa que éstos ayudan a mantener la rigidez y proteger esencialmente de la desecación a las paredes celulares [Ruiz-Herrera, 1997].

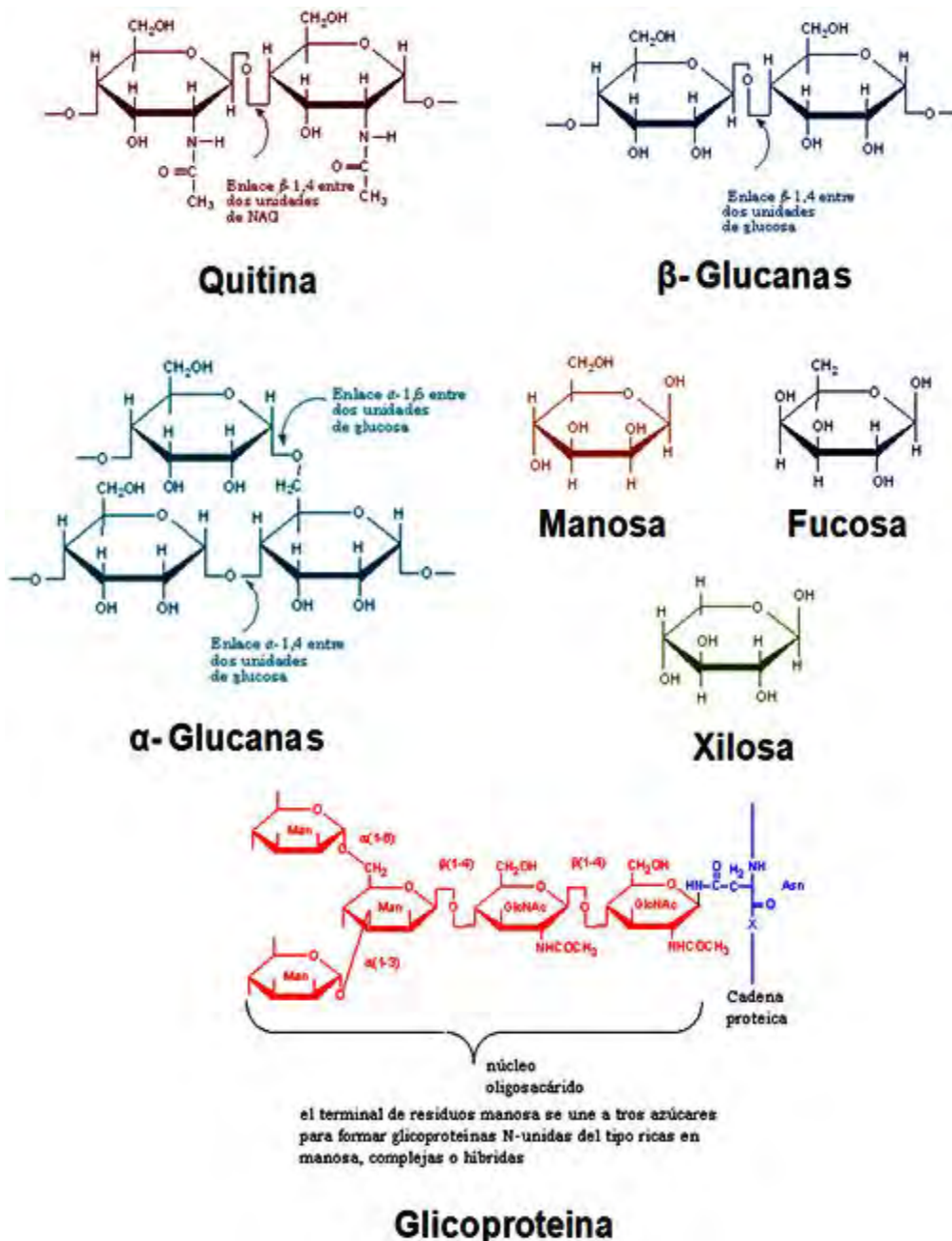


Figura 5. Estructuras químicas de los principales compuestos que integran la pared celular fúngica [www.uib.es/.../modulos/modulo6/quitina.gif].

Los otros componentes de la pared celular de los hongos incluyen, muy pequeñas cantidades de pigmentos y sales inorgánicas. Los pigmentos pueden acumularse en distintas capas de la pared de hifas, esporas o estructuras fúngicas especializadas (ej. esporangióforos). En general, los pigmentos proporcionan fuerza mecánica, protección contra estrés por luz ultravioleta o radiación solar, desecación y lisis enzimática. Entre los pigmentos más comunes de los hongos se encuentran las melaninas (producidas por la polimerización oxidativa de diferentes polifenoles) y las esporopoleninas (polímeros oxidados de carotenoides) [Neil, 1995; Ruiz-Herrera, 1997].

Aunque escasamente estudiado, diversos estudios muestran de presencia de componentes inorgánicos. El análisis de cenizas de preparaciones de pared celular de diferentes hongos revelan su presencia, en un 1.5 al 5% de su peso seco; estudios de rayos X y fluorescencia han encontrado Ca, K, Fe, Cl, Si, Cu, Cr, Al, Be, Mn y Na, en cantidades traza [Neil, 1995; Ruiz-Herrera, 1997].

1.4 Descripción general de los hongos filamentosos utilizados como modelos de estudio

1.4.1 *Neurospora crassa*

Neurospora es un organismo favorecido para la investigación de una gran variedad de problemas biológicos y un organismo modelo básico entre los hongos filamentosos; ha sido utilizado para el estudio de infinidad de mecanismos genético y bioquímico –moleculares, tales como: ciclos circadianos [Brunner y Káldi, 2008; Liu et al, 2003], fototropismo [Liu et al, 2006], actividad enzimática [Fuks et al, 2003; Klanner, 2001], conidiación [Kays et al, 2000], germinación [Pandey et al, 2004], morfogénesis [Seiler y Plamann; 2003], síntesis de pared celular de hongos [Bhanoori y Venkateswerlu, 2000], huellas genéticas [Borkovich, 2004], genoma [Galagan et al, 2003], dinámica celular [Hickey et al, 2002; Zhang, 2002], etc. Para profundizar en cualquiera de estos temas podemos referirnos a una vasta literatura, en este trabajo solo es necesario destacar, que *Neurospora*

crassa fue elegido como modelo de estudio por ser un hongo filamentosos de crecimiento rápido y no patógeno.

Neurospora crassa es un hongo naranja y cuyo genoma ha sido secuenciado por completo [Galagan et al, 2003]. Su cultivo es económico y sus requerimientos nutricionales simples, crece en variados medios de cultivo, pero entre los más utilizados se encuentran el medio mínimo o suplementado Vogel y el medio papa dextrosa [Schmith et al, 1975]. En agar papa dextrosa *Neurospora* se desarrolla rápidamente (hasta 10cm/día) [www.fgsc.net], como un micelio blanco y algodonoso; después de 24h el color naranja característico aparece a consecuencia de la gran producción de conidias pigmentadas por carotenos [Turian y Bianchi, 1972]. Estudios tempranos por microscopia electrónica y ensayos enzimáticos en este hongo revelaron que su pared celular está compuesta por quitina, polímeros de galactosamina y mayoritariamente fibras de glucanas (α y β) [Mahadevan y Tatum, 1967; Shatkin, 1959], ensayos posteriores por técnicas como cromatografía de líquidos y gases, confirmaron estos componentes y reportaron otros componentes minoritarios como manosa, ácidos urónicos y algunos aminoazúcares [Cardemil y Pincheira, 1979].

En el laboratorio, *Neurospora crassa* es el modelo experimental por excelencia de hongos filamentosos; en más de un siglo de observación y experimentación el género nunca ha sido implicado en la enfermedad humana u observado que cause enfermedad en animales o plantas. Además, no se conoce ningún metabolito secundario tóxico producido por ninguna de las especies y la literatura médica ha determinado que es totalmente benigno en términos de potencial infeccioso o alergénico [Perkins y Davis, 2000].

1.4.2 *Trichoderma atroviride*

El género *Trichoderma* está integrado por un gran número de cepas fúngicas que se caracterizan por ser simbiontes avirulentos de plantas, se encuentran en suelos, y principalmente se aíslan de bosques y tierras de cultivo. *Trichoderma* ostenta importancia económica, pues es uno de los géneros más

usados como agentes de control biológico contra fitopatógenos [Ezziyyani, et al, 2004].

Trichoderma atroviride es frecuentemente reportado en la literatura por sus diversas actividades biológicas y bioquímicas. *Trichoderma atroviride* es un hongo filamentoso de crecimiento relativamente rápido en múltiples medios de cultivo enriquecidos, como agar nutritivo especial (SNA) y agar papa dextrosa (PDA), a una temperatura óptima entre 25-30°C. En PDA después de 24h la colonia mide aproximadamente 10mm y siempre esta agudamente delimitada, a las 96 h puede observarse un disco central donde se forman conidias; la colonia miceliar es blanca y presenta un dulce olor a coco [Samuels, 2008].

Trichoderma atroviride se reproduce por crecimiento apical de las hifas y por medio de conidias. Las conidias son típicamente verdes, de forma globosa a subglobosa y de textura lisa, éstos aparecen dentro de 57-66h [Samuels, 2008]. Pero, sí se expone a luz azul forma un anillo de conidias en el perímetro que la colonia tenía al tiempo de la exposición [Rosales-Saavedra et al, 2006]. El dulce olor de la colonia miceliar que ayuda a reconocer a *Trichoderma atroviride* es el olor a coco del antibiótico antifúngico 6-pentil-a-pirona [Dodd 2003].

Trichoderma atroviride al igual que otros miembros del género, se utilizan como agentes de biocontrol, estos actúan contra los fitopatógenos a través de tres mecanismos fundamentalmente: 1) competencia directa por el espacio o por los nutrientes, 2) producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Ej. enzimas hidrolíticas como glucanasas, quitinasas, etc.) y 3) parasitismo directo sobre determinadas especies de hongos fitopatógenos. Durante el micoparasitismo, estos tres mecanismos no son excluyentes sino que actúan sinérgicamente en el control de los patógenos [Brunner et al, 2005; Hermosa et al, 2000; Rey et al, 2000; Rocha-Ramírez et al, 2002]. El éxito de las cepas de *Trichoderma* como agentes de biocontrol se debe a su gran capacidad reproductiva, su habilidad para sobrevivir a condiciones muy desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes y fuerte agresividad contra hongos

fitopatógenos, y además a la eficiencia en promover el crecimiento de plantas y mecanismos de defensa [Benítez et al, 2004].

En particular, la cepa *Trichoderma atroviride* ha mostrado ser un excelente agente de biocontrol contra diversos cultivos. Su aplicación en cultivos de plátano ha mostrado que disminuye significativamente la infección en la planta, por el nemátodo *Radopholus similis*; además, las plantas inoculadas con el hongo mostraron mayor sanidad en general de raíces y hojas [Pocasangre et al, 2006]. En hojas y raíces del Kiwi disminuyó la infección por *Botrytis cinérea* [Dodd et al, 2004], también en patatas de campo contra el patógeno *Rhizoctonia solani* y cuando se aplicó como tratamiento en la semilla de trigo ha previsto buena protección contra *Fusarium culmorum* [Dodd et al, 2003].

1.5 Fundamentos de electroforesis capilar

La electroforesis capilar es un método de separación que se basa en las diferencias de la velocidad de migración de especies cargadas, sometidas a un campo eléctrico. Los componentes básicos de un sistema de electroforesis incluyen una fuente de voltaje (que proporcione hasta 60 KV), un capilar de sílice fundida con un diámetro interno de menor a 200 μm , 2 reservorios con buffer donde se introducen cada uno de los extremos del capilar y un par de electrodos (platino), también en cada extremo, conectados a la fuente de voltaje, y un detector (Fig. 6). El capilar es llenado con el buffer al pH deseado, la muestra se diluye en buffer para ser introducida en capilar y se aplica el voltaje, entonces las especies iónicas de la muestra migran a través del capilar de acuerdo a su movilidad electroforética. Eventualmente las moléculas pasan por el detector (UV, LIF) y se registra la señal del detector. Dicha señal analítica se conoce como electroferograma (EFG). La movilidad electroforética es una propiedad característica de cada partícula y está determinada por su carga y masa. Puede calcularse a partir de la teoría de Debye-Huckel-Henry (Ec. 1), donde la movilidad está dada por la carga de la partícula (q), la viscosidad del buffer (η) y el radio de Stokes la partícula (γ) [Altria, 1999; Linhardt y Toida, 2002].

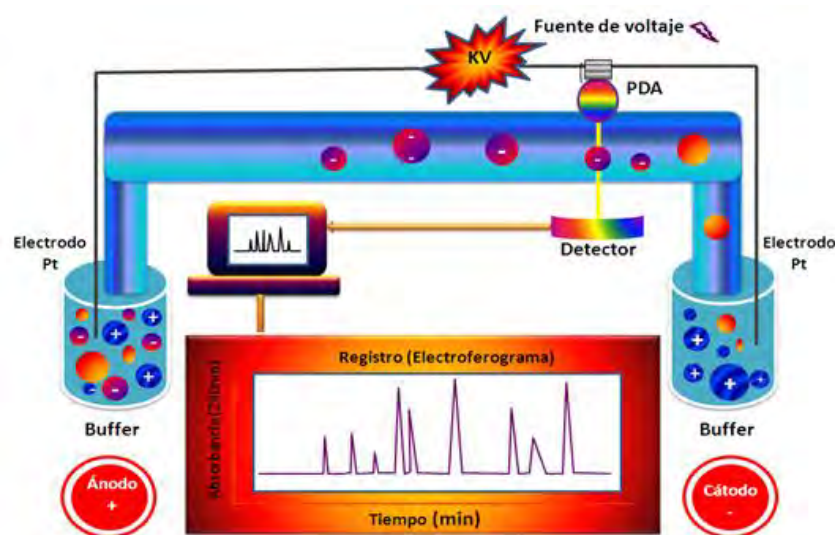


Figura 6. Componentes básicos de un sistema de electroforesis capilar

En la práctica, la movilidad electroforética ($\mu_{ep} = \text{cm}^2/\text{Vs}$) se calcula a través de la velocidad electroforética ($v_{ep} = \text{cm/s}$) y la fuerza del campo eléctrico ($E = \text{V/cm}$), la relación entre estos factores se muestran en la ecuación 2:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta\gamma} \quad (1)$$

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{L_d / t_m}{V / L_T} \quad (2)$$

Donde la velocidad electroforética se mide a través de la longitud del capilar hasta el detector (L_d) y el tiempo de migración (t_m), es decir el tiempo que le toma a un soluto moverse desde la entrada del capilar hasta la ventana del detector. La fuerza del campo eléctrico está determinada por el voltaje aplicado (V) en la longitud total del capilar (L_T). La μ_{ep} es independiente del voltaje y la longitud del capilar, pero es altamente dependiente del tipo de buffer y pH [Beckman, 1991].

Además de la movilidad electroforética, otra fuerza que rige el proceso electroforético es el Flujo electrosmótico (EOF, del inglés, Electrosmotic flow). Este fenómeno se produce a consecuencia de la superficie cargada de la pared del capilar. Los capilares de sílice fundida tienen grupos silanol (Si-OH) que cuando se ionizan (en contacto con el buffer) producen una carga negativa (Fig. 7). Las paredes cargadas negativamente atraen iones cargados positivamente, creando una doble capa eléctrica. El grado de ionización es controlado principalmente por el pH de buffer y cuando se aplica el voltaje a través del capilar, los cationes en la parte difusa de la doble capa migran en dirección al cátodo, arrastrando agua con ellos. El resultado es un flujo neto de solución buffer en dirección al electrodo negativo. El EOF se genera en toda la longitud del capilar, es pequeño a pH bajo y alcanza su máximo a pH 11. Gracias al EOF es posible el análisis simultáneo de especies neutras, cationes y aniones, pues el EOF actúa como una bomba que impulsa todas las moléculas hacia el detector [Ciccone, 2001; Odda y Landers, 1996].

En EC, la separación de los analitos de basa en sus movilidades electroforéticas diferenciales, pero se discute en términos de resolución y

eficiencia. La resolución es esencialmente una medida de calidad de una separación y la eficiencia se refiere a que tan estrechos son los picos (Fig. 8).

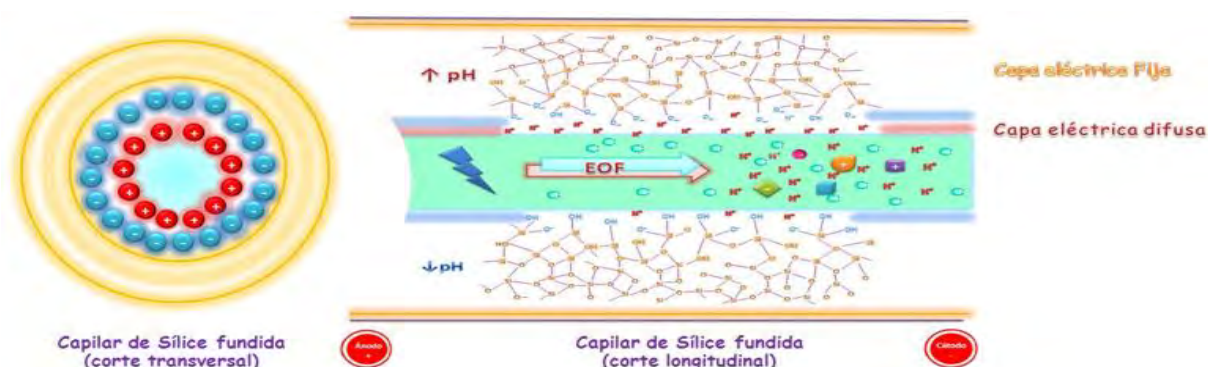


Figura 7. Flujo electrosmótico [Dibujo basado en Odda y Landers, 1996 y Harris, 2001]

Basados en el ancho del pico a la mitad de la altura del pico, $W_{1/2}$, (de forma similar que en la cromatografía de líquidos) las eficiencias se calculan en términos de platos teóricos (N), a mayor número de platos teóricos, la separación es más eficiente. El cálculo de la resolución usa el tiempo de migración de dos picos (t_{m1} , t_{m2}) y el ancho de la base de los picos (W_{b1} , W_{b2}). A mayor resolución, mejor separación de 2 picos. Entre mejor separación, los resultados del análisis son más confiables [Harris, 2001; Desai y Armstrong 2003].

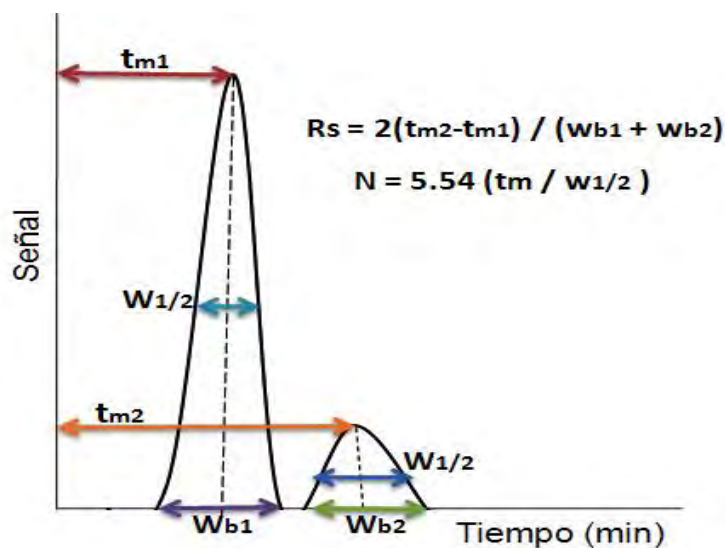


Figura 8. Electroferograma que ilustra los cálculos de resolución y eficiencia en términos de platos teóricos.

Los principales parámetros a considerar en un análisis electroforético son el voltaje aplicado, el pH y concentración del buffer así como la longitud del capilar. El aumento o disminución de estas condiciones determinan variablemente la migración y por lo tanto la exitosa separación de los componentes de la muestra a través del capilar [Odda y Landers, 1996].

1.6 Origen de la carga de un microorganismo

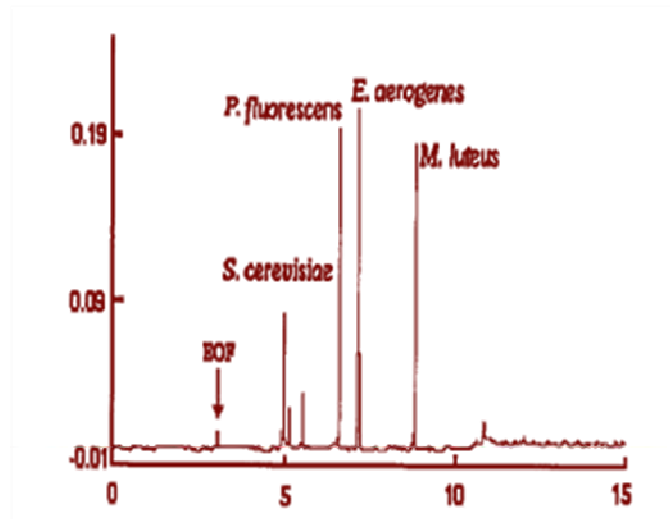
19

Es aceptable caracterizar a la mayoría de los microorganismos como partículas coloidales debido a su tamaño ($10^{-4}\mu\text{m}$ a algunos micrómetros) y comportamiento en suspensión acuosa; estos coloides deben el origen de su carga a dos motivos, primero a la ionización de grupos funcionales de la superficie como resultado de la protonación y desprotonación de moléculas ácidas o básicas de la superficie, y segundo a que la carga de la superficie también puede ser adquirida por absorción de iones de la solución [Desai y Armstrong 2003]. Los hongos, bacterias y virus no son tan diferentes, en el sentido en que poseen membranas y paredes celulares que contienen proteínas, lipopolisacáridos, moléculas lipídicas, ácidos teicoicos, etc.; los cuales les confieren su carga característica. Los grupos ionizables más comunes sobre la superficie externa del microbio son ácidos carboxílicos, fosfatos, aminos y sulfatos [García-Cañas y Cifuentes, 2007]. La química de la superficie celular externa (sea membrana o pared celular) determina no solo la carga del microorganismo sino también determina su interacción biológica con el medio y otros microorganismos. La carga del microorganismo puede variar con el pH, composición de la solución, fuerza iónica, e incluso la temperatura. Propiedades que permiten caracterizar al microorganismo por electroforesis capilar [Girod et al, 2002; Palenzuela et al, 2004].

1.7 Caracterización de microorganismos por electroforesis capilar

El primer experimento que demostró la posibilidad de mover microorganismos a través de capilares bajo un campo eléctrico aplicado, consistió en el análisis de *Lactobacillus casei* y el virus mosaico del tabaco. Ambos se detectaron en UV-visible, *Lactobacillus casei* a 220nm y el virus mosaico del tabaco a 216nm, en corridas separadas. Los electroferogramas resultantes mostraban picos agudos y un tiempo de migración de 4 min; sin embargo, en mezcla no hubo separación de los microorganismos [Desai y Armstrong, 2003]. La primera separación total o parcial de bacterias por EC se logró en una mezcla de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Staphylococcus aureus*, pero se obtuvieron en bandas anchas y un tiempo de análisis de 70min [Ebersole y McCormick, 1993]. Gradualmente fueron reportándose separaciones análogas, mejorando la eficiencia, resolución y tiempo de análisis, hasta obtener separaciones tan exitosas como la de *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Alcaligenes fecalis* (Fig. 9), en un tiempo de análisis menor a 15min [Pfetsch y Welsch, 1997]. O bien, la separación de *Bifidobacteria infantis*, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, donde se alcanzaron eficiencias tan grandes como 10^6 - 10^9 platos teóricos/m [Armstrong et al, 2002]. La inyección individual de cada bacteria permite la identificación de los picos y su correspondiente movilidad, además su área es directamente proporcional a la cantidad de células inyectadas.

Figura 9. EFG que muestra la separación de *S. cerevisiae* y tres bacterias *P. fluorescens*, *E. aerogenes* y *M. luteus*. Condiciones: buffer de Tris-Acido bórico-EDTA (pH 8.4) y un capilar de 50cm de L_T .



Además de la rápida separación, identificación y cuantificación de estos microorganismos, también ha podido determinarse la viabilidad (porcentaje de células vivas y muertas) por medio de EC y fluorescencia inducida por laser (LIF). Utilizando los colorantes SYTO9® e ioduro de propidio, se determinó simultáneamente la viabilidad para una mezcla de *B. infantis*, *Lactobacillus acidophilus* y *S. cerevisiae* (Fig. 10). El colorante SYTO9® tiñe todas las bacterias en una población (aquellas con membranas intactas o dañadas); en contraste, el ioduro de propidio solo penetra bacterias con membranas dañadas, y extingue el verde fluorescente de SYTO9® reemplazándolo con su propia fluorescencia roja (ambos colorantes se unen a ácidos nucleicos –RNA y DNA-). En EC-LIF la viabilidad se establece a través de la luminiscencia total, ya que es proporcional al número de células presentes [Armastrong y He, 2001].

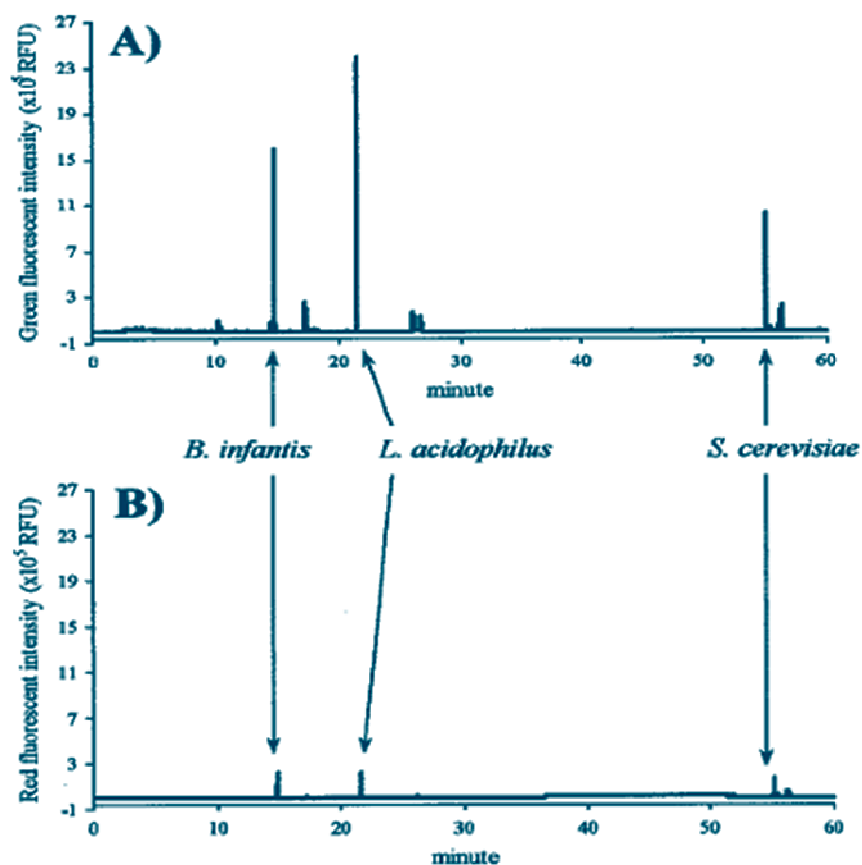
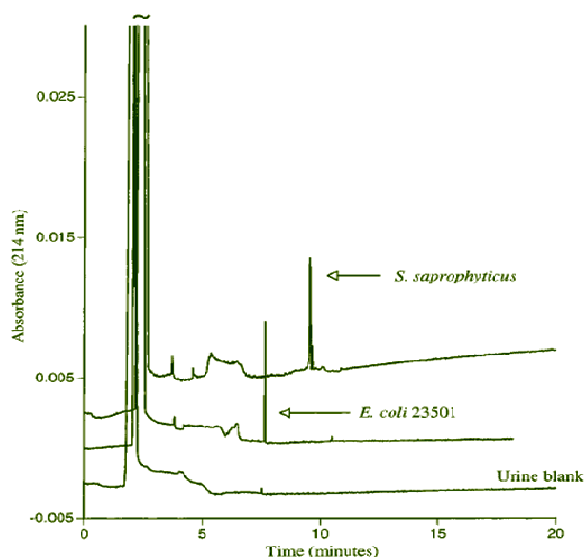


Figura 10. Electroferogramas que muestran la separación *B. infantis*, *L. acidophilus*, y *S. cerevisiae*. Detección de A) fluorescencia verde (células vivas) y B) fluorescencia roja (células muertas).

Estos avances eventualmente permitirán el desarrollo de métodos rápidos de análisis para muestras microbianas específicas, las cuales puedan servir de base para establecer pruebas con valor diagnóstico. Por ejemplo, se ha establecido un sistema de identificación de *Salmonella enteritidis* y otros serotipos por medio de un marcador y electroforesis capilar con fluorescencia inducida por laser, cabe destacar que en este sistema se detectaron exitosamente hasta 3 células por inyección de un cultivo puro [Shintani et al, 2002]. Además, los patógenos responsables de la mayoría de la infecciones de tracto urinario, *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus*, ya han podido distinguirse uno de otro después de la inyección directa de muestras de orina no tratadas en tan solo 10 min de análisis (Fig. 11) [Armstrong y Schneiderheinze, 2000]. Recientemente se adaptó este mismo sistema de EC para identificar *Helicobacter pylori* de aislados de mucosa estomacal de pacientes con inflamación gástrica [Jackowski et al, 2008].

Figura 11. Electroferogramas que muestran los diferentes tiempos de migración de *S. saprophyticus* y *E. coli* ambas en una matriz de orina idénticas. Condiciones: buffer TRIS-Acido bórico-EDTA 0.0175-0.00875-0.0063mM, con oxido de polietileno 0.0125%, pH 9.

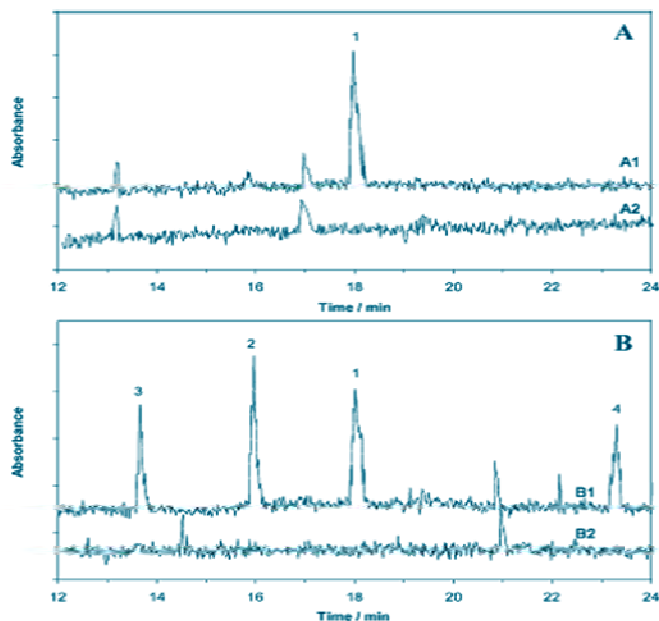


Estudios relacionados a otras aplicaciones de la EC en el análisis de células y microorganismos intactos se mencionan a continuación. Es posible adaptar el análisis de microorganismos por EC a muestras complejas de productos de consumo [García-Cañas y Cifuentes, 2007]. Se ha identificado, cuantificado y determinado la viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium infantis* en píldoras y jarabes usados como suplementos alimenticios [Armstrong et al, 2001].

Añadiendo al buffer de separación calcio y mioinositol, pudo separarse una mezcla de *Yersinia enterocolitica*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocitogenes*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium* [Palenzuela et al, 2004]. Aplicando esta metodología a muestras de comida (hojuelas de maíz y jugo) pudieron identificar y cuantificar cinco de estas bacterias (Fig. 12). Como se ha mencionado, la separación electroforética depende de la movilidad diferencial de las bacterias en el capilar, con el uso de iones calcio y mioinositol la resolución electroforética es mejorada, debido a que iones específicos pueden interactuar con la superficie bacteriana cambiando sus propiedades eléctricas y su movilidad electroforética [Palenzuela et al, 2004]. En diversas áreas de la ciencia y tecnología es muy valioso un ensayo rápido que permita saber si una muestra contiene cualquier microorganismo (bacterias aerobias, anaerobias o hongos), a este respecto Bao y col. [2008] crearon un prueba de esterilidad utilizando el surfactante catiónico CTAB[®] como aditivo en el buffer, en estos ensayos se logró la formación de un agregado de microorganismos, cuatro levaduras y tres bacterias (*C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. albidus*, *S. subterranea*, *E. coli*, *B. cereus* y *P. fluorescens*), el cual se detectó como un solo pico indicando la presencia o ausencia de los microorganismos.

La EC ha mostrado capacidad para la evaluación de la interacción microorganismo-molécula [Berthod et al, 2002]; puede usarse para evaluar la conducta de asociación entre una amplia gama de ligandos y receptores; por ejemplo, se han estimado las constantes de asociación y comportamiento del virus del resfriado común [Okun et al, 2001] y rinovirus humano serotipo 2 [Okun et al, 1999] a anticuerpos monoclonales y otras biomoléculas. Las constantes de asociación son útiles para la cuantificación de toda asociación molecular, en estudios de actividad farmacéutica, toxicidad y estudios microbiológicos [Berthod et al, 2002]. Por otra parte, la medición de la movilidad electroforética ésta permitiendo el estudio de propiedades superficiales de las células microbianas, por medio de esta ha podido detectarse la sutil, pero importante, heterogeneidad que puede existir en una población monoclonal [Van Der Mei y Buscher, 2001].

Figura 12. Electroferogramas de muestras de A) Hojuelas de maíz y B) Jugo. Los EFG A1 y B1 corresponden a muestras con spiking, mientras que A2 y B2 representan sus respectivas muestras blanco. Picos: 1. *E. coli*; 2. *Salmonella enteritidis*; 3. *Listeria monocitogenes* y 4. *Enterococcus faecium*. Condiciones experimentales: buffer de fosfatos 25mM adicionado con cloruro de calcio 25μM y 35μM de mionositol (pH 7), voltaje aplicado 15KV, temperatura del capilar 20°C, detección 210nm.



Además, se han obtenido los puntos isoeléctricos e información acerca de propiedades de superficie, propiedades adhesivas y de estabilidad en agua de diversos microorganismos, como *Escherichia coli*, ovocitos de *Cryptosporidium parvum* y varios tipos de *Mycobacterium* [Burtkus et al, 2003; Lytle et al, 1999; Lytle et al, 2004]. Por ejemplo, se encontró que micobacterias no tuberculosas (*Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* y *M. scrofulaceum*) de aislados clínicos y ambientales (de agua potable) tienen diferencias significativas en sus movilidades electroforéticas, la movilidad electroforética refleja la composición química de las membranas o paredes celulares, lo que muestra que existen diferencias en la composición de la pared celular entre estos patógenos ambientales y clínicos. Las movilidades electroforéticas de estas micobacterias fue muy negativa lo que puede tener implicaciones prácticas en los tratamientos de agua potable, ya que en teoría los microorganismos (MO) cargados más negativamente (y por lo tanto con movilidad electroforética negativa), son más estables en agua, debido a la fuerte repulsión electrostática entre ellos y las superficies; y si la carga de repulsión es la principal responsable de la estabilidad del MO en agua, su eliminación por medios comunes para eliminación de bacterias en el tratamientos de agua potable (como la precipitación en una región de pH) puede no ser suficiente. [Lytle et al, 2004]. *P.*

vulgaris, *K. pneumoniae*, *E. fecalis*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *P. putida*, *Serratia ribidae* son algunos ejemplos de microorganismos a los que se les ha medido su punto isoeléctrico a través de EC [Horka et al, 2006; Simonet et al, 2005]. Midiendo por EC los puntos isoeléctricos de *E.coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* y el bacteriófago Φ X-174 se propuso un sistema alternativo para monitorear la influencia de la inactivación sin lisis de estos MO por diferentes métodos químicos y físicos, como diversos tratamientos de calentamiento y adición de etanol o ácido peroxiacético [Horka et al, 2007].

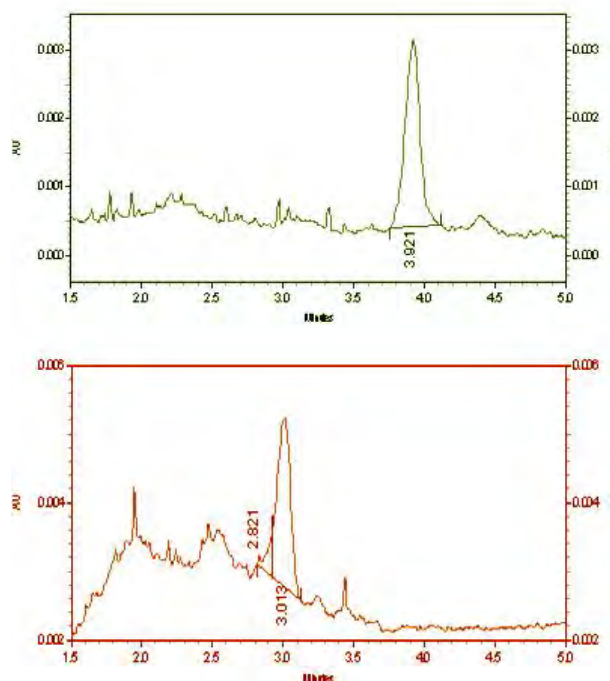
1.8 Estudio de los hongos por electroforesis capilar

Los hongos son organismos morfológicamente complejos que difieren en estructura a lo largo de su ciclo de vida, además del estudio reportado por Cazares [2007] sobre la factibilidad del análisis de hongos filamentosos por EC, los estudios electroforéticos que han abordado a los hongos, por el momento, solo han reportado el comportamiento electroforético de levaduras, entre ellas diversas especies de *Candida* o *Saccharomyces*, y conidias de *Aspergillus* y *Fusarium*, por ejemplo [Armstrong y He, 2001; Bao et al, 2008; Horka et al, 2009]. Como ya se mencionó, la EC está tomando importancia como una herramienta alternativa para el análisis de microorganismos y células, por lo que sería de gran interés científico contribuir al estudio de hongos filamentosos por electroforesis capilar. Cazares [2007] reporta la detección de *Botriosphaerea rodina* y *Trichoderma sp* en las condiciones electroforéticas mostradas en la figura 13. No obstante, pese a este importante avance en el estudio de hongos filamentosos por EC uno de los primeros retos a cumplir para el estudio de hongos filamentosos por EC sigue siendo la obtención de muestras de fragmentos relativamente homogéneos de células fúngicas filamentosas, es decir, hifas de tamaños regulares, que permitan ser suspendidas eficientemente en buffer para ser inyectadas al sistema de EC.

El cultivo de hongos levaduriformes, en medios sólidos o líquidos origina varias colonias de levaduras organizadas en agregados multicelulares, los cuales, en suspensión pueden ser fácilmente dispersables por agitación. En cambio, el

cultivo de hongos filamentosos en medios sólidos o líquidos, origina solo una colonia de hifas ramificadas y subramificadas que conforme crecen van formando complejos entramados de hifas [Herrera y Ulloa, 2004]. En el cultivo en medio sólido solo se observa una masa de micelio, mientras que en los cultivos sumergidos o líquidos se observan además formas dispersas de micelio, es decir hifas y pequeños agregados de hifas libres que se sueltan de la masa principal [Justen et al, 1998]. Las hifas libres, llamadas también formas dispersas de micelio, son las más idóneas para evaluar su análisis por EC. Es necesario destacar que aunque las hifas que constituyen el micelio representan la mayor parte de células miceliales de un hongo, también pudiera ser factible el estudio electroforético de hifas a través de germínulas, pues estas son equiparables a pequeñas hifas.

Figura 13. Electroferogramas Arriba, *Botriosphaerea rodina* y Abajo, *Trichoderma* sp. Condiciones: Buffer de fosfatos 30mM pH7, capilar 100µm ID, 15KV, 50cm de longitud total, detección 201nm.



2. JUSTIFICACIÓN

Si bien el estudio de las características electroforéticas está sirviendo como una base prometedora para múltiples ensayos microbiológicos de interés biológico y médico, en general, son pocos los estudios que se refieren a la determinación de células microbianas. Debido a la falta de estudios por electroforesis capilar en células miceliarias, en este trabajo se pretende aportar mayor información sobre el comportamiento electroforético de dichas células.

3. HIPÓTESIS

Es posible analizar células miceliares de *Trichoderma atroviride* y *Neurospora crassa* por electroforesis capilar.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el comportamiento electroforético de células miceliarias de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*.

29

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

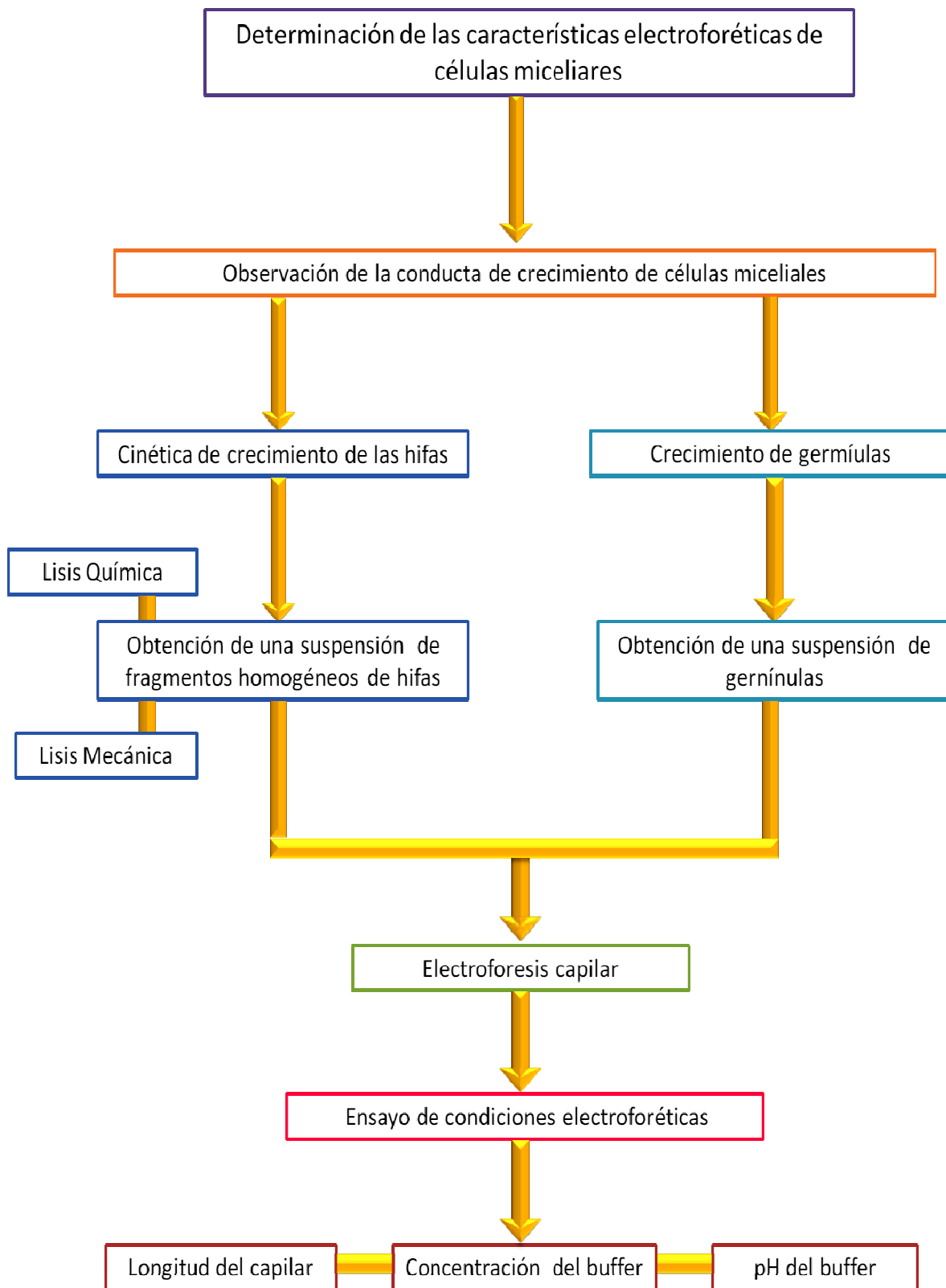
Establecer las condiciones de crecimiento en que es posible analizar el comportamiento electroforético de células miceliarias de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*.

Obtener fragmentos de hifas de longitud menores a 50µm

Estudiar el efecto de la concentración y pH del buffer en el comportamiento electroforético de las células miceliarias.

Observar la influencia del voltaje y longitud del capilar en el proceso electroforético.

5. ESTRATEGIA



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivos fúngicos

Se utilizaron las cepas *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride* (IMI 206040). Precultivos de micelio de ambos hongos fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética Microbiana de la división de estudios de posgrado en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Los cultivos fueron proporcionados en cajas de Petri sobre agar papa dextrosa (PDA) {BD Bioxon, México} y pases sucesivos sobre este medio fueron utilizados para uso y conservación de las cepas.

31

6.2 Cinéticas de Crecimiento del micelio

Se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido para *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*. Para ambos hongos, se sembraron 3 inoculos de 5mm de precultivos de micelio sobre PDA (*N.crassa* con 12h de incubación y *T. atroviride* con 24h) en matraces de 125mL que contenían caldo papa dextrosa (PDB) {BD Difco, USA}. A continuación estos matraces se incubaron a 28°C en agitación continua a 120rpm. Posteriormente, para seguir la curva de crecimiento, se midió la cantidad de biomasa generada cada 2h hasta 48h y cumplido este tiempo se midió cada 24h. Para ello el contenido de cada matraz se filtró en una unidad de filtración {Supelco, USA} acoplada a una bomba de vacío, el micelio fue retenido en círculos de papel filtro y secado a 50°C hasta peso constante. Cada punto de la curva fue producido por triplicado. Además en cada tiempo de crecimiento se observó y midió en el microscopio {Leica, DLMB} el desarrollo de las hifas. Por último se establecieron gráficamente las fases lag, log y estacionaria, y además se midió la velocidad de crecimiento (μ , calculando la pendiente sobre la recta corregida de la fase log) y el tiempo de duplicación ($t_d = \ln 2 / \mu$).

6.3 Crecimiento de germínulas

Para obtener germínulas se sembraron, de ambos hongos, 1×10^6 conidias/mL en 25mL de PDB en matraces de 125mL, se incubaron a 28°C en agitación continua a 120rpm. Estos cultivos se realizaron por triplicado. Cada dos

horas se tomó un volumen de 1.5mL del cultivo y enseguida se centrifugó a 12000rpm {Centrifuga Eppendorf 5415D}. Este procedimiento se realizó para observar y medir el desarrollo de las germínulas en el microscopio.

6.4 Obtención de fragmentos homogéneos de hifas en cultivo líquido

6.4.1 Lisis Química

Se prepararon cultivos de *Trichoderma atroviride* y *Neurospora crassa* con 5h de incubación a 28°C y 120rpm, en matraces de 125mL que contenían 25mL de PDB. Se probó el efecto de los detergentes Dodecil sulfato de sodio {Fluka, Switzerland}, Tritón X-100 {Sigma-Aldrich, USA} y Tween 80 {HYCEL, México}, donde se evaluó su capacidad de dispersión y fragmentación de las hifas de dos maneras, primero cultivando los hongos en PDB adicionado con los detergentes en concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100mM; y segundo, añadiendo a los cultivos los detergentes en las concentraciones mencionadas y continuando su incubación a 28°C y 120rpm durante 30min, 1, 2 y 4h. En todos los experimentos se extrajeron muestras de la masa micelial y del líquido de cultivo (centrifugando alícuotas de 1.5mL por 5min a 12000rpm). Ambas muestras se observaron al microscopio óptico {LEICA CME}.

6.4.2 Lisis Mecánica

Se prepararon cultivos de micelio de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride* y se ensayaron distintas condiciones de estrés mecánico, como velocidad de agitación y agitación en presencia de cuerpos de ebullición (ver Tabla). De cada cultivo se tomaron muestras del líquido de cultivo de 1.5mL que fueron centrifugadas a 12000rpm para concentrar y observar la cantidad y forma de fragmentos obtenidos en el microscopio.

En todos los experimentos se utilizaron cultivos estándar de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*. El cultivo estándar consiste en 3 asadas de micelio, inoculadas en matraces con 25mL de PDB e incubados a 28°C en

agitación constante a 120rpm {plataforma de agitación, Lab-Tech, México}.
Neuropora crassa se incubó por 24h y *Trichoderma atroviride* por 48h.

Tabla 1. Condiciones experimentales de estrés mecánico

a)	Cultivo estándar.
b)	Cultivo estándar y agitación posterior a 250, 450 y 650rpm por medio de agitador magnético {plancha, Fisher Scientific}, durante 1, 10 y 30min.
c)	Cultivo estándar con agitación a 150, 180 y 220rpm {plataforma de agitación, Lab-Tech, México}.
d)	Cultivo estándar con posterior aumento en la velocidad de agitación a 180rpm {plataforma de agitación, Lab-Tech, México}, por 30min, 1h y 2h.
e)	Cultivo estándar con agitación a 180rpm en presencia de cuerpos de ebullición de plástico {plataforma de agitación, Lab-Tech, México}.
f)	Cultivo estándar en agitación a 180rpm en presencia de cuerpos de ebullición de vidrio {plataforma de agitación, Lab-Tech, México}.
g)	Cultivo estándar y posterior agitación (500 y 2500rpm) con vortex {JK minishaker IKA} en presencia de cuerpos de ebullición de vidrio (durante 1, 3 y 5min).
h)	Cultivo estándar, pero incubación estática y posterior agitación (500 y 2500rpm) con vortex en presencia de cuerpos de ebullición de vidrio (durante 1, 3 y 5min).
i)	Cultivo estándar tratado en molino de aspas {Osterizer D020} durante 30s, 1 y 5min.
j)	Cultivo estándar con incubación estática, tratado en molino de aspas durante 30s, 1 y 5min.

6.5 Electroforesis Capilar

6.5.1 Instrumentación

Los análisis electroforéticos fueron llevados a cabo en un sistema de electroforesis capilar Beckman & Coulter {PACE/MDQ Glycoprotein System, Fullerton CA USA} y equipado con detector de arreglo de diodos y capilares de sílice fundida de 100µm DI {Polymicro, Texas USA} y 38 o 50 cm de longitud total.

34

6.5.2 Condiciones

Se probaron soluciones buffer de fosfato de sodio {J. T. Baker, México} en concentraciones de 5 a 80mM y pH de 6, 7 y 8 para cada concentración. Las soluciones de condicionamiento del capilar fueron agua e hidróxido de sodio 1N {J. T. Baker, México}. Además, el material, soluciones buffer y de condicionamiento se utilizaron estériles.

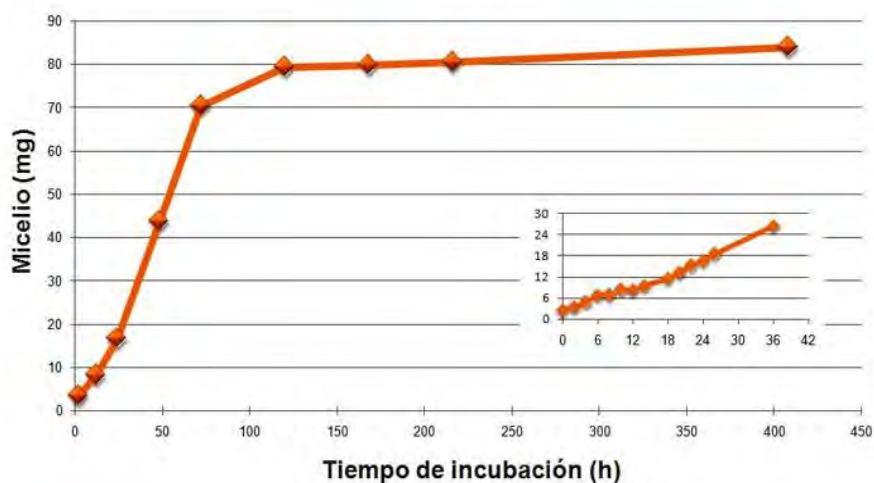
6.5.3 Preparación de la muestra

La muestra consistió de fragmentos de hifas o germínulas, suspendidos en solución buffer. Toda muestra fue lavada y centrifugada con agua y solución buffer. Para su inyección en el aparato se resuspendieron fragmentos de hifas, aproximadamente 4mg *N. crassa* y 13mg de *T. atroviride* (peso seco) en 200µL del buffer de corrimiento y 1.5×10^6 germínulas/200µL, para ambos hongos. Para garantizar su dispersión las muestras se agitaron durante 1min en el vortex (1800rpm).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Cinética de crecimiento de *Neurospora crassa*

La cinética de crecimiento para las hifas de *Neurospora crassa* se siguió por 408h en total (Graf. 1). *Neurospora crassa* no mostró claramente una fase lag, por lo que la fase log se observa suavemente desde el inicio y después de las 16h de incubación se mantiene acentuadamente hasta las 72h. La fase estacionaria se observa claramente desde las 120h y se mantiene así hasta concluir las 408h de incubación, donde aun no se observaba la fase de muerte. La velocidad de crecimiento se calculó en 0.094mg/h y el tiempo de duplicación en 7.4h. Durante las primeras 48h de la curva se siguieron a la par observaciones microscópicas, que proporcionaron la morfología general de la biomasa cultivada y su tamaño aproximado (Fig. 14). La cantidad de biomasa generada y las medidas tomadas respecto al grosor de las hifas se muestra en las tablas 2 y 3, respectivamente. El objetivo de la cinética fue también localizar el primer tercio de la fase logarítmica del hongo, el cual abarca gráficamente hasta las 24h de incubación. El micelio de esta fase representa el tiempo más corto en el que la población de hifas es más homogénea, en un sentido morfológico [Steele y Trinci, 1975] y se puede suponer que también metabólico. Entre las diversas variantes de *Neurospora crassa*, los datos de cinéticas de crecimiento suelen ser similares; sin embargo, la cepa aquí trabajada mostro parámetros marcadamente diferentes. Por ejemplo, se ha reportado para el crecimiento de la cepa silvestre de *Neurospora crassa* 74-ORB-1a en medio voguel (suplementado con fructuosa y glucosa), una velocidad de crecimiento de 0.35mg/h y un tiempo de duplicación de 2h [Vázquez-Garcidueñas, 1989]; el cultivo de la cepa silvestre *Neurospora crassa chol-1* en PDB, mostro una $\mu=0.179\text{mg/h}$ y un $T_d=3.9\text{h}$ [Luck, 1963]; o en *Neurospora crassa* E-5256 una $\mu=0.284\text{ mg/h}$ y un $T_d=2.4\text{h}$ [Emerson, 1950]. Si bien, aunque estas cinéticas y los datos reportados por nuestra cepa son marcadamente diferentes, concuerdan en que sus fases log se aprecian en las primeras 24h y al igual que nuestra cepa, las dos últimas tampoco mostraron claramente una fase lag.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento de *Neurospora crassa*. Los puntos ilustran la biomasa generada cada 24h, desde 0 hasta 408h de incubación. El recuadro muestra la biomasa generada cada 2h hasta 36h.

Durante el análisis microscópico nuestra atención se centró en observar la complejidad con que se organizan el micelio y el grosor de las hifas que los componen. A lo largo de la cinética se aprecian hifas agregadas que conforme aumentan en cantidad forman agregados más compactos y numerosos (Fig. 14). Sin embargo, toda hifa que compone estos agregados mantiene un grosor uniforme. Solo se evaluó el grosor, ya que prácticamente no es posible medir la longitud total de las hifas debido a lo complejo que puede ser establecer donde comienza y terminan estas, debido a sus largas ramificaciones y subramificaciones (Tabla 3).

El grosor de las hifas que se encontró en mayor proporción para *Neurospora crassa* fue de 0.46 a 0.76 μm . Las hifas más grandes alcanzaron de 1-3 μm y se presentaron en poca proporción. También se observaron hifas más pequeñas de 0.3 μm pero su proporción fue muy pequeña. Estos tamaños se observaron en todos los tiempos de crecimiento.

Figura 14 (1/3). Fotografías en microscopio óptico (Leica DLMB) de muestras de micelio durante la cinética de crecimiento de *Neurospora crassa*. En cada imagen se indica el tiempo de incubación (h) y objetivo.

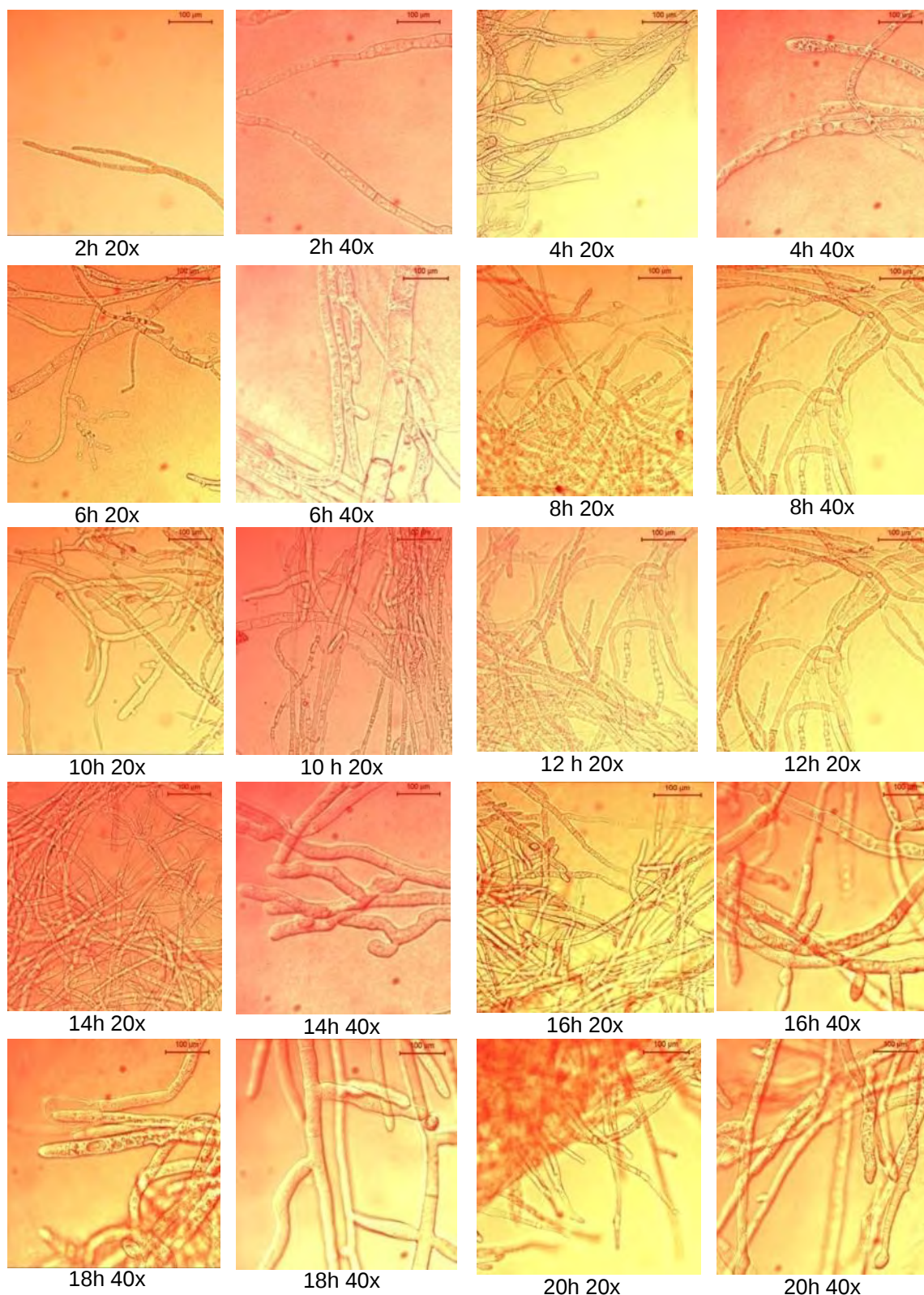


Figura 14. Continuación (2/3)

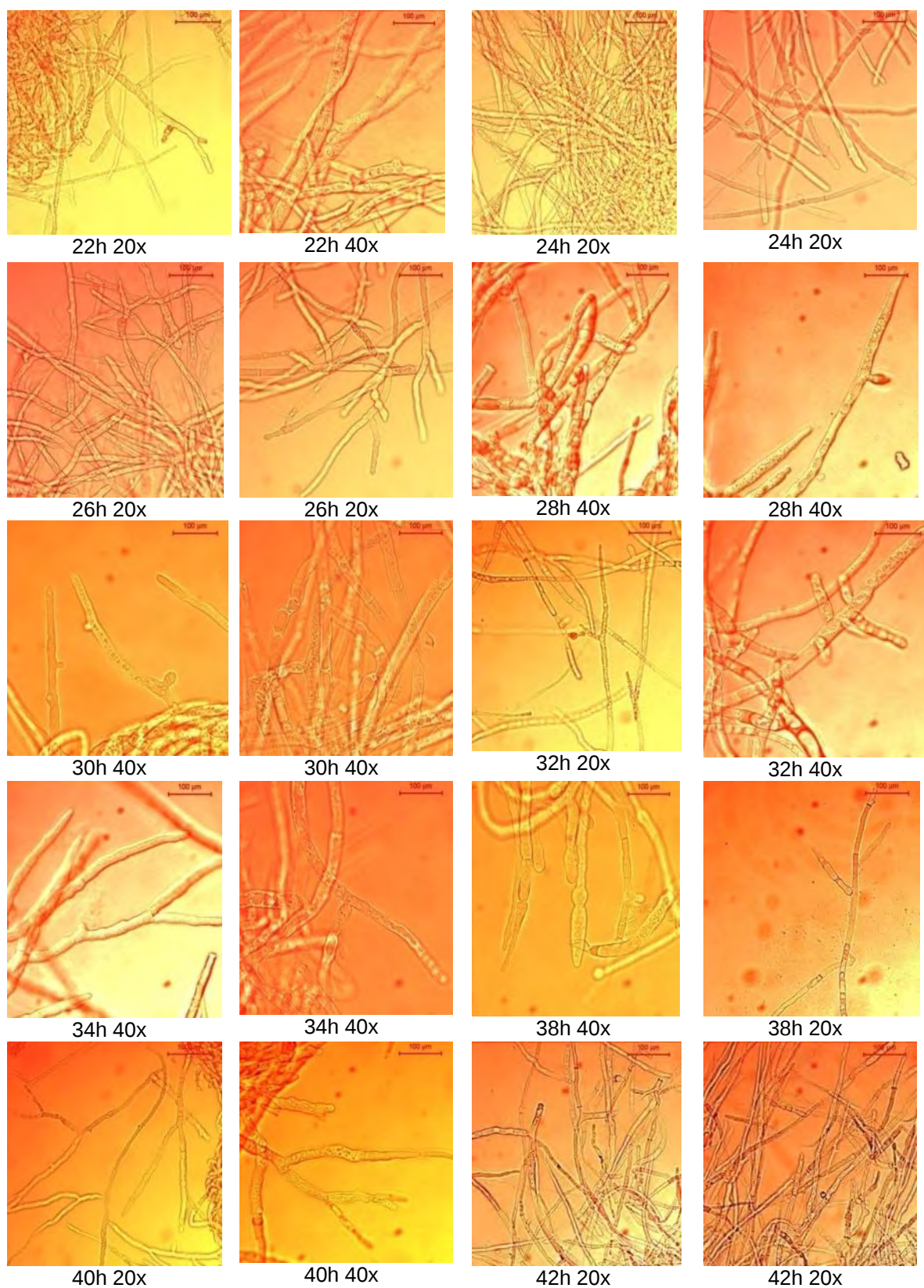


Figura 14. Continuación (3/3)

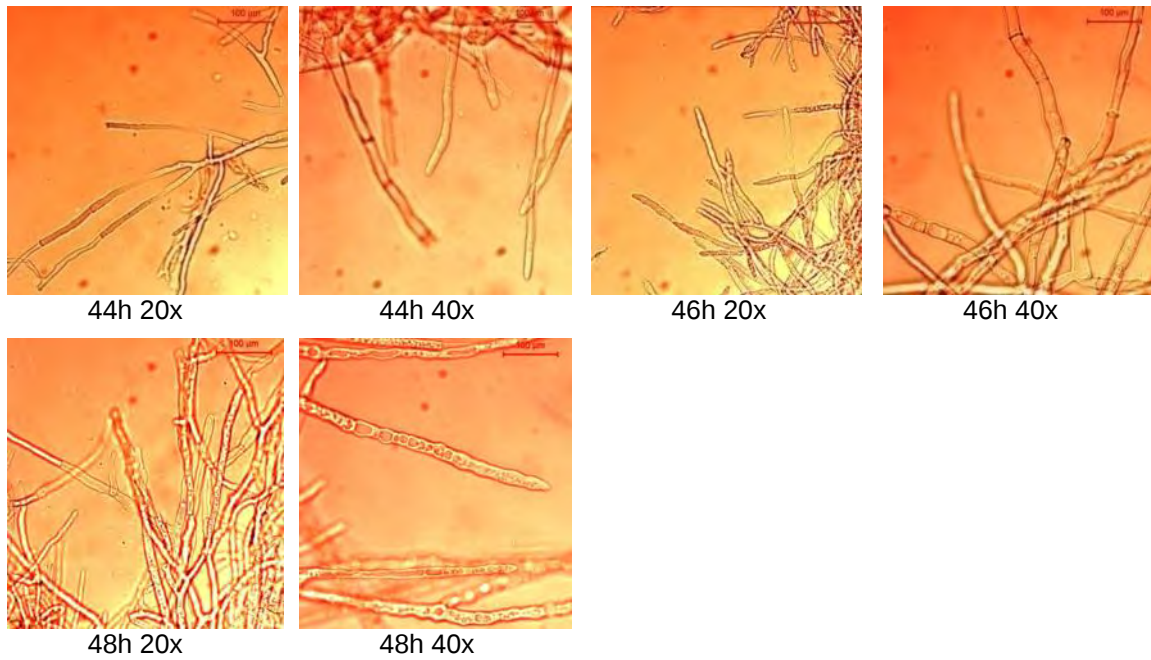


Tabla 2. Biomasa generada durante la cinética de crecimiento de *Neurospora crassa*.

t_{in} (h)	Micelio (mg)*	t_{in} (h)	Micelio (mg)*	t_{in} (h)	Micelio (mg)*
0	2.6	22	15.3	44	32.5
2	3.4	24	16.6	46	33.6
4	4.8	26	18.5	48	43.7
6	6.8	28	27.7	72	70.5
8	6.9	30	28.4	96	73.6
10	8.4	32	19.8	120	79.4
12	8.2	34	28.5	144	79.1
14	9.5	36	26.5	168	79.9
16	8.4	38	35.5	192	78.6
18	11.6	40	32.8	216	80.5
20	13.3	42	32.7	408	84.2

*Peso seco del micelio (M)

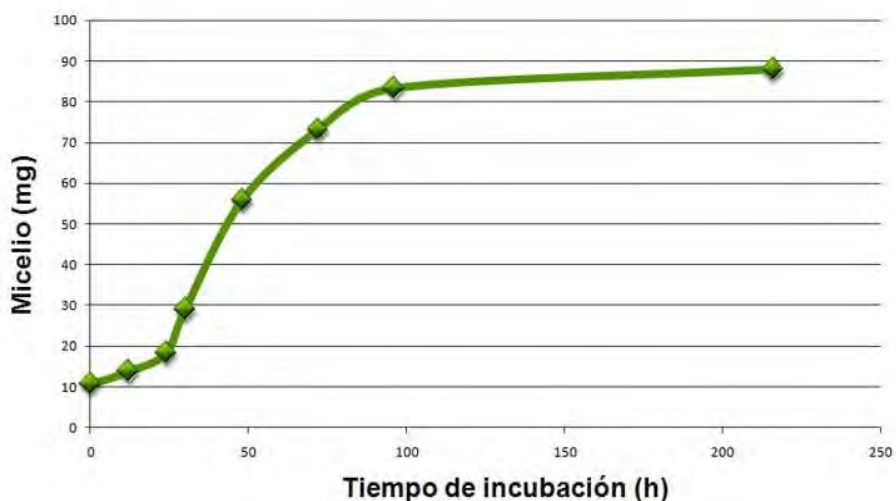
Tabla 3. Grosor de las hifas de *Neurospora crassa* durante la cinética de crecimiento

Tiempo de incubación (h)	Grosor de las Hifas (μm)
2	0.3, 0.46, 0.53, 0.6, 0.76, 0.83, 0.9, 1, 1.1, 1.3, 1.4
4	0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76, 0.9, 1.5
6	0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76, 0.9, 1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.8, 2.3, 2.9, 3
8	0.3, 0.53, 0.46, 0.6, 0.76, 0.9, 1, 1.2, 1.4, 1.5, 1.7, 2
10	0.46, 0.6, 0.69, 0.76, 0.84, 0.9, 1, 1.2
12	0.3, 0.46, 0.6, 0.69, 0.76, 0.83, 0.9
14	0.46, 0.6, 0.76, 0.9
16	0.46, 0.6, 0.69, 0.76, 0.83, 0.9, 1
18	0.46, 0.6, 0.69, 0.76, 0.83, 0.9, 1.2
20	0.46, 0.6, 0.69, 0.76, 0.9, 1.2
22	0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76, 0.83, 0.9
24	0.46, 0.6, 0.76, 0.9
26	0.46, 0.6, 0.69, 0.76, 0.83, 0.9, 1
28	0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76, 0.9, 1
30	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76, 0.83, 0.9
32	0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.83
34	0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76, 0.9
38	0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76
40	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.9
42	0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.76
44	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.6
46	0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69, 0.76
48	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.69, 0.76

7.2 Cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride*

Al igual que para *Neurospora crassa* la cinética de crecimiento para las hifas de *Trichoderma atroviride* se siguió por 408h en total (Graf. 2). Este hongo mostró una fase lag que abarca hasta las 24h de incubación, después de 26h la cinética muestra el inicio de la fase log que se mantiene acentuadamente hasta las 96h de incubación aproximadamente. La fase estacionaria se observa alrededor de las 144h y hasta el tiempo de incubación registrado no se alcanza a observar la fase de muerte. La velocidad de crecimiento se calculó en 0.044mg/h y el tiempo de duplicación en 15.8h, estos datos son similares a los obtenidos por Vázquez Garcidueñas [1997] para la misma cepa, donde se observó una $\mu=0.05\text{mg/h}$ y un $T_d=14\text{h}$, pero utilizando medio mínimo mineral adicionado con glucosa al 2%.

Aunque con menos puntos de intervención, se siguieron observaciones microscópicas de la morfología general de la biomasa cultivada y su tamaño aproximado (Fig. 15). La cantidad de biomasa generada y las medidas tomadas respecto al grosor de las hifas de *Trichoderma atroviride* se muestra en las tablas 4 y 5, respectivamente. El primer tercio de la fase logarítmica abarca gráficamente el intervalo de incubación de 26 a 50h. Microscópicamente el micelio de *Trichoderma atroviride* presenta un crecimiento que tiende al alargamiento de las hifas, en lugar de la aparición de ramificaciones nuevas. Las hifas más grandes observadas midieron $0.7\mu\text{m}$ y las más pequeñas $0.23\mu\text{m}$. El crecimiento de *Trichoderma atroviride* en general es muy homogéneo pues en todos los tiempos de la cinética crecimiento se presentan la mayoría de los grosores de hifa medidos entre $0.3\text{-}0.6\mu\text{m}$.



Grafica 2. Cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride*.

Figura 15 (1/2). Fotografías en microscopio óptico (LEICA DLMB) de muestras de micelio durante la cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride*. En cada imagen se indica el tiempo de incubación (h) y objetivo.

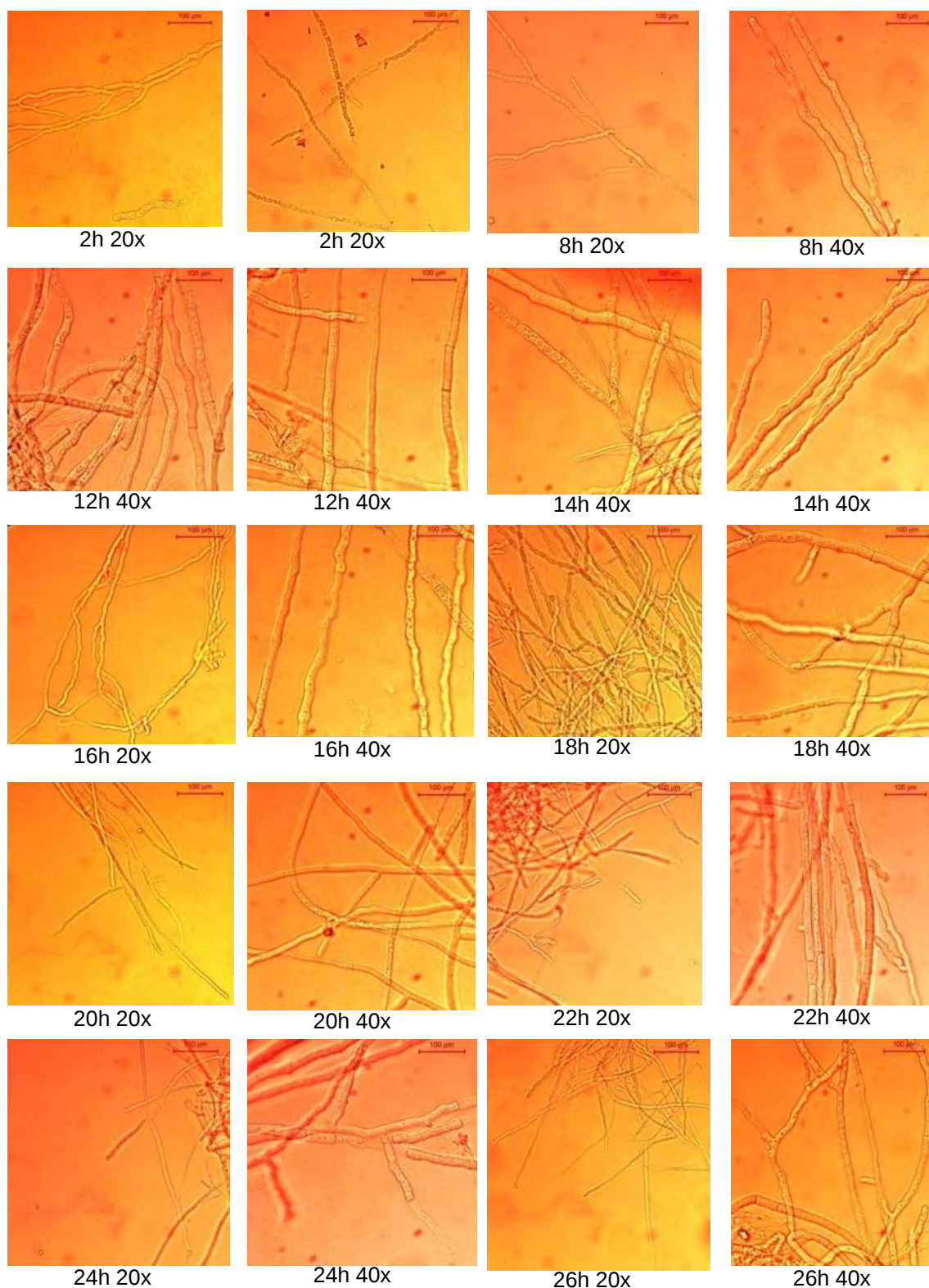
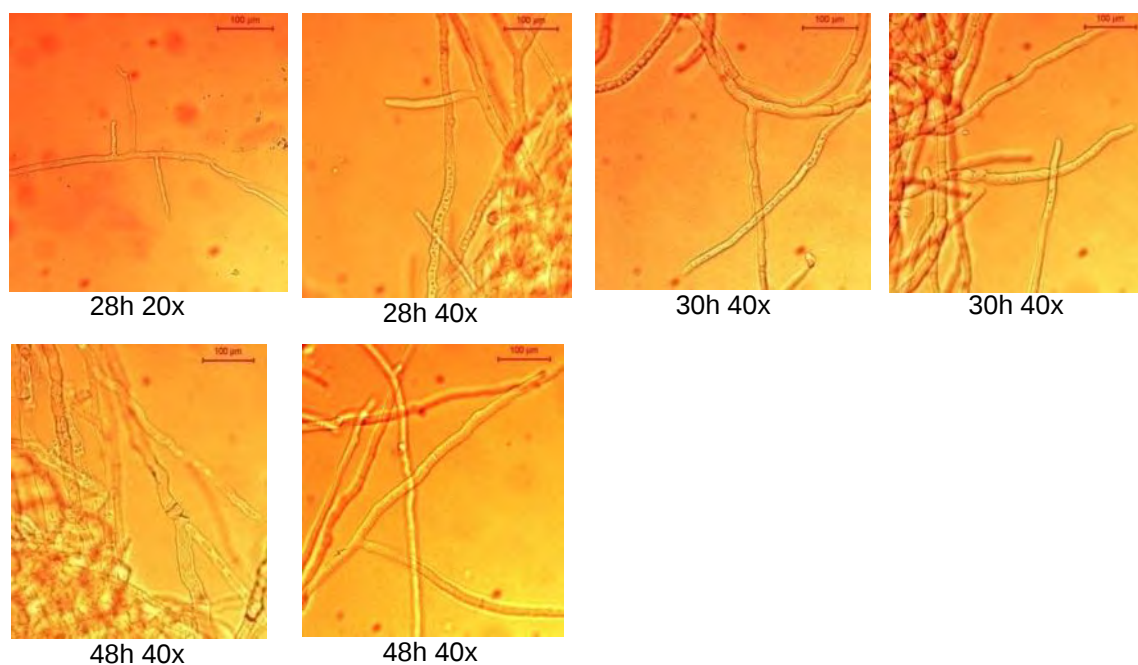


Figura 15. Continuación (2/2)

Tabla 4. Biomasa generada durante la cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride*

t_{in} (h)	M (mg)*	t_{in} (h)	M (mg)*
0	10.7	30	29
2	14	48	55.8
8	13.9	72	73.1
12	14.05	96	83.3
14	10.1	120	73.8
16	12.4	144	83.4
18	11.7	168	96
20	11.6	192	89.2
22	17.1	216	88
24	22.55	240	95.3
26	19.8	264	102.5
28	23.9	408	101.7

*Peso seco del micelio (M)

Tabla 5. Grosor de las hifas durante la cinética de crecimiento de *Trichoderma atroviride*.

Tiempo de incubación (h)	Grosor de las Hifas (μm)
2	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.76
8	0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69
12	0.3, 0.38, 0.46, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9
14	0.3, 0.46, 0.5, 0.6, 0.83
16	0.23, 0.3, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69
18	0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69
20	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.84
22	0.3, 0.38, 0.46, 0.53
24	0.3, 0.46, 0.53
26	0.3, 0.4, 0.46, 0.53
28	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.76
30	0.3, 0.38, 0.46, 0.53, 0.6
48	0.38, 0.46, 0.53, 0.6, 0.69

7.3 Crecimiento de germínulas

Las germínulas tienen su origen a partir del crecimiento de conidias y se consideran como hifas una vez que su tubo germinal emerge. El desarrollo de las germínulas se siguió desde conidias hasta formar células de aproximadamente 30μm (Fig.16 y 17). En *Neurospora crassa* este tamaño de hifas se encontró desde las 6h de incubación y para *Trichoderma atroviride* hasta las 16h. El seguimiento de la longitud de las germínulas se reporta en las tablas 6 y 7. Podemos destacar que las conidias de *Trichoderma atroviride* inicialmente tienen una forma esférica y un tamaño muy homogéneo con un diámetro entre 0.3-0.4μm, mientras que los de *Neurospora crassa* varían notablemente en su forma y tamaño, pues se observan conidias esféricas, ovoides y hasta cilíndricas, cuyo tamaño va desde los 0.7 a 2.4μm. Pese a la pequeña longitud de las germínulas, éstas conservan un intervalo de anchura igual a las hifas que forman grandes agregados de micelio, y que fueron observados en la cinética de crecimiento en ambos hongos.

El crecimiento de las germínulas para una población de conidias de *Trichoderma atroviride* es homogéneo, mientras que para una población de

Neurospora crassa es heterogénea pues desde las primeras horas de incubación gran parte de las germínulas ya observan una longitud importante ($\pm 10\mu\text{m}$) y otra parte numerosa se mantiene como pequeñas germínulas ($\pm 4\mu\text{m}$) y conidias. Esta disparidad del tamaño de las germínulas de *Neurospora crassa* se debe a que la producción de conidias puede estar acompañada de la formación de artroconidias. Las artroconidias son segmentos de la hifa de tamaño variable que se desprende directamente del micelio para iniciar un nuevo punto de crecimiento [Herrera y Ulloa, 2004].

Las germínulas de *Neurospora crassa* comienzan a ramificarse desde las 4h, pero al cumplir 6h de incubación las ramificaciones observadas tienen una longitud casi igual a la hifa que les dio origen. Entre 12 y 14h las hifas de *Trichoderma* mantienen longitudes parecidas pero a las 14h es común observar hifas con ramificaciones pequeñas.

Tabla 6(izq.) y 7(der.). Dimensión de las germínulas para ambos hongos

t_{in} (h)	<i>Trichoderma atroviride</i> Longitud de la germínulas (μm)*
0	0.25, 0.3 , 0.4 , 0.45
2	0.25, 0.3 , 0.4
4	0.3, 0.4 , 0.45
6	0.45, 0.5 , 0.6
8	0.6, 0.75, 0.9 , 1.1
10	0.9, 1.2, 1.5 , 1.8 , 2, 2.5
12	3, 5, 4, 5, 7 , 8 , 9
14	6, 11, 12, 13 , 15 , 17, 20
16	11, 17, 20, 22, 25 , 27 , 30, 32
18	20,34, 36, 42 , 45 , 46, 47

t_{in} (h)	<i>Neurospora crassa</i> Longitud de la germínulas (μm)**
0	0.76, 0.9, 1, 1.2, 1.4, 1.7, 2.1, 2.4
2	0.8, 1.2, 1.6 2, 2.4, 5, 12
4	1.6, 8, 14,17, 23
6	0.8, 23, 29, 32, 40

* Los números en negritas representan el tamaño de la mayoría de población, al menos el 70%.

** La mayoría de población presenta todos los tamaños descritos en cada tiempo

Figura 16. Fotografías en microscopio (Leica DLMB) de germínulas para *Neurospora crassa*. En cada imagen se indica el tiempo de incubación (h) y objetivo.

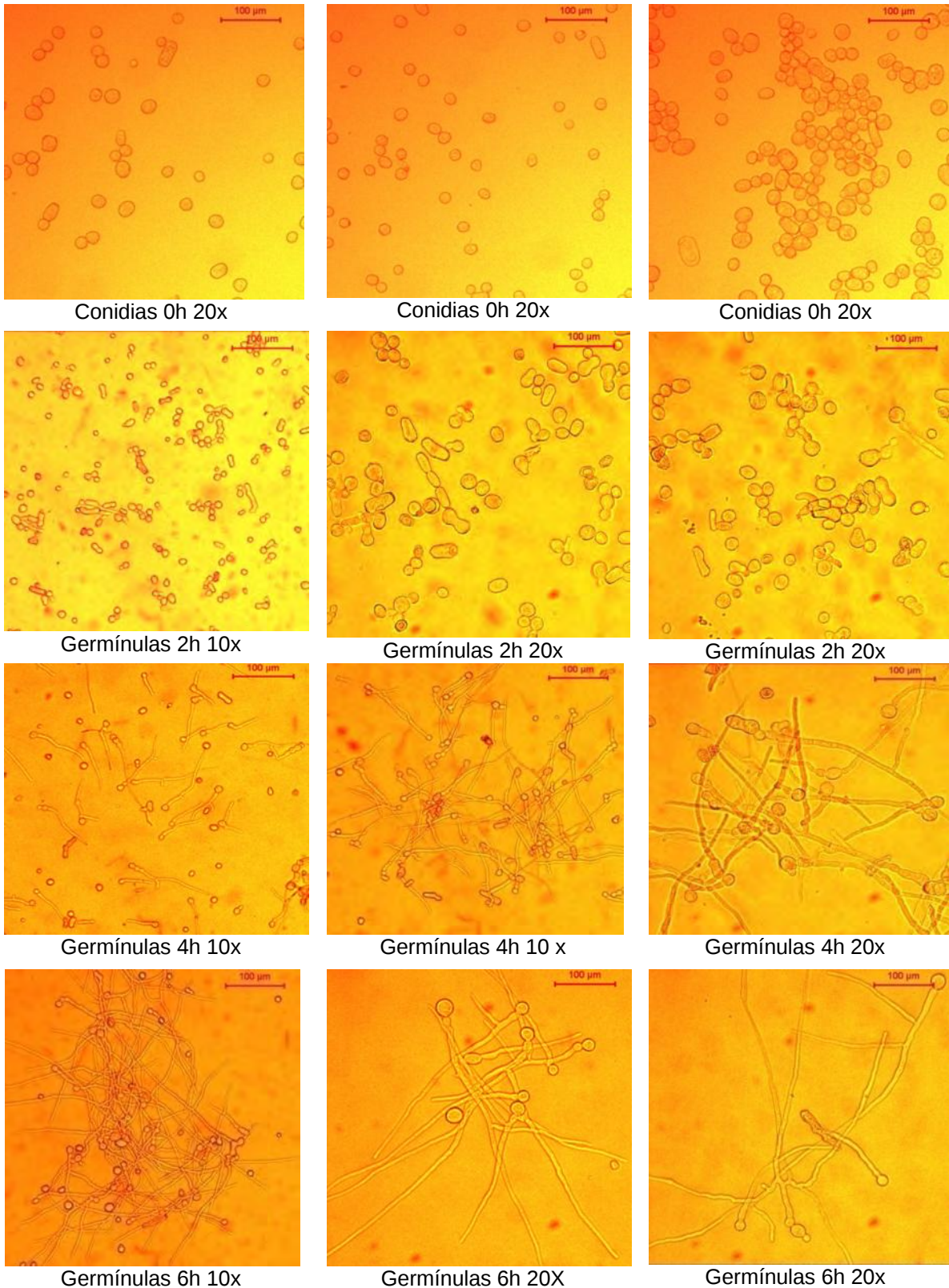
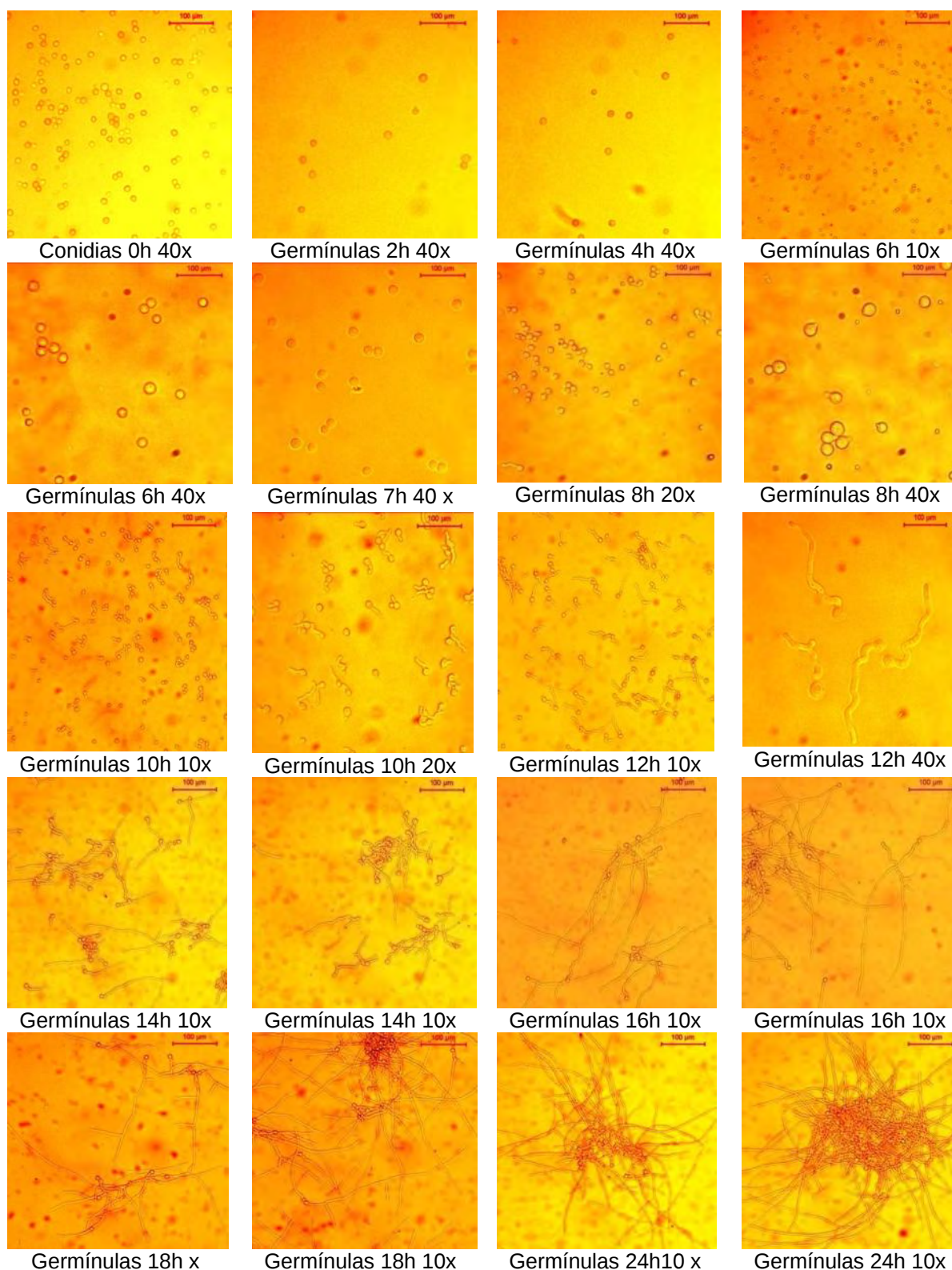


Figura 17. Fotografías en microscopio (Leica DLMB) de germínulas de *Trichoderma atroviride*. En cada imagen se indica el tiempo de incubación (h) y objetivo con que se observa.



7.4 Obtención de fragmentos homogéneos de hifas en cultivo líquido

7.4 Lisis química

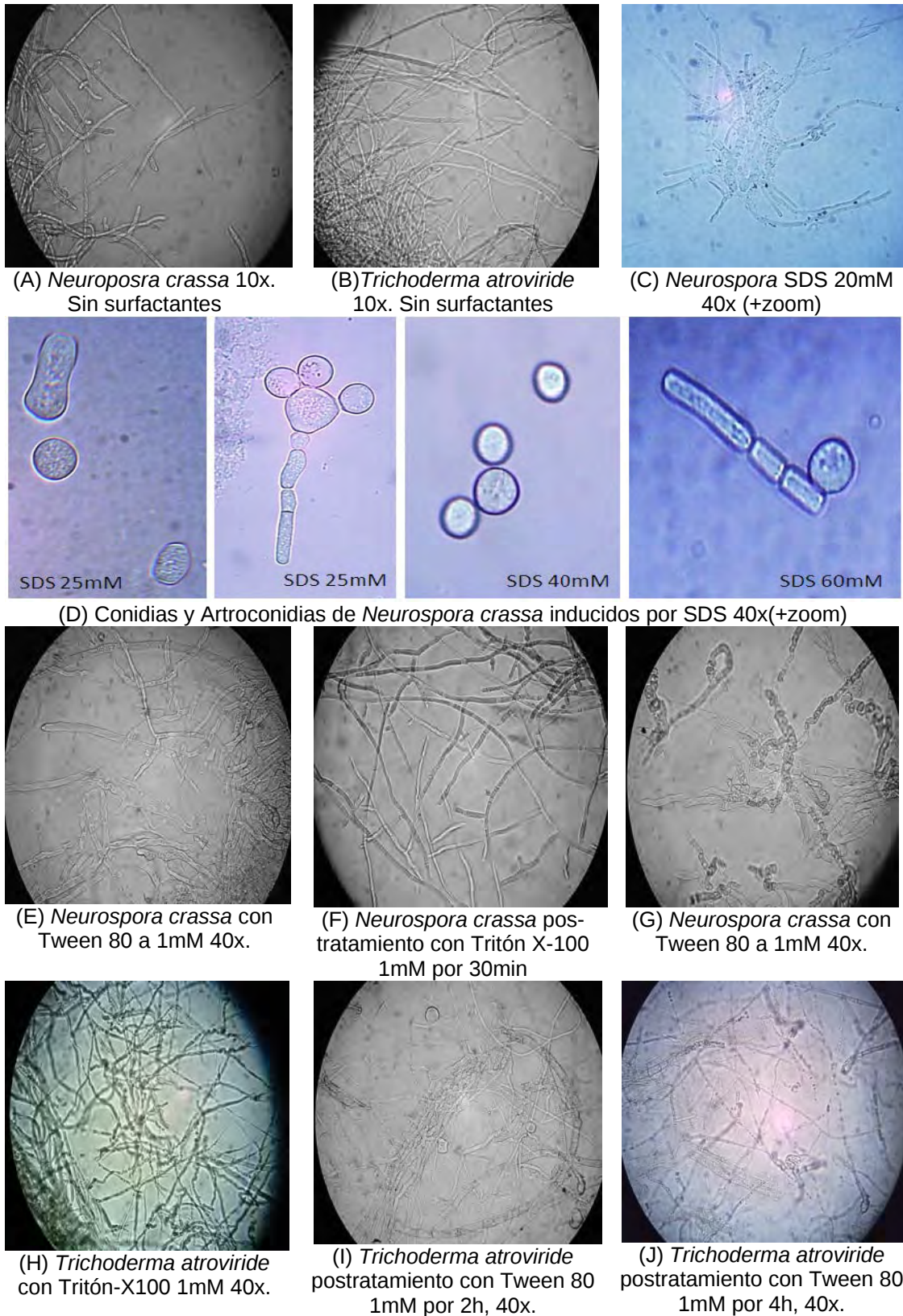
Durante años el uso de detergentes ha sido común para restringir el crecimiento de diversos microorganismos e inducir lisis de membranas y paredes celulares [Bao et al, 2007; Mahadevan y Tatum, 1965; Rodriguez y Mahoney, 1994]. Además, entre otros usos y propiedades, el cultivo de MO en presencia de detergentes disminuye la adhesión (ya sea a sustratos o entre células vecinas) lo que evita la formación de agregados celulares y/o favorece la dispersión de dichas células [Holder y Keyhani, 2005]. Con el objeto de inducir fragmentación y facilitar la dispersión de masas miceliales se utilizaron los detergentes Tween 80, Dodecil sulfato de sodio y Tritón X-100, en los micelios de *Trichoderma atroviride* (Fig. 18A) y *Neurospora crassa* (Fig. 18B). El efecto de los detergentes se evaluó con dos tipos de tratamiento, primero observando su capacidad de dispersión y/o fragmentación del micelio cultivado en presencia del detergente y segundo, la observación de estos mismos parámetros, aplicando el tratamiento con los detergentes sobre los hongos precultivados.

No obstante que se ha visto que el uso de Tween 80 a una concentración de 4 a 100mM en el cultivo de diversos MO (entre ellos *Saccharomyces cerevisiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Aspegillus sp*, etc.), evita sin daño la formación de agregados celulares [Chhabra y Dhakad, 2008; Higuchi et al, 2008; Jauniaux et al, 1978], este efecto no fue observado en *Neurospora crassa* ni en *Trichoderma atroviride*. El micelio de ambos hongos en presencia de Tween 80 se vuelve laxo y fácil de disgregar, sin embargo, desde la mínima concentración probada (0.1mM) se observan severas alteraciones morfológicas (Fig. 18E y G) y en 10 y 100mM los hongos no crecieron. En el tratamiento poscultivo se usó una concentración de 1mM. En ambos hongos los tratamientos de 30min y 1h, no tienen efecto sobre la dispersión de la masa miceliar, en 2 y 4h se pueden obtener algunos fragmentos de micelio, pero sus hifas se observan dañadas (Fig.18 I y J).

En diversos cultivos de MO el uso de SDS en concentraciones de 10-300mM permite la fragmentación parcial o rompimiento total de las células. Moré et al [1994], reportan que en el uso de SDS 144mM permite la lisis del 99% de las esporas de un cultivo de *Bacillus subtilis*. Lu et al [1994], mostraron que el tratamiento con este detergente a 300mM lisa eficientemente a *S. cerevisiae*. Mientras que Filip et al [1973], consigue fracturar ligeramente *E. coli* con un tratamiento de SDS 17mM. La concentración de SDS usada para lograr lisis o fragmentación celular es variable, por lo que se probaron concentraciones de SDS 0.1 a 100mM en *Trichoderma atroviride* y *Neurospora crassa*. En ambos hongos, el cultivo con SDS básicamente no tiene efecto sobre la calidad del entramado de las hifas y no induce fragmentación. Tanto en *Trichoderma* como en *Neurospora* la concentración máxima de SDS sin efecto aparente sobre el hongo fue 1mM, a concentraciones mayores (10-100mM) aumenta la pérdida de contenido protoplásmico de las hifas (Fig. 18C). En el cultivo de *Neurospora crassa* con SDS 10mM destaca la presencia de conidias y artroconidias (Fig. 18D), por lo que se hicieron experimentos adicionales a concentraciones de SDS de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90mM. Se sabe que *Neurospora crassa* cultivado en medio líquido y agitación, solo presenta crecimiento vegetativo [Berlin y Anofsky, 1985]. Sin embargo, en estos experimentos se observó que la cantidad de conidias y artroconidias es consistente, su presencia aumentó progresivamente desde 20mM y fue máxima en 60mM. En 70, 80 y 90mM su presencia fue escasa. Brzobohaty y Kovac [1986], observaron en *Saccharomyces* que los tratamientos con los detergentes SDS (3.5mM) ó Tritón X-100 (16mM) por 30 y 60min, permiten la fuga de ácidos nucleicos debido al rompimiento moderado de estas células. En ambos hongos, para el tratamiento con SDS poscultivo, se eligió una concentración de 10mM. En los todos los tiempos de tratamiento (30min, 1, 2, y 4h) no hay fragmentación y la masa micelar solo se dispersa escasamente. El tratamiento de 2 y 4h en *Neurospora crassa* induce conidiación y artroconidiación.

El desarrollo de los cultivos en presencia de Tritón X-100 promovió la fragmentación y dispersión de la masa micelar desde la concentración más baja, 0.1mM, sin embargo desde esta concentración el desarrollo general del micelio de

Figura 18. Fotografías al microscopio (Leica CME) de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride* en el tratamiento con surfactantes.



ambos hongos se ve disminuido y se observan hifas drenadas (Fig. 18H). En los cultivos con 10mM aumenta notablemente la cantidad de hifas drenadas y el crecimiento es escaso, a 100mM se inhibe el crecimiento, en ambos hongos. Los tratamientos poscultivo de Tritón X-100 se realizaron con una concentración de 1mM. En *Trichoderma* y *Neurospora* el tratamiento de tan solo 30min induce fragmentación de la masa micelar y vaciamiento intercalar del contenido citoplásmico de las hifas (Fig. 18F). A mayor tiempo de tratamiento aumenta la fragmentación pero también el daño de las hifas en ambos hongos.

7.4.2 Lisis mecánica

Los cultivos líquidos en agitación de hongos filamentosos producen una masa de micelio primaria y formas dispersas de micelio (fragmentos de pequeños cúmulos de hifas o hifas libres, figuras 19 y 20, respectivamente). Uno de los principales factores que influyen en la fragmentación micelar de un cultivo sumergido es la agitación [Amanullah et al, 2000; Justen et al, 1998]. Algunos hongos tienden a fragmentarse automáticamente con un pequeño estrés mecánico, en otros este fenómeno puede inducirse aumentando la velocidad de agitación y/o por medio del uso de hélices o esferas [Savage y Vander, 1946; Toker y Thomas, 1994]. Por ejemplo, en una cepa recombinante de *Aspergillus oryzae* el aumento en la velocidad de agitación (con hélice) permitió la producción de mayor cantidad de fragmentos de micelio [Amanullah y Blair, 2000]; o bien, es frecuente el uso de perlas y agitación vigorosa para fragmentar diversos pre-cultivos de micelio, como el de *Mycosphaerella fijiensis*, fragmentado de este modo para ser inoculado cuantitativamente en plantas y probar su capacidad infectiva [Garisto y Churchill, 2007].

La siguiente tabla e imágenes son un reporte de experimentos conducidos a pequeña escala, probando varios métodos y estresores mecánicos para obtener mayor cantidad de fragmentos de micelio. En todos los experimentos se utilizaron cultivos estándar de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*. El cultivo

estándar consiste en 3 asadas de micelio incubadas a 28°C en agitación constante a 120rpm. *Neurospora crassa* se incubó por 24h y *Trichoderma atroviride* por 48h. Bajo todas las condiciones ensayadas se obtuvieron resultados muy parecidos para ambos hongos por lo que, la cantidad de fragmentos producidos se reporta en una sola tabla (tabla 8).

Tabla 8. Reporte de experimentos de fragmentación por medio de estrés mecánico.

Experimento	Cantidad de fragmentos generados *
Cultivo estándar.	Escasos
Cultivo estándar y agitación posterior a 250, 450 y 650rpm por medio de agitador magnético, durante 1, 10 y 30min.	Pocos
Cultivo estándar con posterior aumento en la velocidad de agitación a 180rpm, por 30', 1h y 2h.	Moderados
Cultivo estándar con agitación a 180rpm.	Moderados
Cultivo estándar con agitación a 180rpm en presencia de cuerpos de ebullición de plástico.	Moderados
Cultivo estándar en agitación a 180rpm en presencia de cuerpos de ebullición de vidrio.	Abundantes
Cultivo estándar y posterior agitación (500 y 2500rpm) en presencia de cuerpos de ebullición de vidrio (durante 1, 3 y 5min).	Abundantes
Cultivo estándar, pero incubación estática y posterior agitación en presencia de cuerpos de ebullición de vidrio (durante 1, 3 y 5min)	Abundantes
Cultivo estándar tratado en molino de aspas durante 30s, 1 y 5min	Fragmentación casi completa
Cultivo estándar con incubación estática, tratado en molino de aspas durante 30s, 1 y 5min.	Fragmentación completa

* Para la observación al microscopio se concentra una alícuota de 1.5mL del líquido de cultivo y se centrifuga a 12000rpm. Para cada experimento se observó toda la muestra con el objetivo de 10x. Nos referimos como: escasos al observar de 1-3 fragmentos por alícuota; pocos ,4-6; moderados de 7-10 y abundantes, más de 10.

En un proceso de fragmentación mecánica la ruptura de la célula es causada por la colisión entre la pared celular y los cuerpos de impacto (perlas) dentro del recipiente de agitación. La efectividad de la ruptura está en función de la velocidad de colisión, material de las perlas usado y la energía del impacto [Muller et al, 1998]. En los experimentos realizados, en general, pudo observarse que tanto en los cultivos de *Neurospora crassa* como de *Trichoderma atroviride* conforme aumenta la velocidad de agitación y/o presencia de cuerpos de ebullición (estrés mecánico), aumenta la cantidad de fragmentos presentes, sin embargo estos son pocos (máximo 10 en 1.5mL de cultivo).

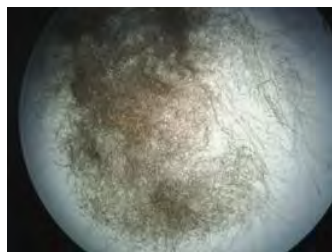
Además del aumento en la cantidad de los fragmentos en los cultivos con mayor velocidad de agitación, se observó también que con una agitación de 180rpm aumenta la presencia de conidias, artroconidias y germínulas. Comparando los cultivos de 120rpm con los producidos a 150rpm no hubo diferencias morfológicas, ni presencia de artrosporas, germínulas o conidias y tampoco aumento en la cantidad de fragmentos obtenidos. En los cultivos a 220rpm se inhibió el desarrollo de ambos hongos.

En todo momento el uso de cuerpos de ebullición permite una mayor obtención de fragmentos y la utilización de cultivos estáticos aumenta extraordinariamente la cantidad de fragmentos obtenidos en comparación con los cultivos estándar. Para muchos hongos producidos en un cultivo sumergido, puede ser vital una agitación adecuada que permita la suficiente aireación del micelio [Trinci, 1969]; no obstante, las cepas estudiadas fueron capaces de desarrollarse en cultivos sumergidos estáticos sin más diferencias morfológicas aparentes que su organización. Por otro lado Gillie [1968], reporta que las cinéticas de crecimiento de dos cepas silvestres de *Neurospora crassa* en cultivos estáticos presentan fases logarítmicas similares a las que presentan en cultivos sumergidos agitados. En un cultivo sumergido incubado en agitación (cultivo estándar) el micelio forma compactos entramados de hifas (Fig. 19) que se observan a simple vista como esferas algodonosas (Fig. 20), mientras que en un

cultivo sumergido estático el micelio crece disperso por todo el liquido (Fig. 21) sin formar entramados de hifas compactos (Fig. 22).

El uso del molino de aspas para romper el micelio de cultivos sumergidos estáticos, produjo los fragmentos de hifas más homogéneos y de tamaño viable para su posterior análisis por EC. Por este método se logró la fragmentación homogénea del micelio completo (Fig. 23). Los fragmentos obtenidos por este procedimiento miden desde 5 a 40 μ m de longitud pero los más abundantes miden entre 20-30 μ m.

Figura 19. Muestras tomadas de la masa primaria de micelio en cultivo estándar después de 24 y 48h de incubación para *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*, respectivamente.



Neurospora crassa 4x



Trichoderma atroviride 10x



Neurospora crassa 10x



Trichoderma atroviride 40x

Figura 20. Formas dispersas de micelio en un cultivo estándar, arriba *Neurospora crassa*, abajo *Trichoderma atroviride*. Fotografías +zoom (microscopio Leica CME).

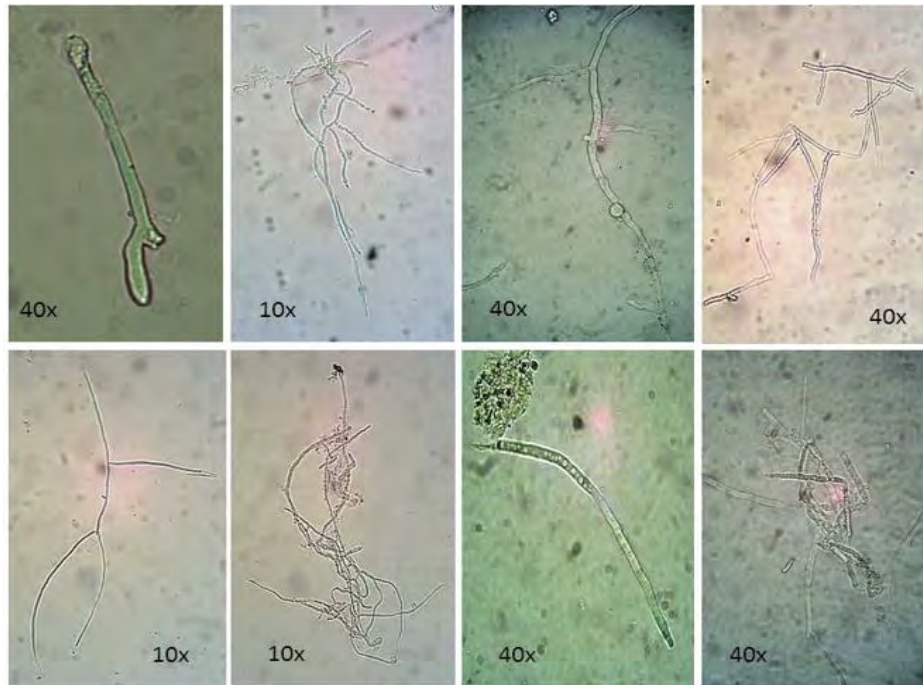
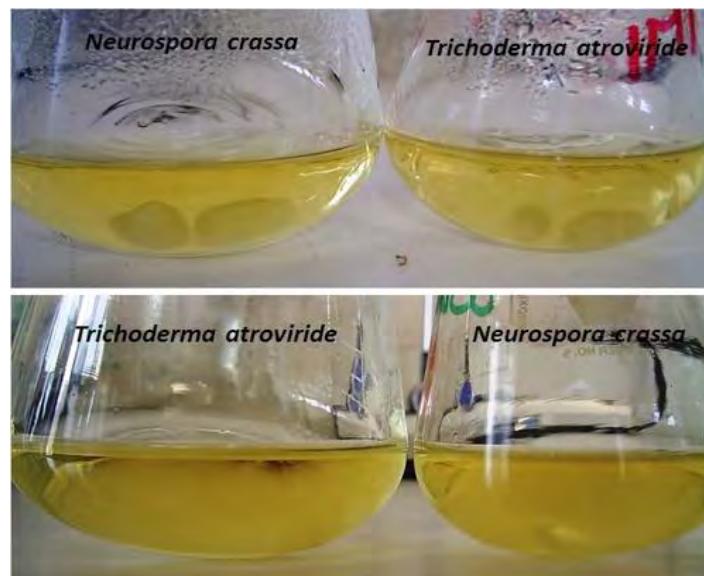


Figura 21. Matraces de cultivo sumergido; arriba, incubación en agitación continua a 120rpm; abajo, incubación estática.



* *Trichoderma* incubado por 48h y *Neurospora* por 24

Figura 22. Muestras de micelio de cultivos sumergidos incubados estáticos.

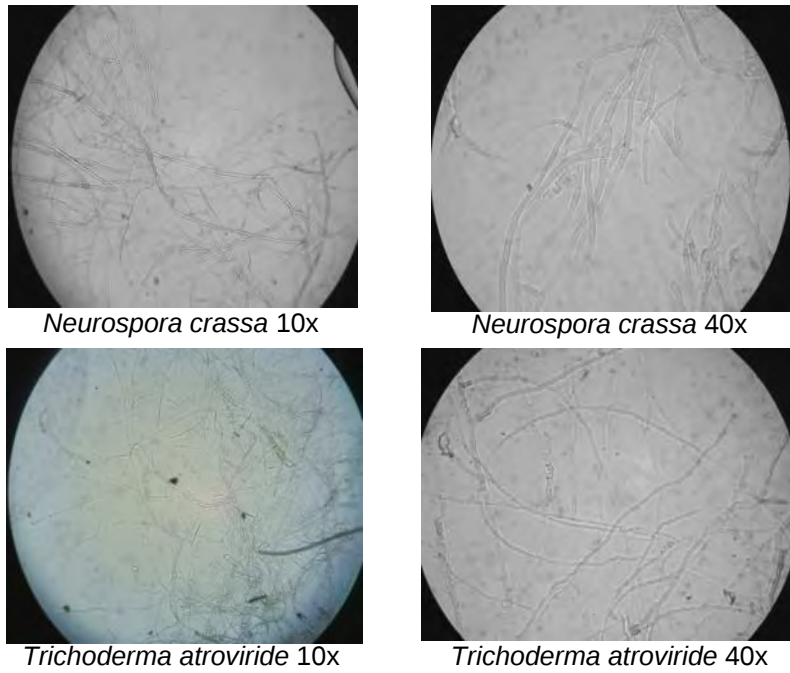
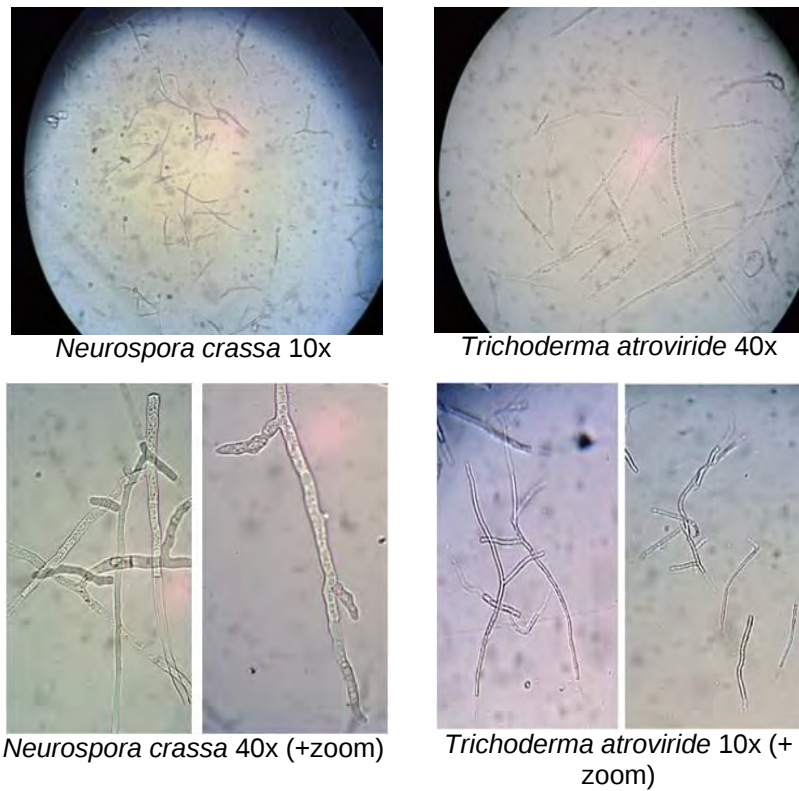


Figura 23. Fragmentos de micelio de cultivos estáticos obtenidos con molino de aspas.



7.5 Electroforesis capilar para fragmentos de hifas

Los fragmentos de micelio más idóneos para su análisis por electroforesis capilar, fueron los obtenidos al moler cultivos sumergidos estáticos (Fig. 23). Los fragmentos obtenidos por este procedimiento miden en su mayoría entre 20-30µm de longitud. Sin embargo, pese a la uniformidad en el tamaño de los fragmentos obtenidos, existe una importante heterogeneidad en la calidad de estos. Una muestra incluye (Fig. 24) fragmentos de micelio íntegros, fragmentos sin contenido celular (drenados), fragmentos mixtos (es decir, con partes integra y drenadas) y los contenidos celulares inmersos en el líquido de disolución (membranas, mitocondrias, ribosomas, trozos de pared, metabolitos, etc).

Los comportamientos electroforéticos de los fragmentos de hifas de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride* se observaron como una serie de picos. Pocas veces se comprobó la migración de los fragmentos de hifas, sin embargo, la migración de los contenidos celulares fue constante en todas las condiciones probadas. Para descartar las interferencias del medio de cultivo se realizaron corridas del medio donde los hongos fueron cultivados (PDB). Todas las condiciones de concentración y pH del buffer ensayadas se enlistan en la tabla 9.

Entre los experimentos que permitieron corroborar la migración de algunos fragmentos mixtos e intactos de micelio se demuestran en las corridas para *Neurospora crassa* con buffer de fosfatos 10mM pH 8 (Fig. 25) y para *Trichoderma atroviride* el buffer de fosfatos 30mM pH 8 (Fig. 26). En ambas corridas se recuperaron algunas hifas (del medio migrante) en el vial de salida. Los EFG de ambos hongos muestran una serie de picos en los que no fue posible establecer cuál correspondía a estas hifas. Aunque las muestras de fragmentos de micelio tienen una longitud aparentemente viable para su inyección en el capilar, parece ser que los fragmentos todavía son demasiado grandes para ser inyectados en el sistema de EC, pues las hifas recuperadas en el vial de salida median entre 10 y 15µm. Cabe la posibilidad de que si hayan entrado al capilar pero que se hayan quedado adheridas en las paredes del mismo. Esto bien podría comprobarse recuperando las soluciones de lavado del capilar.

También fue posible confirmar la migración de fragmentos vacíos. En *Trichoderma atroviride* los buffers de fosfatos (Fig. 27) 20mM pH 6, 30mM pH 7 y 30mM pH 8, permitieron la migración de esta clase de fragmentos. En *Neurospora* este tipo de migración se observó con los buffers (Fig. 28) de fosfatos 20mM pH 6, 20mM pH 8, 30mM pH 7, 30 y 40mM pH 8. Los fragmentos drenados parecen ser sensibles al proceso electroforético ya que después de la aplicación del voltaje estos lucen hinchados, se sabe que la aplicación de pulsos de voltaje aumenta la permeabilidad de la membrana por medio de formación de poros; según el tipo de célula e intensidad de voltaje, la formación de estos poros puede ser reversible o no y permitir el ingreso de diversos solutos [Fox et al, 2006; Mazurek et al, 1995]. Se podría suponer que el aumento en la permeabilidad de los fragmentos durante el largo potencial aplicado, aunado a la presencia del electrolito, permite un influjo de moléculas de agua a los fragmentos y por eso se ven hinchados.

La migración de los contenidos celulares fue una constante a lo largo de todos los ensayos. Su presencia fue detectada en las muestras previas a su inyección y recuperadas después del procedimiento electroforético (Fig. 29). La migración de los contenidos celulares puede darse de dos formas (Fig. 30), primero pensado en estos contenidos como un paquete de partículas, que migra a través del capilar debido una carga neta aportada en conjunto por cada uno de los componentes de los contenidos celulares, o segundo; al someter los contenidos celulares al campo eléctrico estos se separan y migran individualmente [Armstrong et al, 2002; Lantz et al, 2007].

El primer comportamiento de migración fue el más frecuente y se observó claramente para los contenidos celulares de *Trichoderma atroviride* en corridas con buffer de fosfatos 60 y 80mM pH 7. En los EFG registrados (Fig. 31) se observan varias bandas con el mismo espectro de absorción, solo diferentes en el tiempo de migración y área de los picos, lo que nos indica que las partículas que migraron solo difieren en tamaño. Varios autores reportan que es posible obtener varios picos de las mismas partículas o células de la misma especie, si estos forman agregados de diferentes tamaños [García-Cañas y Cifuentes, 2007;

Simonet, 2005; Sumski et al, 2008]. En *Neurospora* este comportamiento se observa en 40mM pH 6 y 60mM pH 7 (Fig. 32). En estas corridas no se obtuvieron fragmentos de micelio en el vial de salida.

En *Trichoderma atroviride* el segundo comportamiento de migración se observó claramente en corridas con buffer de fosfatos 30mM pH 8 y 40mM pH 7. En los EFG registrados (Fig. 33) se observan varias bandas con diferentes espectros de absorción. Para *Neurospora* el buffer de fosfatos 10 y 30mM pH 7 (Fig. 34), ponen en evidencia la diversidad de los contenidos celulares que migraron.

En las mismas condiciones electroforéticas la migración de los contenidos celulares de *Trichoderma* y *Neurospora* es similar en el tiempo de migración pero cada uno posee un espectro de absorción característico, por ejemplo, 20mM pH 8 y 60mM pH 7 (Fig.35).

En el análisis electroforético el manejo de la concentración y pH del buffer son parámetros vitales, su efecto es variable, pero determinante sobre la separación, resolución y sensibilidad [Odda y Landers, 1996]. Bajo una misma concentración del buffer y observando el efecto del pH 6, 7 y 8, en general el pH 7 permitió una detección más sensible y con bandas más agrupadas, por Ej., los EFG con buffer de fosfatos 80mM pH 6, 7 y 8 para *Trichoderma* y *Neurospora* (Fig. 36 y 37). En los contenidos celulares de ambos hongos el tiempo de migración no se modifica de manera importante. En cuanto al efecto de la concentración sobre el mismo pH se observó que a las mayores concentraciones de buffer aumentan notablemente la cantidad de bandas y su detección. Por ejemplo, para los componentes de *Trichoderma* y *Neurospora* a pH 7, las corridas con buffer de fosfatos a 10mM fueron las más pobres, mientras que a 40 y 60mM mejoran marcadamente (Fig. 38 y 39). A mayor concentración, es decir, a mayor fuerza iónica del buffer, las partículas adquieren mayor carga, lo que promueve un aumento en la repulsión electrostática entre las partículas y una mayor exposición de grupos cromóforos [Butkus et al, 2003; Lytle et al, 2004], ambos fenómenos se vieron reflejados por un aumento en la sensibilidad (intensidad de señal) y la

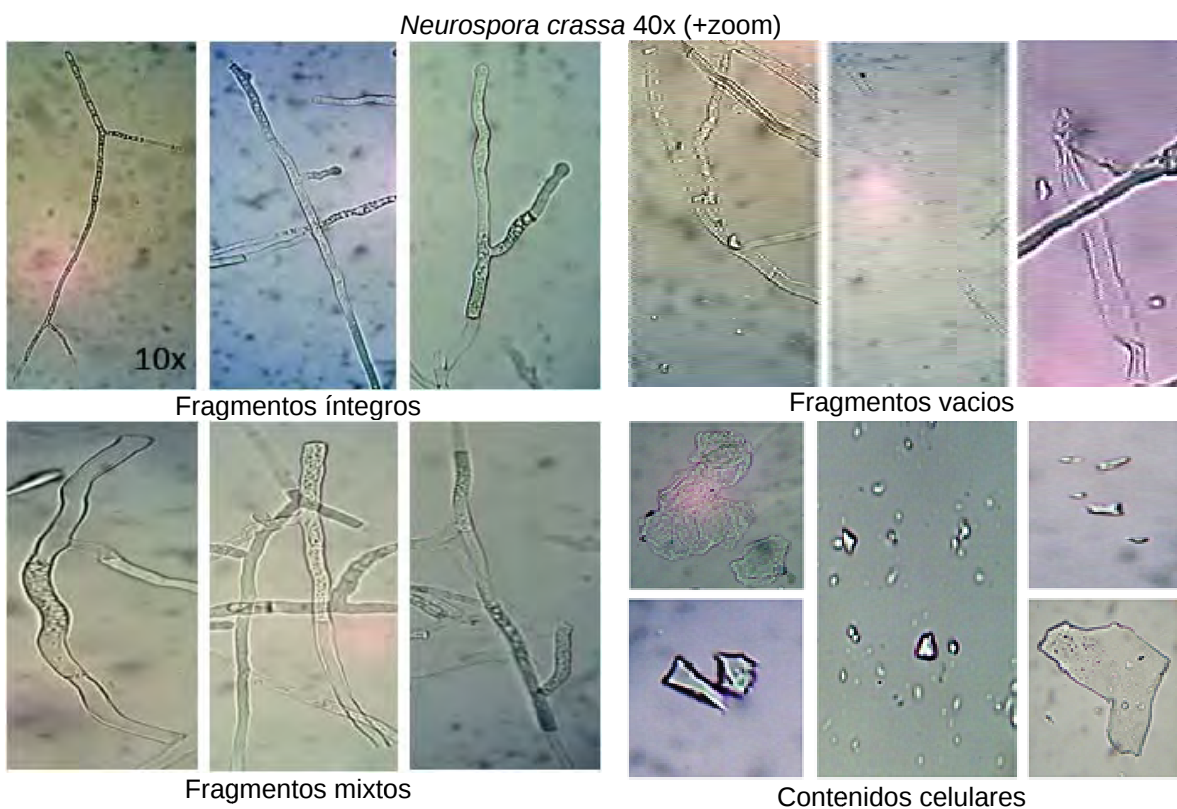
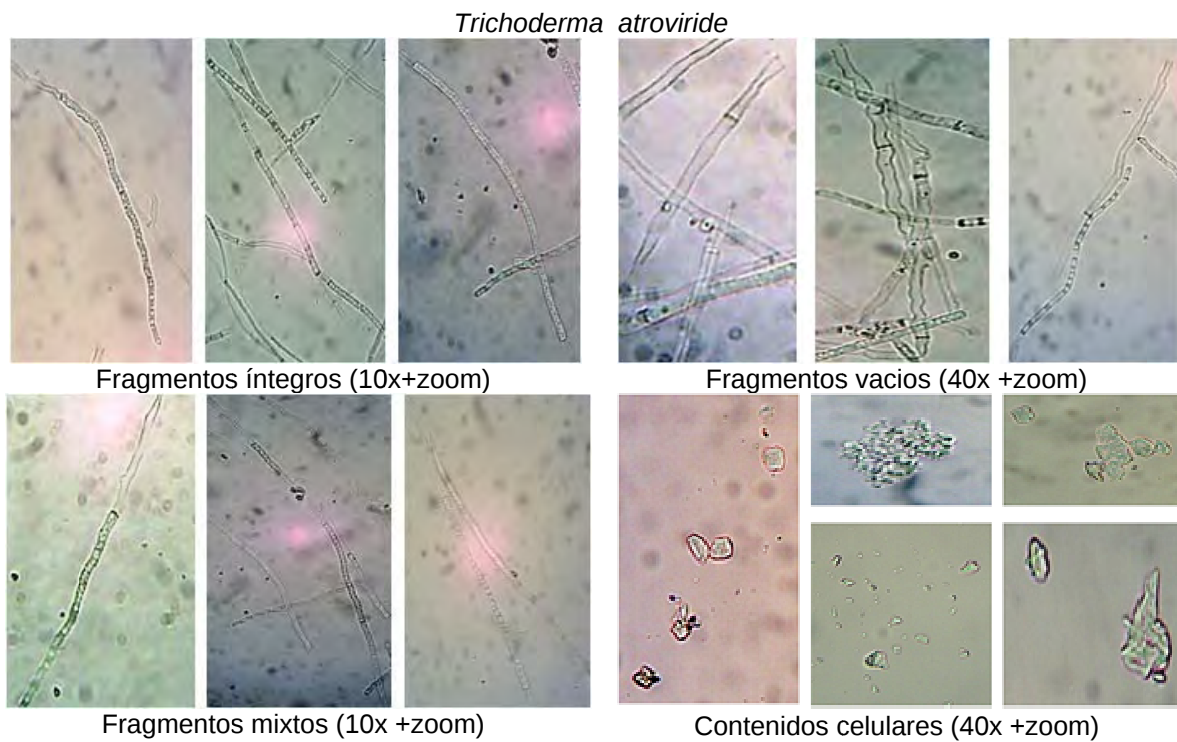
presencia de varias bandas, respectivamente. La concentración límite probada fue 80mM, en los pH ensayados, ya que a esta concentración se generan corrientes de 275 μ A; concentraciones superiores a las probadas generarían corrientes mayores a 300 μ A, donde el proceso electroforético se vuelve inestable debido al efecto Joule [Odda y Landers, 1996].

Finalmente, se evaluó el efecto del voltaje (7, 10 y 13.5 KV) y el efecto de la longitud del capilar (38 y 50cm de L_T). Tanto en *Trichoderma* como en *Neurospora*, ambos parámetros solo tuvieron un efecto en el tiempo de migración y no en la separación de las muestras, pues al aumentar el voltaje o acortar la longitud del capilar solo se observó una discreta disminución en el tiempo de migración.

Tabla 9. Condiciones de concentración y pH del buffer ensayadas en ambos hongos

<i>Neurospora crassa</i>		Buffer de fosfato de sodio	<i>Trichoderma atroviride</i>	
[mM]	pH		[mM]	pH
10	6, 7, 8		10	6, 7, 8
20	6, 7, 8		20	6, 7, 8
30	6, 7, 8		30	6, 7, 8
40	6, 7, 8		40	6, 7, 8
60	6, 7, 8		60	6, 7, 8
80	6, 7, 8		80	6, 7, 8

Figura 24. Diversidad de los fragmentos de micelio en una muestra



DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES

Figura 25. EFG de hifas de *Neurospora crassa* que migraron a través del capilar. Izquierda, en 201nm; centro, espectro de absorción y derecha, fotografía al microscopio de hifas recuperadas en el vial de salida (+zoom). Condiciones: muestra, 4mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos 10mM pH 8, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.

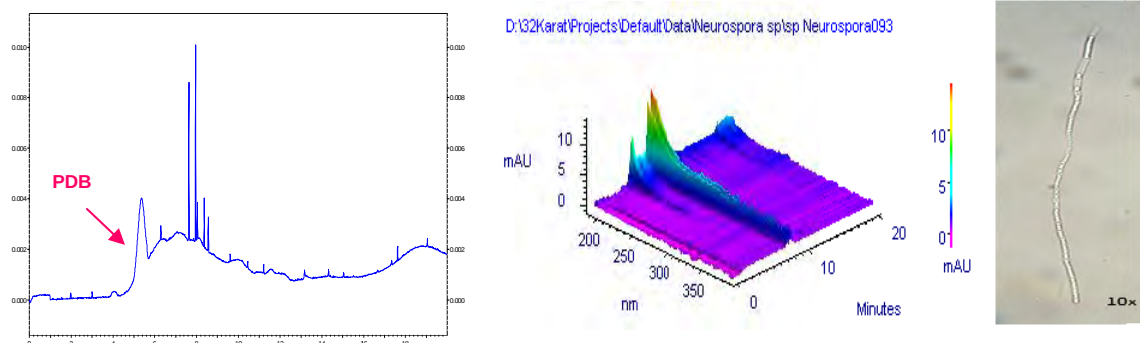


Figura 26. EFG de las hifas de *Trichoderma atroviride* que migraron a través del capilar. Izquierda, EFG en 201nm; centro, espectro de absorción y derecha, fotografía al microscopio de hifas recuperadas en el vial de salida (+zoom). Condiciones: muestra, 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos 30mM pH 8, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.

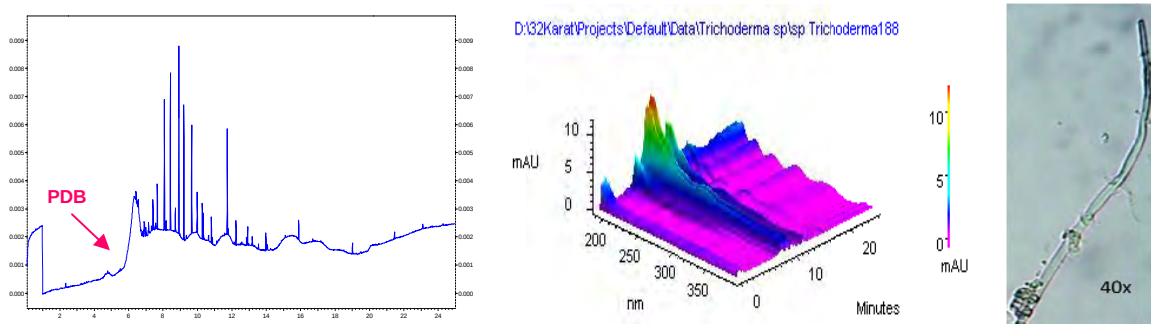
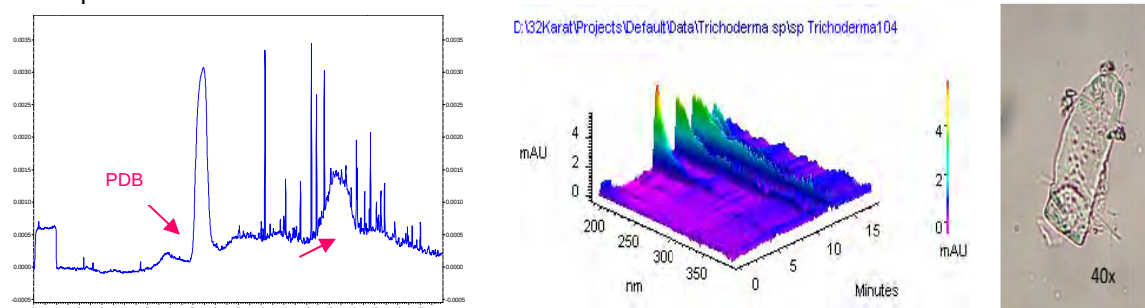


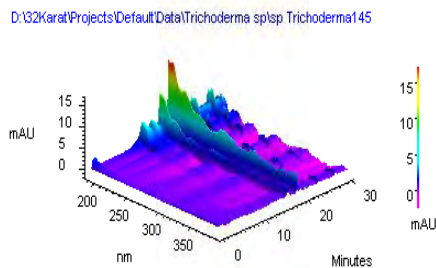
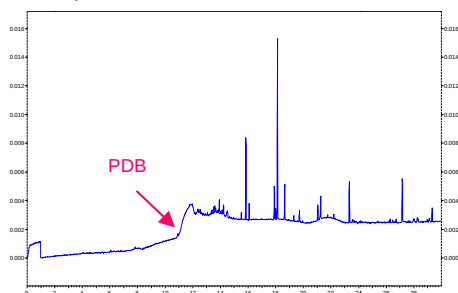
Figura 27. EFG de las hifas vacías de *Trichoderma atroviride* que migraron a través del capilar. Izquierda, EFG en 201nm; centro, espectro de absorción y derecha, fotografía al microscopio de hifas recuperadas en el vial de salida (+zoom). Condiciones: muestra, 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos en concentración y pH según se indique, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.

20mM pH 6

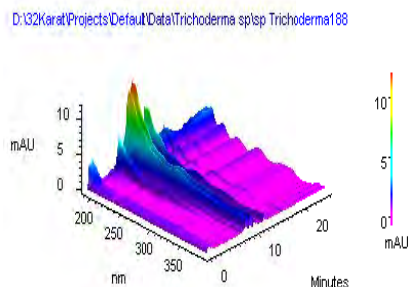
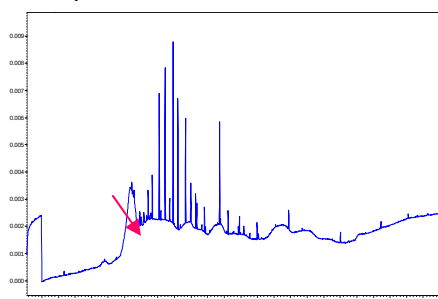


DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES

30mM pH 7



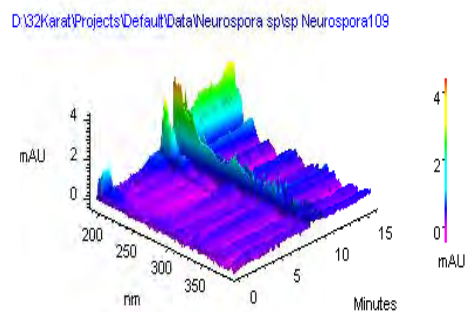
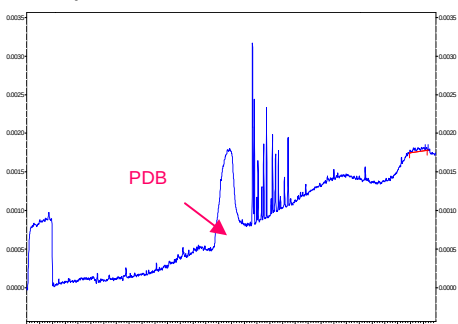
30mM pH 8



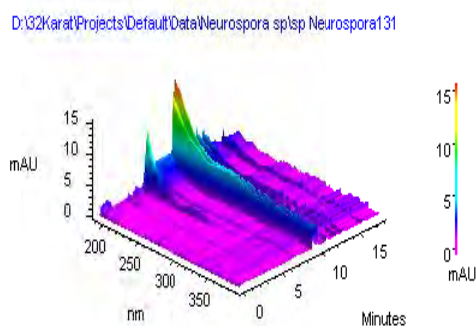
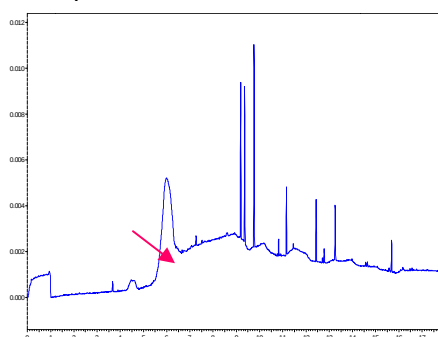
63

Figura 28. EFG de las hifas vacías de *Neurospora crassa* que migraron a través del capilar. Izquierda, EFG en 201nm; centro, espectro de absorción y derecha, fotografía al microscopio de hifas recuperadas en el vial de salida (+zoom). Condiciones: muestra, 4mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos en concentración y pH según se indique, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.

20mM pH 6

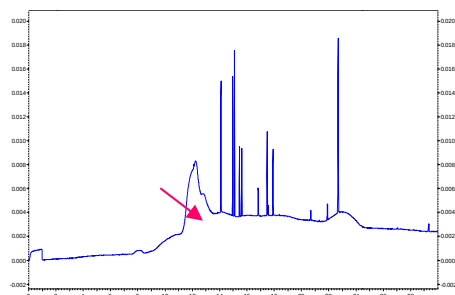


20mM pH 8

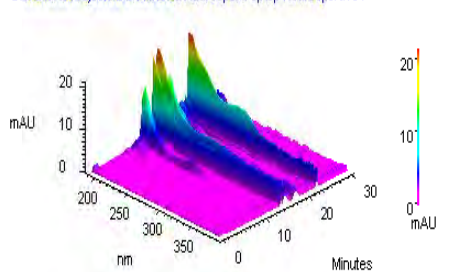


DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES

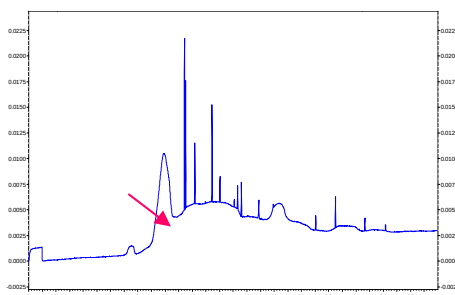
30mM pH 7



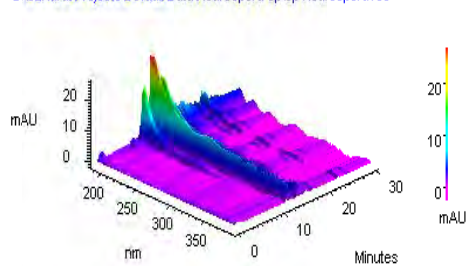
D:\32Karat\Projects\Default\Data\Neurospora sp\sp Neurospora154



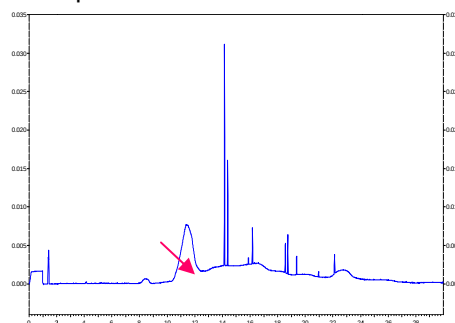
30mM pH 8



D:\32Karat\Projects\Default\Data\Neurospora sp\sp Neurospora169



40mM pH 8



D:\32Karat\Projects\Default\Data\Neurospora sp\sp Neurospora178

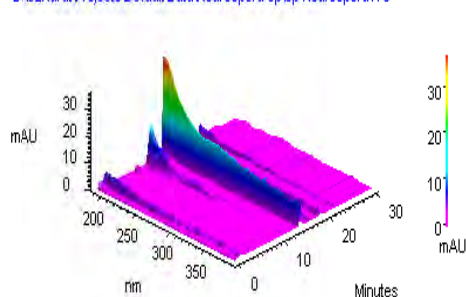
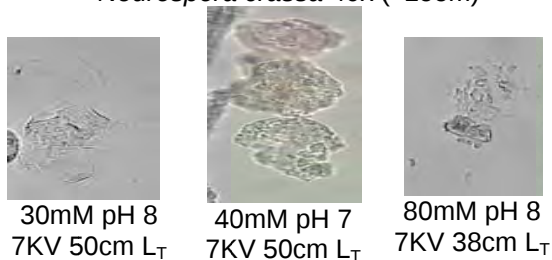


Figura 29. Algunos de los contenidos celulares recuperados después del proceso electroforético en distintas condiciones.

Neurospora crassa 40x (+zoom)



Trichoderma atroviride 40x (+zoom)



Figura 30. Esquemas de migración propuestos para los componentes celulares de *Trichoderma atroviride* y *Neurospora crassa*. Las esferas representan la diversidad de los componentes celulares. Arriba, migración como un paquete de partículas, que migra a través del capilar debido una carga neta aportada en conjunto por cada uno de los componentes de los contenidos celulares y su correspondiente EFG. Abajo, migración y separación de los contenidos celulares al someterse al campo eléctrico y tipo de EFG esperado.

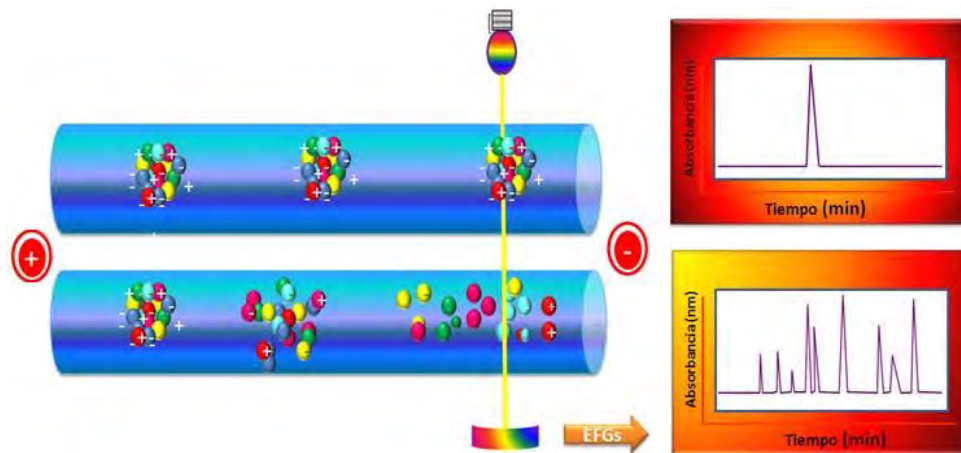
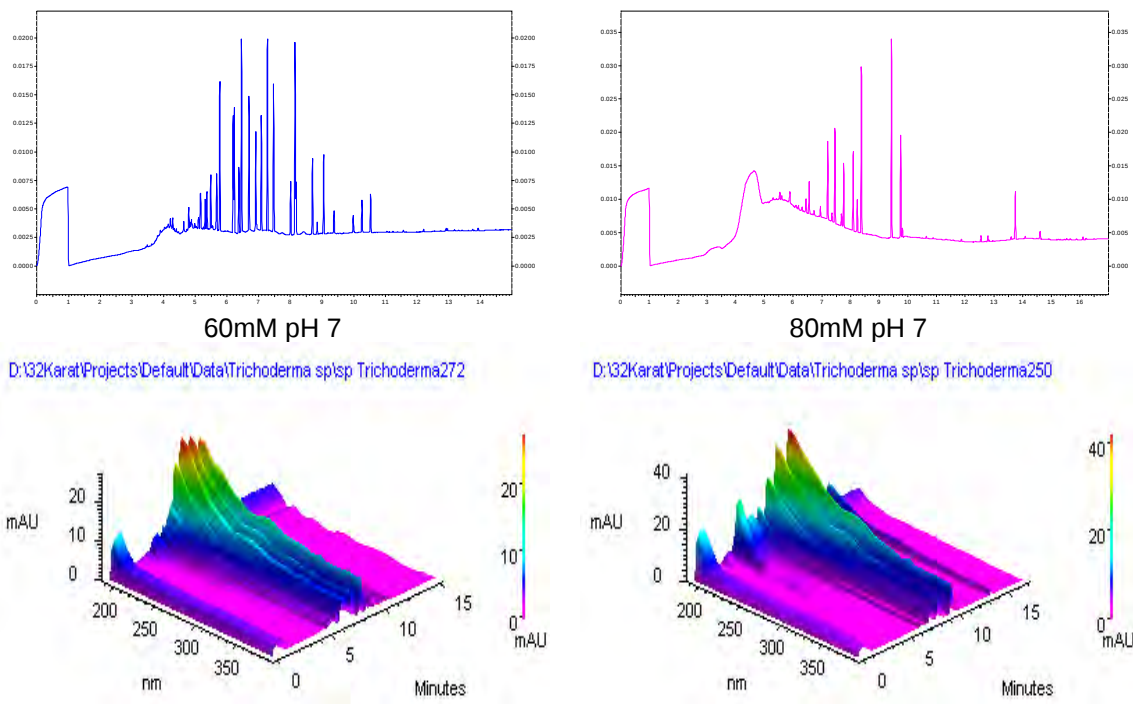
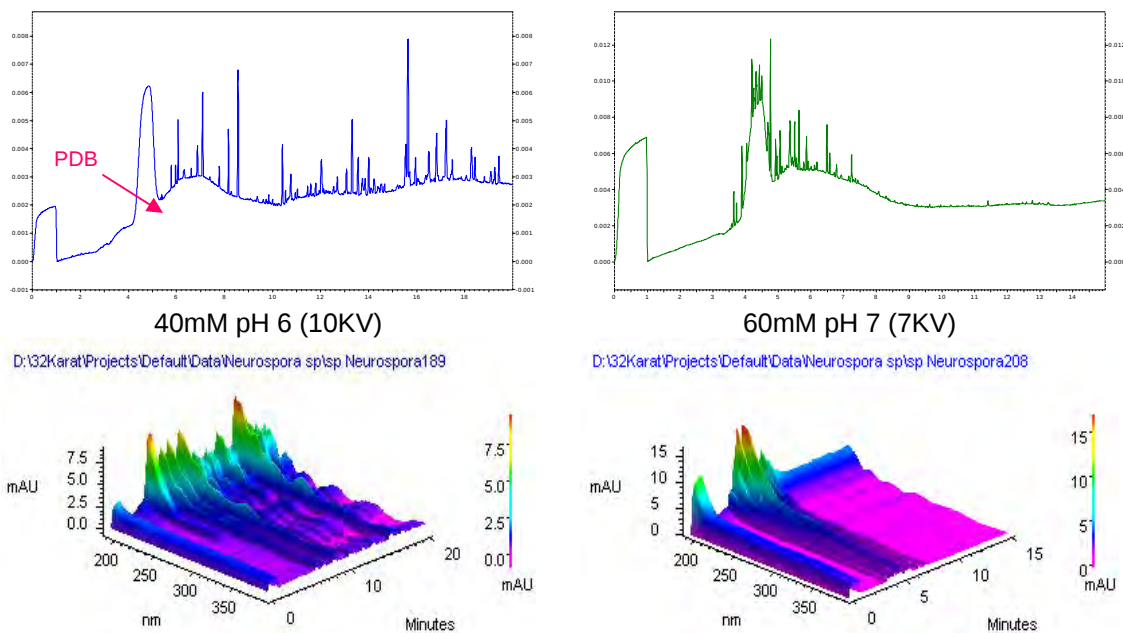


Figura 31. EFG de contenidos celulares de *Trichoderma atroviride*, en estos se supone la migración de los componentes como paquetes de partículas. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. Condiciones: muestra, 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos en concentración y pH según se indique, capilar 38cm L_T , 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 7KV.



DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES

Figura 32. EFG de los contenidos celulares de *Neurospora crassa*, en estos se supone la migración de los componentes como paquetes de partículas. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. Condiciones: muestra, 4mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos en concentración y pH según se indique, capilar 38cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi).



66

Figura 33. EFG de contenidos celulares de *Trichoderma atroviride*, en estos se supone la migración y separación de los componentes. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. Condiciones: muestra, 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos en concentración y pH según se indique, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 13.5 KV.

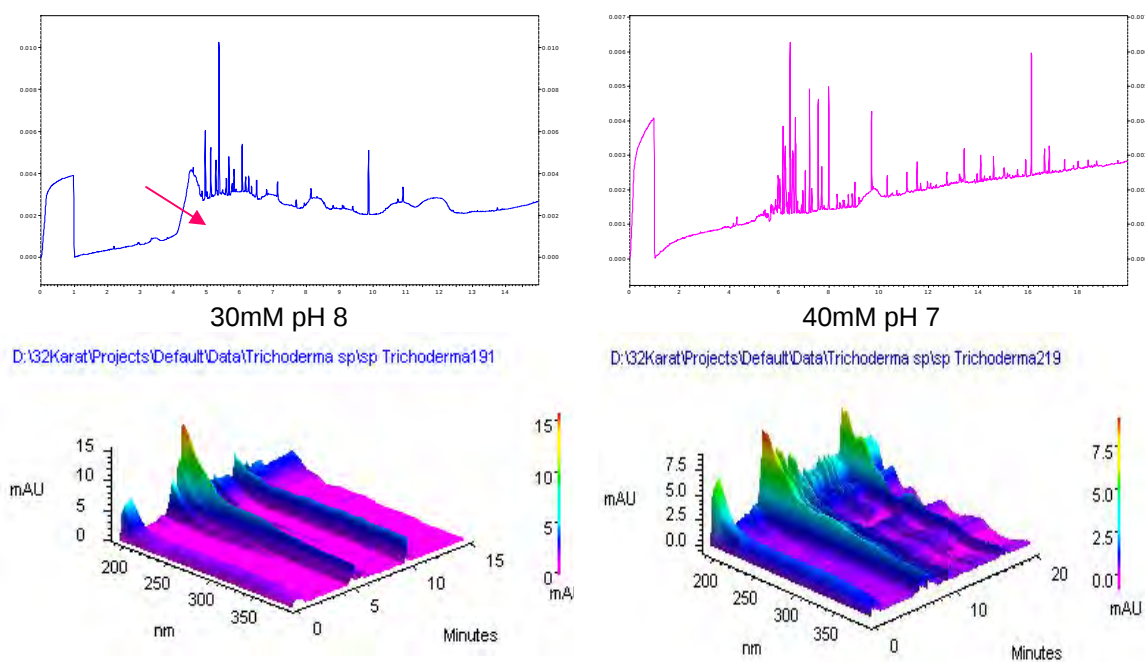


Figura 34. EFG de contenidos celulares de *Neurospora crassa*, en estos se supone la migración y separación de algunos componentes. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. Condiciones: muestra, 4mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos en concentración y pH según se indique, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi).

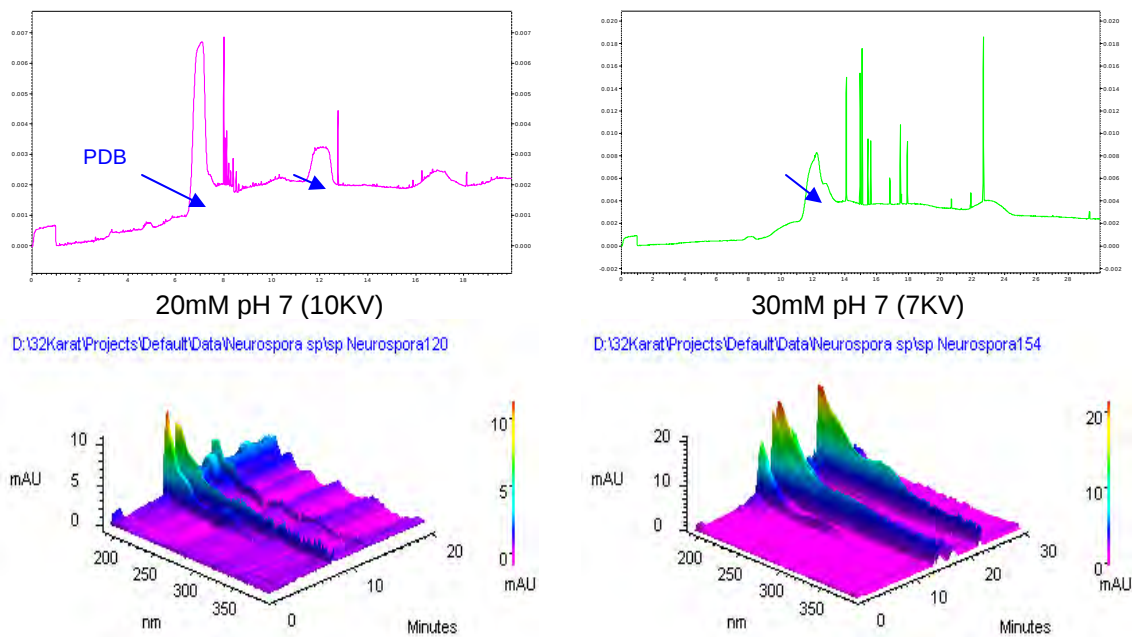


Figura 35. EFG de contenidos celulares de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*, en estos se ejemplifica las diferencias en los espectros de absorción y la similitud en su tiempo de migración, bajo las mismas condiciones. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. Condiciones: muestra, *Neurospora* 4mg y *Trichoderma* 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos 20mM y pH 8, capilar 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.

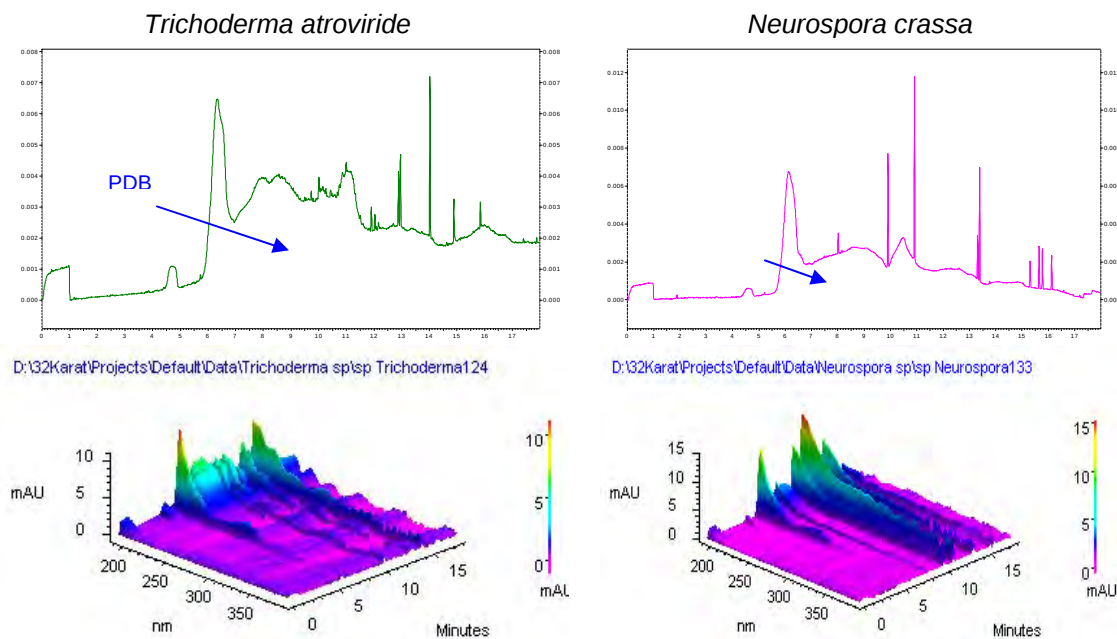


Figura 36. EFG de los contenidos celulares de *Trichoderma atroviride* del efecto del pH (6, 7 y 8) bajo una misma concentración de buffer. muestra 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos 80mM y pH según se indique, capilar 38cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.

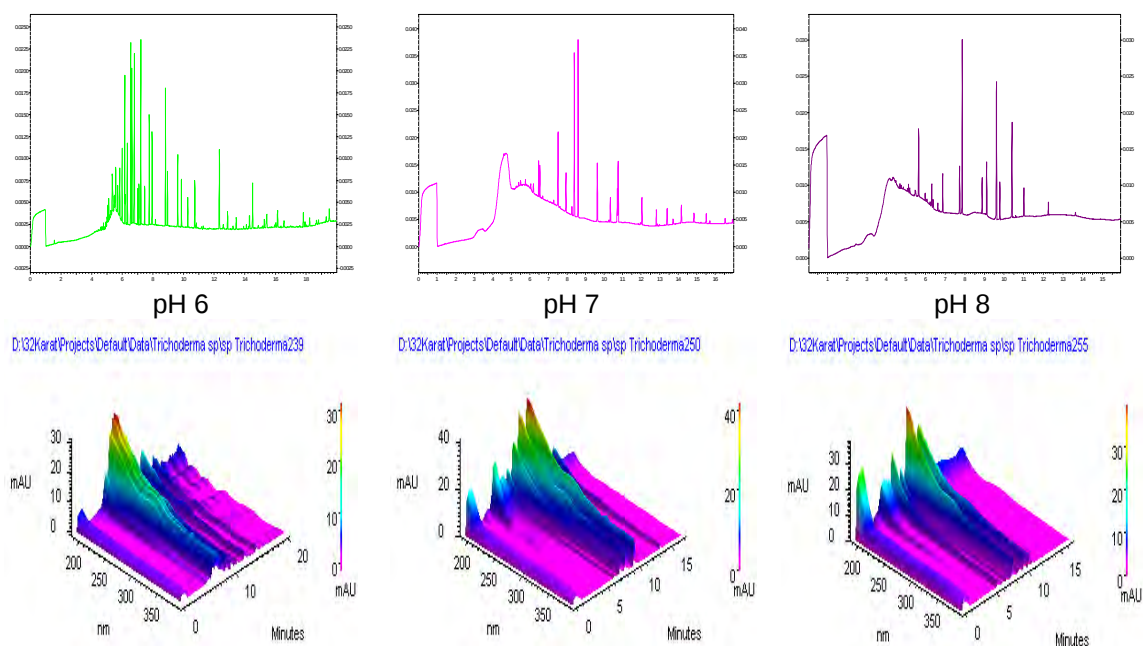
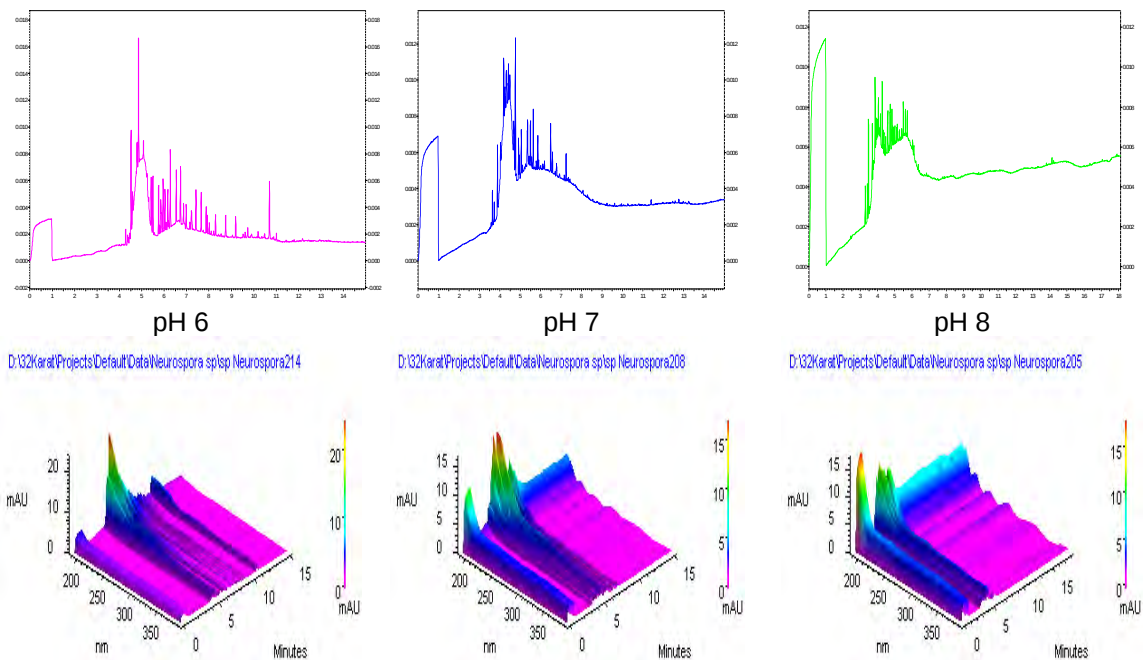
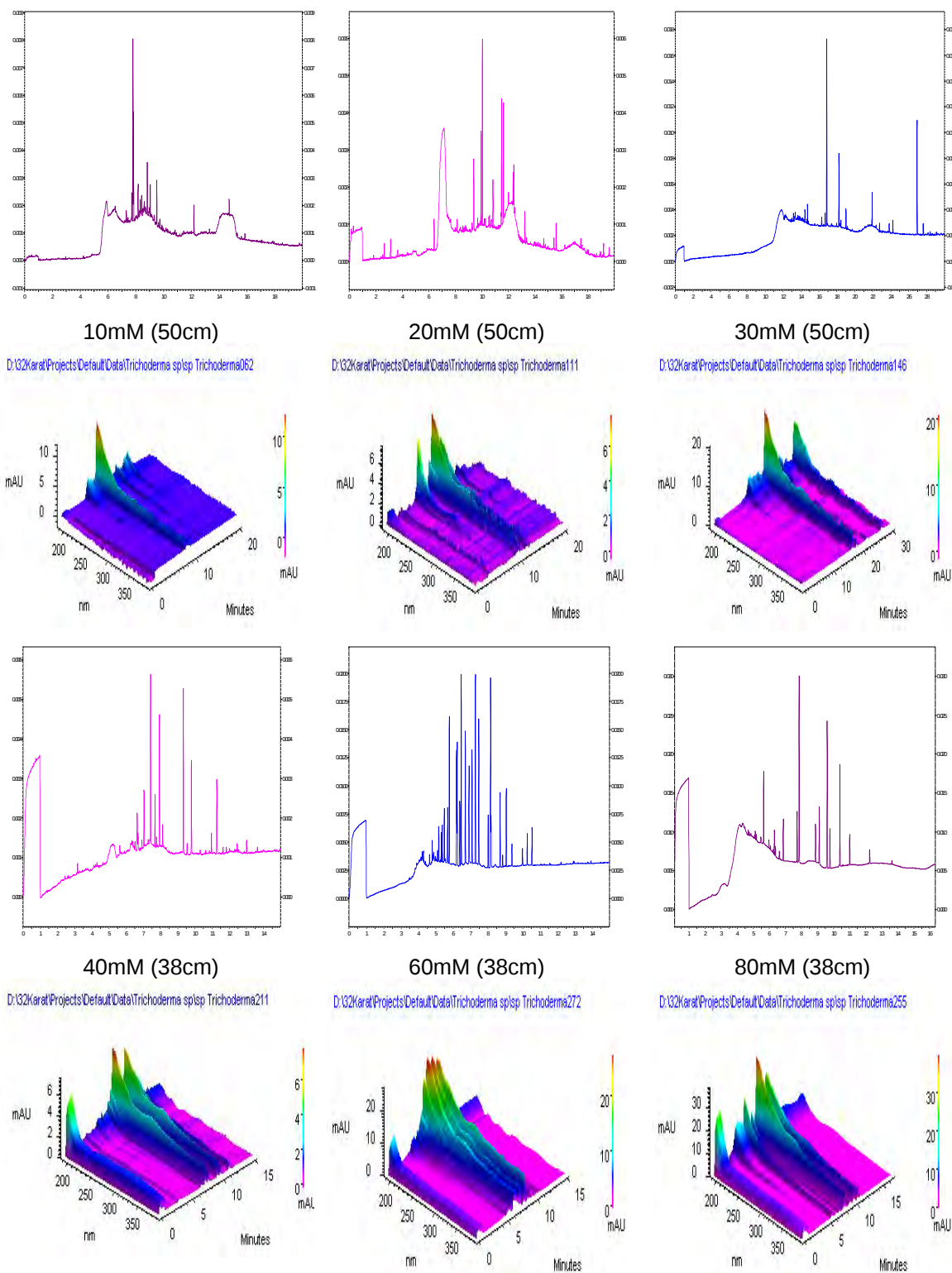


Figura 37. EFG de los contenidos celulares de *Neurospora crassa* del efecto del pH (6, 7 y 8) bajo una misma concentración de buffer. muestra 4mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos 80mM y pH según se indique, capilar 38cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 7KV.



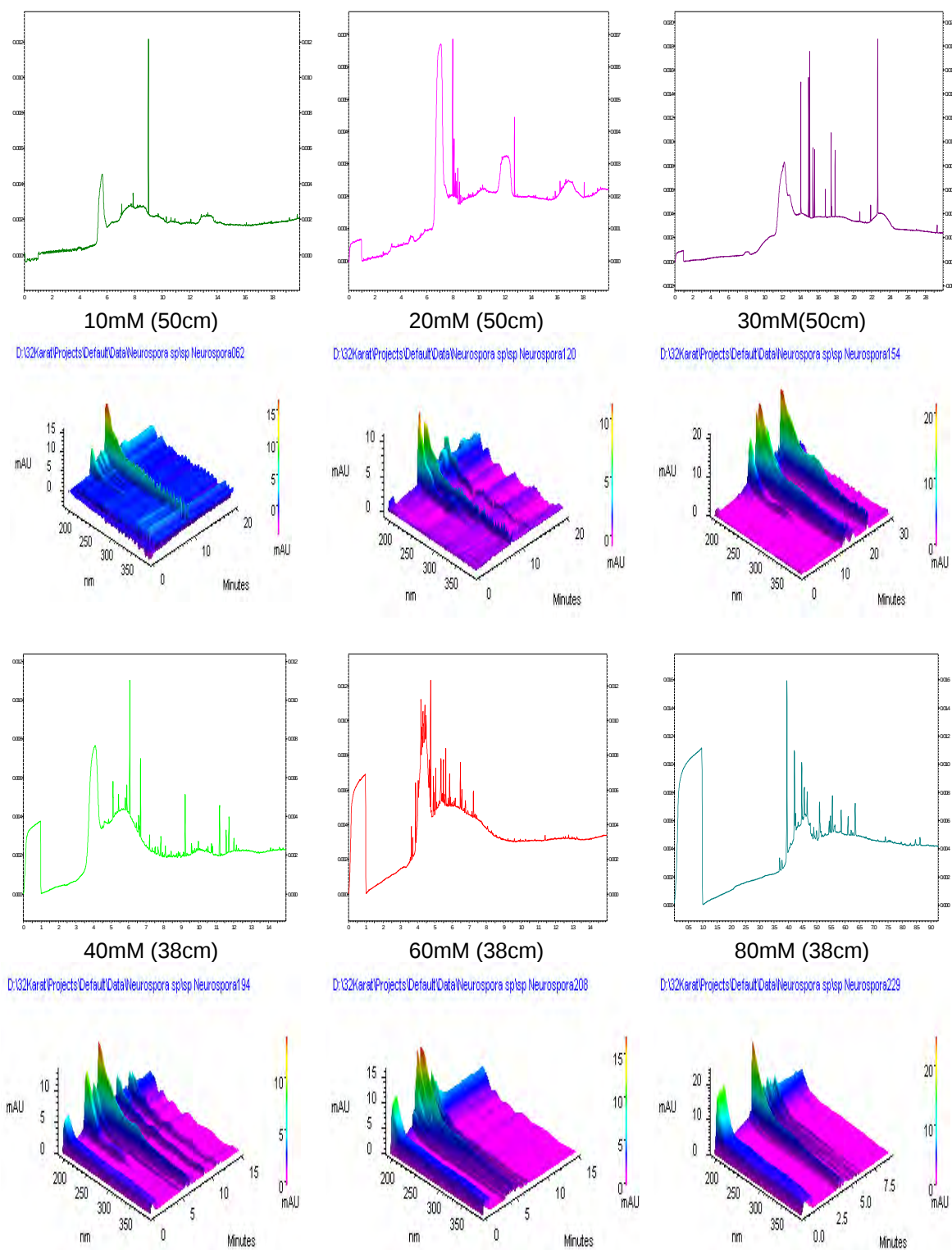
DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES

Figura 38. EFG de los contenidos celulares de *Trichoderma atroviride* del efecto la concentración del buffer bajo un mismo pH. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. muestra: 13mg de micelio/200μL de buffer de fosfatos pH7 y concentración según se indique, capilar 38 o 50cm L_T, 100μm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.



DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ELECTROFORÉTICAS DE CÉLULAS MICELIARES

Figura 39. EFG de los contenidos celulares de *Neurospora crassa* del efecto la concentración del buffer bajo un mismo pH. Arriba EFG a 201nm y abajo espectros de absorción. muestra: 4mg de micelio/200µL de buffer de fosfatos pH 7 y concentración según se indique, capilar 38 y 50cm L_T, 100µm DI, Inyección 10s (0.5psi), 10KV.



7.6 Electroforesis capilar para germínulas

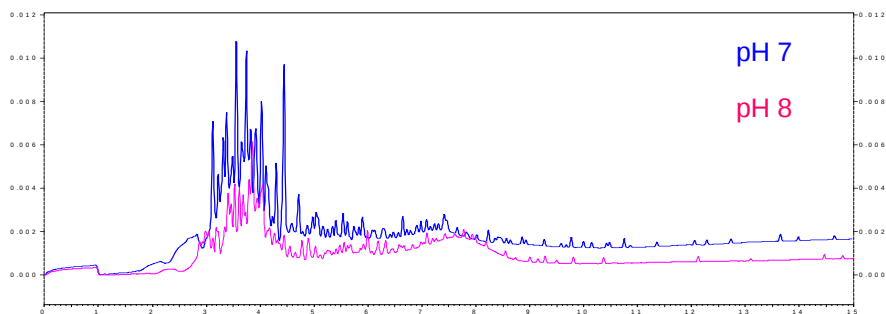
Una alternativa viable para el estudio de células miceliales lo representan las germínulas. Bajo las condiciones ensayadas se observó que fue posible la migración de germínulas de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*.

Para el análisis de *Trichoderma atroviride* se utilizaron germínulas con 14h de incubación (Fig. 16), en este tiempo de crecimiento tienen un tamaño aproximado de 15µm. En un buffer de fosfatos 10mM a pH 7 y 8 las germínulas de *Trichoderma atroviride* pasan a través del capilar en un tiempo de migración entre 2.5 y 5min (Fig. 40). Al final del análisis, fue posible recuperar las germínulas en el vial de salida, donde se observó al microscopio (Fig. 41) que los tamaños de estas células eran bastante diferentes entre sí, lo que explica, que los electroferogramas se expresen en varias bandas electroforéticas. En teoría podemos suponer que al igual que se ha visto en el análisis electroforético de bacterias [Szumski et al, 2008], los conjuntos y agregados de células más parecidos migran en una serie de de bandas que agrupa tamaños cercanos. Las bandas observadas para las germínulas de este hongo tienen un espectro de absorción al UV igual (Fig. 42), donde las únicas diferencias entre éstas radican en el tiempo de migración (relacionado al tamaño de la célula) y la intensidad de la señal registrada (debida su concentración).

El análisis electroforético de germínulas de *Neurospora crassa* se vio limitado por la falta de un cultivo de germínulas de tamaños relativamente homogéneo (Fig. 15). *Neurospora crassa* produce simultáneamente conidias y artroconidias de tamaños muy diferentes, en cultivo las artroconidias se desarrollan más rápido que las conidias, por lo que es necesario implementar algún método de separación de estos. Pese a esto, un cultivo de germínulas de 4h de incubación, nos permitió observar que es posible su migración. Utilizando un buffer de fosfatos 30mM a pH 7, las germínulas de este hongo migraron en varias bandas electroforéticas (Fig. 43), entre 2.5 y 6 minutos. El espectro de absorción al UV (Fig. 44) fue igual en todas las bandas aunque con un tiempo de migración

diferente. Al observar al microscopio el vial de salida se observaron germínulas, conidias y artroconidias (Fig. 45).

Figura 40. EFG a 201nm de germínulas de *Trichoderma atroviride*, 1.5×10^6 germínulas/200 μ L en buffer de fosfatos 10mM pH 7 y 8. Capilar 100 μ m DI, 38cm L_T , 13.5KV, inyección 10s (0.5 psi).



72

Figura 41. Fotografías al microscopio (40x +zoom) de germínulas de *Trichoderma atroviride* (teñidas con azul de metileno) después de su análisis electroforético con buffer de fosfatos 10mM pH 8. Capilar 100 μ m DI, 38cm L_T , inyección 10s (0.5 psi) y 13.5KV.

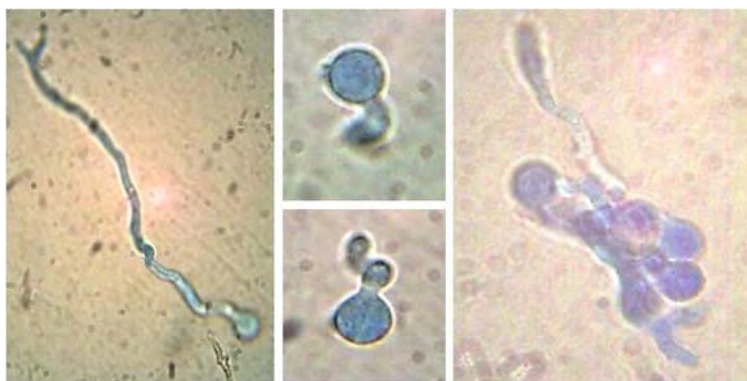


Figura 42. Espectro de absorción de germínulas de *Trichoderma atroviride*, 1.5×10^6 germínulas/200 μ L. Buffer de fosfatos 10mM pH 7. Capilar 100 μ m DI, 38cm L_T y 13.5KV.

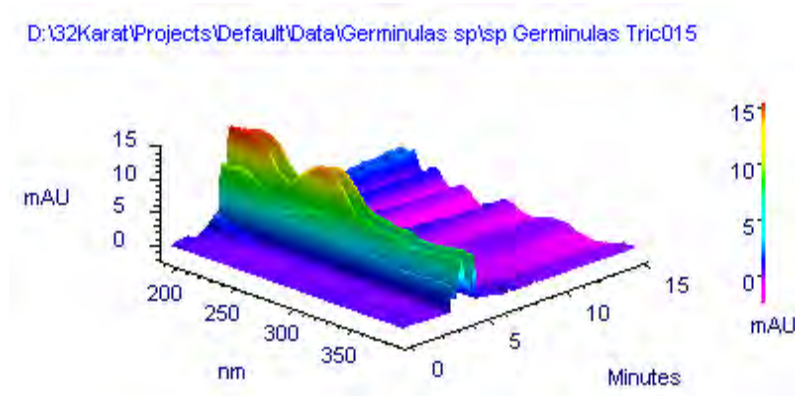
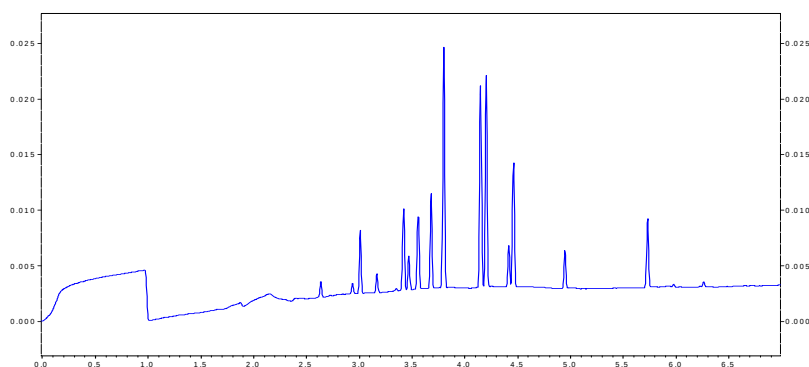


Figura 43. EFG a 201nm de germínulas de *Neurospora crassa*, 1.5×10^6 germínulas/200 μ L. Condiciones: buffer de fosfatos 30mM pH 7. Capilar 100 μ m DI, 38cm L_T y 15KV.



73

Figura 45. Espectro de absorción de germínulas de *Neurospora crassa*. Condiciones: buffer de fosfatos 30mM pH 7. Capilar 100 μ m DI, 28cm L_T y 15KV.

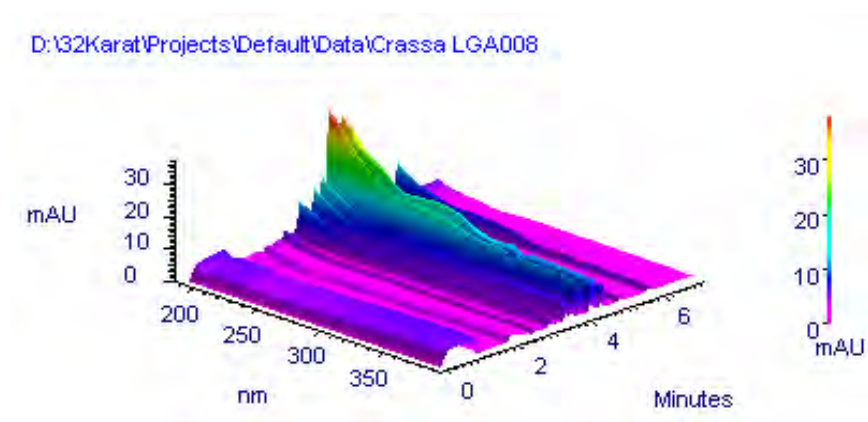
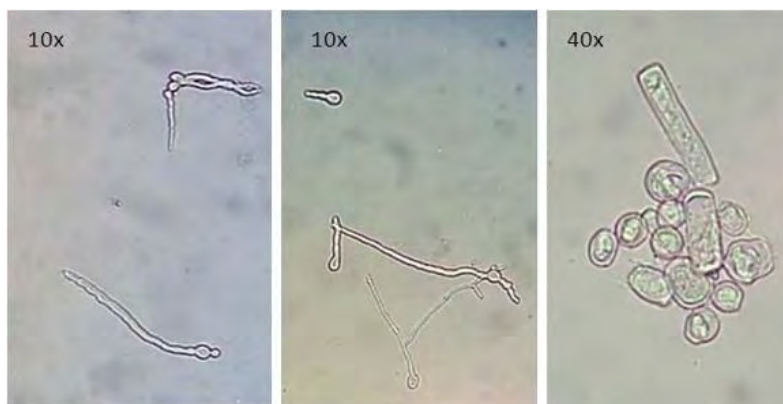


Figura 45. Fotografías al microscopio óptico (+zoom) de germínulas de *Neurosporacrassa*, después del análisis electroforético con fosfatos 30mM pH 7. Capilar 100 μ m DI, 28cm L_T y 15KV.



8. RESUMEN DE RESULTADOS

La EC ha probado ser una técnica valiosa para el estudio de materiales biológicos. En este trabajo se logró por medio de fragmentación mecánica y cultivos sumergidos estáticos la obtención de muestras de fragmentos de hifas lo más homogéneas posibles para su análisis por EC. Bajo las condiciones electroforéticas probadas de voltaje, longitud del capilar, concentración y pH del buffer; aunque no hubo un comportamiento electroforético característico para todos los fragmentos de hifas de *Neurospora crassa* y *Trichoderma atroviride*, sí se pueden separar sus componentes celulares (Ej. núcleos, organelos, etc). Además, se comprobó la posibilidad del estudio de células miceliales como germínulas en ambos hongos con buffer de fosfatos 10 y 30mM a pH 7. En el análisis de componentes celulares las concentraciones de buffer más altas (60 y 80mM) y pH 8 permitieron una mayor sensibilidad en la detección de estos. El voltaje y la longitud del capilar solo tuvieron un efecto importante sobre el tiempo de migración de los componentes y no en la separación.

9. CONCLUSIONES

75

Si es posible analizar células miceliales de *Trichoderma atroviride* y *Neurospora crassa* por electroforesis capilar, aunque con los estudios realizados hasta el momento no se pudo establecer un comportamiento característico para cada fragmento miceliar. Sin embargo, es posible separar componentes celulares, lo que abre las posibilidades para realizar otro tipo de estudios en estos hongos. Además, se probó por primera vez que es posible el análisis de germínulas por EC para ambos hongos, pero aun es necesario trabajo adicional para controlar y probar la conducta de estas en el sistema de EC.

10. PERSPECTIVAS

76

Probar la dispersión del micelio con otros ensayos de los detergentes, como tratamiento con buffer adicionado con el detergente sobre micelio lavado.

Probar en el micelio diversos morfógenos, tales como sorbosa, para inducir el crecimiento colonial y restringir su tamaño.

Estudiar el comportamiento electroforético de germínulas con distintos tipos de soluciones buffer y diferentes valores de pH.

Aislar mediante EC las diferentes fracciones celulares para su posterior caracterización.

11. REFERENCIAS

- Adams D.J. 2004. Minireview: Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150: 2029–2035.
- Alexopoulos C.J. and Mims M. B. 1996. *Introductory mycology*. Edited by John Wiley and Sons, inc. Fourth edition. New York.
- Altria K. D. 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr*; 856: 443-63.
- Amanullah A., Blair R., Nienow A. W. and Thomas C. R. 2000. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*; 62(4): 434-446.
- Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal*; 5(2): 109-114.
- Armstrong D. W., Schulte G, Schneiderheinze JM, Westenberg DJ. 1999. Separating microbes in the manner of molecules, capillary electrokinetic approaches. *Analytical Chemistry*. 71:5465-5469.
- Armstrong D. W., Schneiderheinze J.M. 2000. Rapid identification of the bacterial pathogens responsible for urinary tract infections using direct injection CE. *Anal Chem*; 72 (18): 4474-6.
- Armstrong D. W. and He L. 2001. Determination of cell viability in single or mixed samples using capillary electrophoresis laser-induced fluorescence microfluidic Systems. *Anal. Chem* 73: 4551-4557.
- Armstrong D.W., Schneiderheinze M.J., Kullman J.P and He L. 2001. Rapid CE microbial assays for consumer products that contain active bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 194: 33-37.
- Armstrong D.W., Girod M, He L, Rodríguez M. A, Zheng and J, Yeung ES. 2002. Mechanistic aspects in the generation of apparent ultrahigh efficiencies for colloidal (microbial) electrokinetic separations. *Anal Chem*; 74 (21): 5523-30.
- Bao Y., Lantz A. W., Crank J. A., Huang J and Armstrong D. W. 2008. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 29, 2587–2592.
- Benítez T., Rincón A. M. Limón M. C. and Codón A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int Microbiol*; 7(4):249-260.

Beckman INC. 1991. Introduction to capillary electrophoresis. Handbook by Beckman Company. Pg 1-11.

Berlin V. and Anofsky C. 1985. Isolation and characterization of genes differentially expressed during conidiation of *Neurospora crassa*. Molecular and Cellular Biology; 5(4):849-855.

Berthod A., Rodríguez M. and Armstrong D. W. 2002. Evaluation of molecule-microbe interactions with capillary electrophoresis procedures, utility and restrictions. Electrophoresis; 23(6): 847-57.

Bhanoori M. and Venkateswerlu G. 2000. In vivo chitin-cadmium complexation in cell wall of *Neurospora crassa*. Biochimica et Biophysica Acta; 1523 (1): 21-28.

Bonifaz A. 2002. Micología médica básica. Fernández editores. Segunda edición. México D.F. 2: 14.

Borkovich K. A., et al. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiology and Molecular Biology Reviews; 68(1): 1-108.

Brizuela M. A., García L., Pérez L. y Mansur M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev Iberoam Micol; 15: 69-74.

Brunner K., Zeilinger S., Ciliento R., Sheridian L.W., Lorito M., Kubicek C. P. and Mach R. L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Applied and Environmental Microbiology; 71(7): 3959–3965.

Brunner M and Káldi K. 2008. Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. Mol Microbiol; 68(2):255-62.

Brzobohatty B. and Kovacs L. 1986. Factors enhancing genetic transformation of intact yeast cells modify cell wall porosity. Journal of General Microbiology ; 132: 3089-3093.

Butkus MA, Bays J.T. and Labare M.P. 2003. Influence of surface characteristics on the stability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology. 69:3819-3825.

Cardemil L. and Pincheira G. 1979. Characterization of the carbohydrate component of Fraction I in the *Neurospora crassa* cell wall. Journal Of Bacteriology; 137(3): 1067-1072.

Cazares García S.V. 2007. Estudio de la factibilidad del análisis de células fúngicas por electroforesis capilar. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Químico Farmacobiología: Tesis de Licenciatura.

Chhabra D. and Dhakad N. K. 2008. Study on Pathogenicity of the *Aspergillus* species in experimentally immunosuppressed mice. *Veterinary World*; 1(3): 69-70.

Ciccone B. 2001. A buffer system for capillary electrophoresis. *American Laboratory*; 30-33p.

Daba A.S. and Ezeronye O.U. 2003. Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 672-678.

De Beare T, Van Keerberghrn A, Van Hauwe P, De Beenhouwer H, Boel A, Verschraegen G, Claeys G. and Vaneechoutte M. 2005. An interlaboratory comparison of ITS2-PCR for the identification of yeasts using the ABI Prism 310 and CEQ8000 capillary electrophoresis systems. *BMC Microbiology* 5

Desai M.J. and Armstrong D.W. 2003. Separation, identification, and characterization of microorganisms by capillary electrophoresis. *Microbiology and molecular biology reviews*; 67 (1): 38–51.

Dodd S. L., Lieckfeldt E. and Samuels G.J. 2003. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia*; 95(1): 27–40.

Dodd S. L., Hill R. A. and Steward A. 2004. Monitoring the survival and spread of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* (C65) on kiwifruit using a molecular marker. *Australasian Plant Pathology*; 33(2): 189–196.

Ebersole R.C and McCormick RM. 1993. Separation and isolation of viable bacteria by capillary zone electrophoresis. *Biotechnology (NY)*; 11 (11): 1278-82

Ezziyyani M., Pérez- Sánchez C., Ahmed S. A., Requena M. E. and Candela M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimienta (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*; 26: 35-45.

Farkas V. 1979. Biosynthesis of Cell Walls of Fungi. *Microbiological Reviews*; 43(2): 117-144.

Filip C., Fletcher G., Wulff J. L. and Earhart C. F. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *Journal of Bacteriology*; 115(3):717-722.

Fox M. B., Esveld D. C., Valero A., Luttge R., Mastwijk H. C., Bartels P. V., van den Berg A. and Boom R. M. 2006. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. *Anal Bioanal Chem*; 385: 474–485.

Fuks F., Hurd P. J., Deplus R. and Kouzarides T. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase . Nucleic Acids Research: 31(9): 2305-2312.

Galagan J. E. et al. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature; 422: 859-868.

García-Cañas V and Cifuentes A. 2007. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. Electrophoresis; 28: 4013–4030.

Garisto Donzelli G. B. and Churchill A. C. L. 2007. A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. Phytopathology; 97(8): 916-929

Gillie O. J. 1968. Growth of *Neurospora crassa* in unstirred liquid cultures. J . gen. Microbiol: 51: 179-184.

Girod M, and Armstrong D. W. 2002. Monitoring the migration behavior of living microorganisms in capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection with a charge-coupled device imaging system. Electrophoresis, 23: 2048–2056.

Gutiérrez S, Casqueiro J y Martín J. F. 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. Rev Iberoam Micol; 17: S54-S60.

Harris C. D. 2001. Análisis químico cuantitativo. Segunda edición. Editores Reverte. Barcelona-Bogotá- Buenos Aires- Caracas-México. 22:609-626.

Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga E. A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E. and Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma spp.* Applied And Environmental Microbiology; 66(5): 1890–1898.

Herrera T y Ulloa M. 2004. El reino de los hongos: micología básica y aplicada. 2da edición, primera reimpresión. Publicado por el Fondo de Cultura Económica. Pg. 21-23 y 36-40.

Hickey P. C., Jacobson D. J., Read N. D. and N. Glass N. L. 2002. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. Fungal Genetics and Biology; 37(1):109-119.

Higuchi C. T., Sannomiya M., Pavan F. R., Leite S. R. A, Sato D. N., Franzblau S. G., Sacramento L. V. S., Vilegas W. and Leite C. Q. F. 2008. *Byrsonima fagifolia* Niedenzu Apolar compounds with antitubercular activity. eCAM; doi:10.1093/ecam/nen077

Holder D. J. and Keyhani D.O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied And Environmental Microbiology*; 71: 5260–5266.

Horká M., Ruzicka F., Hola V. and Slais K. 2006. Capillary isoelectric focusing of microorganisms in the pH range 2–5 in a dynamically modified FS capillary with UV detection. *Anal Bioanal Chem.*; 385: 840–846.

Horká M., Kubíček O., Ruzicka F., Hola V., Malinovska I. and Slais K. 2007. Capillary isoelectric focusing of native and inactivated microorganisms. *Journal of Chromatography A*; 1155: 164–171.

Horka M. Ruzicka F.,Kubesová A., Holá V. and Slais K. 2009. Capillary Electrophoresis of Conidia from Cultivated Microscopic Filamentous Fungi. *Anal. Chem.*; DOI: 10.1021/ac900374v.

<https://eapbiofield.wikispaces.com/file/view/hypha.gif>

Jackowski M., Szeliga J., Kłodzińska E. and Buszewski B. 2008. Application of capillary zone electrophoresis (CZE) to the determination of pathogenic bacteria for medical diagnosis. *Anal Bioanal Chem*; 391:2153–2160.

Jauniaux J. C., Urrestarazu L. A, AND Wlame J. M. 1978. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the Enzymes. *Journal Of Bacteriology*; 133(3): 1096-1107.

Jûsten P., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. 1998. A mathematical model for agitation-induced fragmentation of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Engineering* 18:7-16.

Kays A. M., Rowley P. S., Baasiri R. A., and Borkovich K. A. 2000. Regulation of conidiation and Adenylyl cyclase levels by the G α protein GNA-3 in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*; 20(20): 7693-7705.

Klanner C., Prokisch H, and Thomas Langer T. 2001. MAP-1 and IAP-1, two novel AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces in mitochondrial inner membrane of *Neurospora crassa*. *MBC online*; 12(9): 2858-2869.

Latgé J.P. 2007. The fungal cell wall polyssacharidome. *Memories of The first international fungal / plant cell wall meeting: Cell wall polysaccharides of fungi and plants*, Paris France. Online available.

Latgé J.P. 2007. Microreview: The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*; 66(2):279–290.

Lim E. L, Tomita A. V, Thilly W.G, and Polz MF. 2001. Combination of competitive quantitative PCR and constant denaturant capillary electrophoresis for high

resolution detection and enumeration of Microbial Cells. Applied and Environmental Microbiology; 67:3897-3903.

Lindequist U, Niedermeyer T. H. J. and Wolf-Dieter J. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. eCAM 2(3): 285-289.

Linhardt R. J. and Toida T. 2002. Ultra-high resolution separation comes of age. Science; 298: 1441-1442.

Liu Y., He Q. and Cheng P. 2003. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White collar proteins. CMLS, Cell. Mol. Life Sci; 60: 2131–2138.

LU C.F., Kurjan J. and Lipkel P.N. 1994. A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* α -agglutinin. Molecular and Cellular Biology; 14(7):4825-4833.

Lull C, Wichers HJ and Savelkoul H.F. J.2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. Mediators of Inflammation; 2: 63–80.

Lytle DA, Rice EW, Johnson CH, Fox KR. 1999. Electrophoretic mobilities of *Escherichia coli* O157:H7 and wild-type *Escherichia coli* strains. Applied and Environmental Microbiology 65:3222-3225.

Lytle D, Frietch C. and Covert T. 2004. Electrophoretic mobility of *Mycobacterium avium* complex organisms. Applied and environmental Microbiology 70:5667-5671

Mahadevan P.R. and Tatum E. L. 1965. Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild-type and colonial morphology. Journal of Bacteriology; 90(4):1073-1081.

Mahadevan P.R and Tatum E. L. 1967. Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. Journal of Cell Biology; 35: 295-302.

Margraf R.L., Erali M., Liew M. and Wittwer C.T. 2004. Genotyping Hepatitis C virus by heteroduplex mobility analysis using temperature gradient capillary electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology; 42:4545-4551.

Murray P.R, Rosental K. S, Kobayashi G. S and Faller M. A. 1999. Principios básicos de microbiología medica. Cuarta edición. Editor Elsevier, Madrid España. 66-69 p.

Mayayo Artal E. 2004. Diagnóstico histopatológico de las micosis. Rev Iberoam Micol; 21: 1-9.

Mazurek B., Lubicki P. and Staroniewicz Z. 1995. Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation; 2(3): 418-425.

More M. I., Herrick J. B., Silva M. C, Ghiorse W. C. and Madsen E. L. 1994. Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Applied And Environmental Microbiology*; 60(5): 1572-1580.

Muller F. M. C., Werner E., Kasai M., Francesconi A, Chanock S. J and Walsh T.J. 1998. Rapid extraction of genomic DNA from medically important Yeasts and filamentous fungi by High-Speed Cell Disruption. *Journal Of Clinical Microbiology*; 36(6): 1625–1629.

Neil A.R, Gow and Geoffrey M. Gadd. 1995. *The growing fungus*. Edited by Springer. Segunda edicion; 1:43-47 and 3:42-57.

Oda R.P. and Landers J.P. (1996). *Handbook of capillary electrophoresis: introduction to capillary electrophoresis*. Oda R.P. and Landers JP, Editors. 2nd. Ed. CRC Press, Boca Raton. 7-8 p.

Okun VM, Ronacher B. and Kenndler E. 1999. Separation and biospecific identification of subviral particle of human rhinovirus serotype 2 by capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem*; 71(20):4480-5.

Okun VM, Moser R., Blaas D and Kenndler E. 2001. Complexes between monoclonal antibodies and receptor fragments with a common cold virus: determination of stoichiometry by capillary electrophoresis. *Anal Chem*; 73(16):3900-6.

Orbera Ratón T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 15-19.

Osharov N. and May G. S. 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*; 199: 153-160.

Palenzuela B, Simonet B.M., García R.M., Ríos A., and Valcárcel M. 2004. Monitoring of bacterial contamination in food samples using capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem*. 76:3012-3017.

Pandey A., Roca M. R., Read N. D, and Glass N. L. 2004. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*; 3(2): 348-358.

Peñas M.M, Rust B, Larraya L.M, Ramírez L, and Pisabarro A.G. 2002. Differentially regulated, vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8): 3891–3898.

Perkins D. D. and Davis R. H. 2000. Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses. *Applied and Environmental Microbiology*; 66 (12):5107–5109.

Pfetsch A., and Welsch T. 1997. Determination of the electrophoretic mobility of bacteria and their separation by capillary zone electroforesis. *Fresenius' Journal of analytical Chemistry*; 359(2): 198-201

Pitarch A, Nombela C and Gil C. 2008. Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. Online book: *Methods in Molecular Biology*; volume 425, 217-239p.

Poitevin M., Morin A., Busnel J. M., Descroix S., Hennion M. C and Peltre G. 2007. Comparison of different capillary isoelectric focusing methods—use of “narrow pH cuts” of carrier ampholytes as original tools to improve resolution. *Journal of Chromatography A*; 1155: 230–236.

Pocasangre L.E., Menjivar R. D., Alexandra Z. F., Riveros A.S., Rosales F. E. y Sikora R. A. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonematodos en banano. XVIII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical. Santa Catarina Brasil.

Pontón J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol*; 25:78-82.

Rey M., Delgado-Jarana J., Rincón A. M., Limón C. y Benítez T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Rev Iberoam Micol*; 17: S31-S36.

Rocha-Ramírez V., Omero C., Chet I., Horwitz B. A. and Herrera-Estrella A. 2002. *Trichoderma atroviride* g-protein α -subunit gene *tga1* is involved in mycoparasitic coiling and conidiation. *Eukaryotic Cell*; 1 (4): 94–605.

Rodriguez S. B. and Mahoney N.E. 1994. Inhibition of Aflatoxin Production by Surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*; 60(1): 106-110.

Rosales-Saavedra T., Esquivel-Naranjo E. U., Casas-Flores S., Martínez-Hernández P., Ibarra-Laclette E., Cortes-Penagos C. and Herrera-Estrella A. 2006. Novel light-regulated genes in *Trichoderma atroviride*: a dissection by cDNA microarrays. *Microbiology*, 152: 3305–3317.

Ruán-Soto F, Garibay-Orijel R, and Cifuentes J. 2006. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*; 2:3.

Ruiz-Herrera J. 1997. Fungal cell wall: structure, synthesis and assembly. Primera edición. Editor CRC Press.

Ruiz-Herrera J. 2001. El asombroso reino de los hongos. Avance y Perspectiva; 20:275-28.

Sakamoto C, Yamaguchi N, and Nasu M. 2005. Rapid and simple quantification of bacterial cells by using a microfluidic device. Applied and Environmental Microbiology. 71:1117-1121.

Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., and McCray E.B. 2008. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA.

Savage G. M. and M. J. Vander Brook. 1946. The fragmentation of the mycelium of *Penicillium notatum* and *Penicillium chrysogenum* by a high speed blender and the evaluation of blended seed.jb.asm.org 385-391 p.

Schmith J. C., Edson J. C., and Brody S. 1975. Changes in glucosamine and galactosamine levels during conidial germination in *Neurospora crassa*. Journal of Bacteriology; 122(3):1062-1070.

Shatkin A. J and Tatum E. L. 1959. Electron microscopy of *Neurospora crassa* mycelia. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology; 6(3): 423- 426.

Shintani T, Yamada K, Torimura M. 2002. Optimization of a rapid and sensitive identification system for *Salmonella enteritidis* by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence. FEMS Microbiology Letters; 210: 245-249

Simonet B. M., Ríos A., and Miguel Valcárcel. 2005. Capillary Electrophoresis Separation of Microorganisms. Methods in Molecular Biology; 384: 569-590. Edited by: P. Schmitt-Kopplin © Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Steele G. C. y Trinci A. P. J. 1975. Morphology and Growth Kinetics of Hyphae of Differentiated and Undifferentiated Mycelia of *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology; 91: 362-368.

Stephan Seiler S. and Michael Plamann M. 2003. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Mol. Biol. Cell; 10.1091/mbc.E02-07-0433.

Trinci A. P J. 1969. A Kinetic Study of the Growth of *Aspergillus nidulans* and Other Fungi. J. gen. Microbiol; 57(2): 11-24.

Tucker K. G. and Thomas C. R. 1994. Inoculum effects on fungal morphology: shake flasks vs agitated bioreactors. Biotechnology Techniques; 8(3): 153-156.

Turian G. and Bianchi D. E. 1972. Conidiation in *Neurospora*. The botanical review; 38(1): 119-146.

Van Der Mei HC and Busscher HJ. 2001. Electrophoretic mobility distributions of single strain microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 67:491-494.

Vázquez Gacidueñas María Soledad. 1989. Efecto de la l-sorbosa sobre las células de la cepa silvestre *Neurospora crassa*. Universidad de Guanajuato, Facultad de Ciencias Químicas. Tesis de Licenciatura.

Vázquez Gacidueñas María Soledad. 1997. Análisis del sistema glucanólítico del agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*. Universidad de Guanajuato, Facultad de Química. Tesis de Doctorado.

www.fgsc.net/Neurospora/neurospora.html. The *Neurospora* home page is a collaborative effort of Drs. A.J.F. Griffiths of the University of British Columbia and Kevin McCluskey at the Fungal Genetics Stock Center.

www.pasteur.fr/.../RAR/RAR2003/Aspergil-en.html

www.uib.es/.../modulos/modulo6/quitina.gif

Yeo S.F and Wong B. 2002. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical microbiology Reviews* 15(3):465-480.

Ye Bao Y., Lantz A. W., Crank J. A., Huang J y Armstrong D. W.1. 2008. The use of cationic surfactants and ionic liquids in the detection of microbial contamination by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 29: 2587–2592

Zhang Y., Lamm R., Pilonel R., Lam S. and Xu J. R. 2002. Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Applied and Environmental Microbiology*; 68(2): 532-538.