



## CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD Y DEL DAÑO CELULAR EN ESPORAS DE *Trichoderma harzianum*, SECADAS POR ASPERSIÓN, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Ana Laura Muñoz-Celaya<sup>1,2</sup>, Angélica Meneses<sup>3</sup>, Raunel Tinoco<sup>1</sup>, Enrique Galindo<sup>1</sup>, Leobardo Serrano-Carreón<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología UNAM, <sup>2</sup>Adscripción actual: Agro&Biotecnia S de RL MI, <sup>3</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Farmacia. Cuernavaca, 62210, almuno@ibt.unam.mx

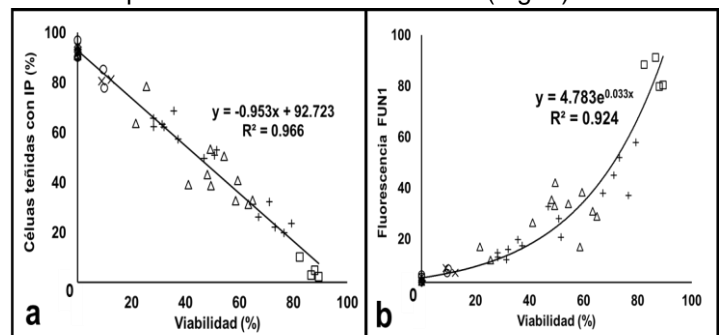
**Palabras clave:** *Trichoderma harzianum*, citometría de flujo, viabilidad.

**Introducción.** *T. harzianum* ha sido utilizado de forma efectiva para disminuir el daño causado por varios hongos fitopatógenos en diferentes cultivos de interés comercial. En la formulación de agentes de control biológico (ACB), el principal parámetro a evaluar es la viabilidad del ACB después de los procesos de acondicionamiento, así como en el almacenamiento. De manera tradicional, se cuantifican las unidades formadoras de colonias con la técnica de cuenta en placa, la cual introduce un alto error experimental y consume mucho tiempo. Por ello, el uso combinado de citometría de flujo y de compuestos fluorescentes, representa una alternativa rápida y eficiente para evaluar la concentración de células viables. Diversos autores han reportado el uso del fluoróforo FUN1 para evaluar la actividad metabólica en levaduras y hongos (1,2). También ha sido bien documentado el uso de Ioduro de Propidio (IP) para evaluar la integridad de membrana celular. Sin embargo, estos trabajos se han enfocado en células vegetativas, por lo que resulta necesario el montaje de una técnica para esporas, las cuales se usan importantemente en la formulación de ACB. El objetivo de este trabajo fue establecer un método rápido y confiable para la determinación de la viabilidad de esporas de *T. harzianum*, así como para identificar el daño celular ocasionado a las mismas, después de ser sometidas a diferentes tipos de estrés.

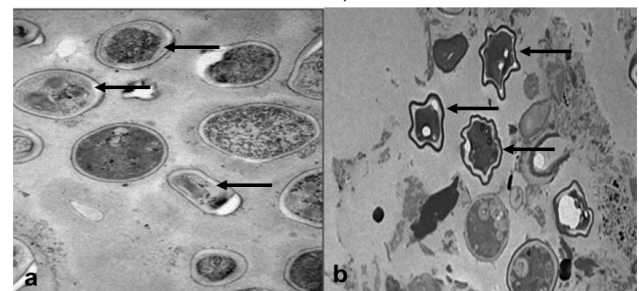
**Metodología.** Se prepararon diferentes muestras de esporas de *T. harzianum*: 1) frescas ( $\square$ ); 2) esterilizadas (+), 3) secadas por aspersión (x); 4) microencapsuladas mediante secado por aspersión ( $\Delta$ ) y 5) microencapsuladas-almacenadas por 3 meses a 29°C ( $\circ$ ). Suspensiones celulares de aproximadamente  $1 \times 10^6$  esporas/mL fueron teñidas por separado con FUN1, a una concentración final de 10  $\mu$ M por 30 min. Con IP, a una concentración final de 30  $\mu$ M por 10 min. Posteriormente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson).

**Resultados.** Con la tinción de IP se obtuvo una correlación lineal entre la viabilidad y el porcentaje de esporas teñidas (Fig.1a). Sin embargo, se observa que en las muestras con 0 % de viabilidad, solo se tiñe entre el 90 y 95 % de las esporas; lo que indica que a pesar de no sufrir daño en membrana, una pequeña porción de la población pierde la capacidad de germinar. Al teñir las esporas con FUN1, se obtuvo una correlación exponencial entre la viabilidad y la intensidad de la

fluorescencia en rojo (Fig 1b). Con esta tinción se confirmó que en las muestras con 0 % de viabilidad, las esporas pierden la actividad metabólica. La pérdida en la integridad de membrana se corroboró mediante microscopía electrónica de transmisión (Fig. 2).



**Fig. 1.** Correlación entre la viabilidad de esporas de *T. harzianum* y a) el porcentaje de células teñidas con IP; b) la intensidad de la fluorescencia roja del FUN1. Los diferentes símbolos corresponden a cada uno de los tipos de muestras utilizados (ver nomenclatura en el texto)



**Fig. 2.** Daño en membrana celular de esporas de *T. harzianum* (a) microencapsuladas mediante secado por aspersión y (b) secadas por aspersión.

**Conclusiones.** Mediante el uso de citometría de flujo y los compuestos fluorescentes FUN1 e IP, se estableció y validó una metodología rápida y precisa para evaluar la viabilidad de esporas de *T. harzianum* sometidas a diferentes tipos de estrés. Combinando estos dos compuestos es posible determinar que la pérdida en la integridad en membrana es el principal daño sufrido por las esporas; sin embargo, existe una porción de la población que conserva íntegra la membrana pero pierde la capacidad metabólica.

### Bibliografía.

- McHugh IOL, Tucker, AL. (2007). Flow cytometry for the rapid detection of bacteria in cell culture production medium. *Cytometry A.*; 71A(12):1019:1026.
- Marr KA, Koudadoust, M, Black M, Balajee SA. (2001). Early events in macrophage killing of *Aspergillus fumigatus* conidia: New flow cytometric viability assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(6):1240-1247.