

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD DE BIOMASA MICELIAL DE *Trichoderma harzianum*

Celia Flores¹, Mainul Hassan¹, Gabriel Corkidi², Enrique Galindo¹ y Leobardo Serrano-Carreón¹

¹Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología. ²Laboratorio de análisis de imágenes, Centro de Instrumentos, Universidad Nacional Autónoma de México

Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, 62250 Morelos, MEXICO

Fax: (52) 7-3 17 23 88, e-mail: celia@ibt.unam.mx

Palabras clave: *viabilidad*, *Trichoderma harzianum*, *FDA*

Introducción. *Trichoderma harzianum* es un hongo filamentoso de gran importancia por los diferentes metabolitos de interés industrial que produce. La viabilidad es un factor que determina importantemente la producción de metabolitos y es particularmente crítica cuando ésta biomasa se usa como agente de control biológico (1).

En este trabajo se reporta el desarrollo de una técnica para cuantificar la viabilidad del micelio de *T. harzianum*. La técnica hace uso de una tinción fluorescente, utilizando diacetato de fluoresceína (FDA) y usando análisis de imágenes.

Metodología. La selección y la concentración óptima de FDA se reportó previamente (2). Las muestras teñidas se analizaron por análisis de imágenes (sistema Image Pro Plus v1, Media Cybernetics, USA). Se adquirieron 50 imágenes por muestra. Por cada imagen se tomaron 2 fotografías: una en luz visible para cuantificar el área total del hongo, (Fig. 1a); otra con luz ultravioleta para cuantificar el área metabólicamente activa, área fluorescente (Fig. 1b). Así, la actividad esterasa (%), se definió como la relación porcentual entre el área fluorescente y el área total del hongo. La biomasa se cuantificó por peso seco.

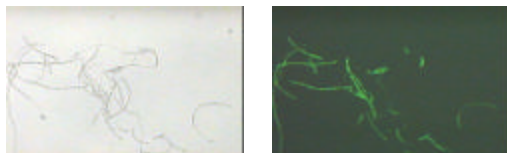


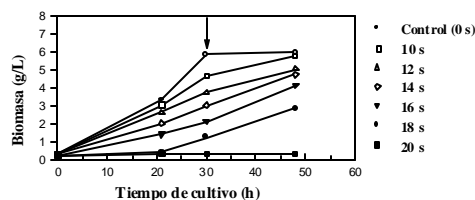
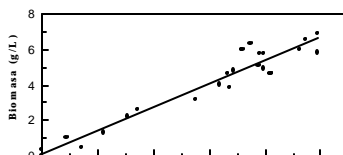
Figura.1.- Imagen del micelio de *Trichoderma harzianum*. **a)** área total. **b)** área fluorescente.

Resultados y Discusión. El FDA es una sustancia no polar que atraviesa la membrana celular y es hidrolizado por esterasas intracelulares en células viables, produciéndose la fluoresceína, que exhibe fluorescencia al excitarse a 490 nm. Es necesaria una integridad de membrana para la retención intracelular de la fluoresceína. Células no viables son incapaces de hidrolizar el FDA y/o de retener la fluoresceína. Experimentos preliminares indicaron que la actividad esterasa podría utilizarse como indicador indirecto de la viabilidad de las células (2). Sin embargo, resultaba importante demostrar que ésta actividad esterasa correlacionaba con una capacidad vital de las células (como crecer), y poder expresar ésta actividad como viabilidad (al menos funcional). Con éste objetivo, células cultivadas en medio líquido y cosechadas en fase exponencial, se sometieron a tratamientos para inducir diferentes grados de daño. Los tratamientos aplicados fueron: calentamiento en baño maría, aplicación de microondas y molido en ultraturrax. Las células dañadas se re-cultivaron en medio líquido y se evaluó su crecimiento. La figura 2 muestra que a 30 h de cultivo permite diferenciar claramente la capacidad de re-crecimiento de las células sometidas a diferentes tratamientos (en éste caso, aplicación de microondas).

Figura 2.- Evaluación de la capacidad de re-crecimiento de células dañadas.

En la figura 3 se integraron todos los tratamientos de daño aplicados a las células. Existe una clara relación lineal entre el porcentaje de actividad esterasa y el re-crecimiento de la biomasa, sin importar el tipo de tratamiento aplicado ($r^2 = 0.92$).

Figura 3.- Relación entre la actividad esterasa y el re-crecimiento de células dañadas con diferentes tratamientos.



Conclusiones. Existe una relación lineal entre la actividad esterasa y el crecimiento de las células. La relación entre la actividad esterasa y el crecimiento fue independiente del tipo de daño aplicado. La técnica desarrollada es simple, sensible, y rápida para la determinación de la viabilidad funcional del micelio de *T. harzianum*.

Agradecimientos. Apoyo financiero del CONACyT (proyecto Z-001) y de la IFS (proyecto E/2548-2).

Bibliografía

- Chet, I. (1987). *Trichoderma* -application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease Control* Chet I. Wiley, New York. pp. 137-160.
- Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E. and Serrano-Carreón L. (1999). Towards the determination of *Trichoderma harzianum* viability by digital image analysis. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Huatulco, pp. 37.