

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Ángel

División de Estudios
de Posgrado



Doctorado en Ecología Marina

Líneas de investigación:

- Ecología Marina
- Ecología de Peces y Biología pesquera
- Ecología de Tetrápodos Marinos
- Ecología y Taxonomía del Bentos
- Flujos de carbono en el Océano y Contaminación Marina
- Hidrodinámica de la Zona Costera
- Manejo de Recursos Marinos
- Taxonomía, Biogeografía y Ecología de Arrecifes Coralinos

Maestría en Ciencias: Ecología Marina

Doctorado en Ciencias Ambientales

Líneas de investigación:

- Análisis Químico de Contaminantes
- Biorremediación
- Diseño de Sistemas de Tratamiento
- Fenómenos de Transporte
- Gestión Ambiental
- Ingeniería Ambiental
- Química de Productos Naturales
- Simulación y Control de Procesos
- Técnicas Electroquímicas
- Toxicología Ambiental

Maestría en Ciencias Ambientales

Áreas de concentración:
Química Ambiental
Ingeniería Ambiental

Informes

Dr. Miguel Ángel Ahumada Sempoal
Jefe de la División de Estudios de Posgrado
Tel. (958) 584 3057 Ext. 111
Fax. (958) 584 3078
posgrado@hualulco.umar.mx

www.umar.mx

Determinación cualitativa de la actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. (Sordariomycetes: Hypocreales) crecido en medio con quitina de camarón

Juan Carlos Vásquez Martínez¹, Mario Antonio Alvarado Mota¹, Dioselina Díaz Sánchez¹ & Francisco Ruíz Ruíz^{2*}

Resumen

La actividad de las enzimas quitinolíticas de *Trichoderma* sp. ha sido utilizada con diferentes fines biotecnológicos. Considerando las grandes cantidades de desechos de camarón que se generan por la industria pesquera en la región, hemos visto la necesidad de utilizarlos como una fuente de quitina y probar si las enzimas de *Trichoderma* sp. son capaces de aprovecharla. Para determinar esta actividad, realizamos un ensayo cualitativo en medios mínimos suplementados con esta quitina como fuente de carbono para el hongo y verde de bromocresol como colorante indicador de pH. Los resultados obtenidos mostraron una actividad quitinolítica positiva y la proyección del aprovechamiento de quitina mediante la evaluación semicuantitativa del viraje de coloración y el crecimiento del hongo en los medios de cultivo.

Palabras clave: hidrólisis, hongo fitopatogénico, N-acetilglucosamina, quitinasas, verde de bromocresol.

Abstract

The activity of the chitinolytic enzymes of *Trichoderma* sp. has been used for different biotechnological purposes. Considering the large amounts of shrimp waste that are generated by the fishing industry in the region, we have seen the need to use them as a source of chitin and to test if the enzymes of *Trichoderma* sp. are able to make use of mediums it. To determine this activity, we performed a qualitative test in minimal media supplemented with the chitin as a carbon source for the fungus and bromocresol green as a pH indicator dye. The results obtained showed positive chitinolytic activity, as well as projection of the chitin use through semiquantitative evaluation of the color change and the growth of the fungus in the culture medium.

Key words: hydrolysis, phytopathogenic fungus, N-acetylglucosamine, chitinases, bromocresol green.

Recibido: 08 de febrero de 2019

Aceptado: 15 de marzo de 2019

¹ Licenciatura en Biología, Universidad del Mar campus Puerto Escondido. Km 1.5 carretera Puerto Escondido - Sola de Vega Puerto, Puerto Escondido, 71980, Oaxaca, México.

² Instituto de Genética, Universidad del Mar campus Puerto Escondido. Km 1.5 carretera Puerto Escondido - Sola de Vega Puerto, Puerto Escondido, 71980, Oaxaca, México.

* Autor de correspondencia: ruiz_ruiz_francisco@hotmail.com (FGRR)

Introducción

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa (Tolaimate *et al.* 2003). De manera natural, se encuentra en forma de microfibrillas cristalinas y constituye estructuralmente a los exosqueletos de artrópodos y a las paredes celulares de los hongos verdaderos (Younes & Rinaudo 2005). Se han desarrollado diferentes métodos para su extracción (Percot *et al.* 2003, Chaussard & Domard 2004, Qin *et al.* 2010) teniendo en cuenta el potencial biotecnológico de este compuesto y sus derivados (Hirano 1996). El proceso industrial más utilizado, consiste en la obtención de quitina a partir de exoesqueletos de cangrejo y camarón, a través métodos químicos con tratamientos de desmineralización y desproteínización con ácidos y bases, respectivamente (Younes & Rinaudo 2005).

Los hongos del género *Trichoderma* son cosmopolitas del suelo, algunas de sus especies son utilizadas con fines de control biológico de hongos fitopatógenos, porque compiten por los nutrientes y espacio en la planta (Rollano-Peñaloza *et al.* 2018), o por su hábito micoparásito. Se ha demostrado que las especies como *T. harzianum* y *T. inhamatum* son capaces de liberar enzimas hidrolíticas, como las quitinasas (Lorito *et al.* 1993; García-Espejo *et al.* 2016), lo que les confiere una ventaja adicional para penetrar la pared celular de otros hongos (De la Cruz *et al.* 1992; Harman 2006; Seidl *et al.* 2006) o exoesqueletos de insectos (Vallejos *et al.* 2014). La actividad quitinolítica ha sido evaluada mediante el uso de colorantes indicadores de cambios de pH, uno de los más comunes es el púrpura de bromocresol (Agrawal & Kotasthane 2012; García-Espejo *et al.* 2016; Khatri *et al.* 2017).

Las enzimas con actividad quitinolítica presentes en *Trichoderma* spp. han despertado el interés de muchos investigadores (Ulhoa & Peberdy 1991, De la Cruz *et al.* 1992, Lorito *et al.* 1993, Seidl *et al.* 2006, Vallejos *et al.* 2014, García-Espejo 2016), principalmente por su importancia biotecnológica. Se utilizan en la fabricación de biopesticidas, en preparaciones oftálmicas, como aditivos en cremas

y lociones antifúngicas, y para el control de algunos insectos que atentan contra la salud humana (Dahiya *et al.* 2006).

El objetivo de este trabajo es determinar cualitativamente la actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. mediante el indicador de pH verde de bromocresol en medios suplementados con quitina de camarón extraída a través de métodos químicos.

Material y métodos

En este estudio se trabajó con la cepa R1, identificada a nivel de género como *Trichoderma*. La cepa *Trichoderma* sp. fue proporcionada por el Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. La cepa estaba preservada en discos de agar suspendidos en agua destilada estéril dentro de crioviales de 1.5 ml a temperatura ambiente.

Se preparó un volumen de 200 ml de medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), el cual se esterilizó a 121 ° C durante 15 min. Una vez terminada la esterilización, se realizó el vaciado del medio de cultivo en 10 cajas Petri estériles. Se dejó solidificar por media hora y después se sellaron las cajas para evitar la contaminación.

- Aislamiento de *Trichoderma* sp.

Se inoculó la cepa R1 de *Trichoderma* sp., colocando los discos de agar en cajas de Petri individuales con medio PDA y se incubaron a temperatura ambiente durante siete días.

Transcurrido el tiempo de crecimiento del hongo sobre el medio sólido PDA, se procedió a recuperar la cepa. Para ello se tomaron con navajas de bisturí estériles, pequeños fragmentos de agar con micelio de la región periférica de crecimiento. Posteriormente, estos fragmentos fueron inoculados en nuevas cajas Petri con PDA, mismas que se sellaron e incubaron en las condiciones anteriormente descritas.

- Obtención de cultivos monospóricos

Con la finalidad de obtener cultivos axénicos (Castellanos & Mosquera 2013) los cuales son cultivos puros, que solo contienen un solo tipo

de microorganismo y que permiten que solo esté presente el organismo de interés (Rojas-Treviño 2011), se eligieron los cultivos que presentaron mayor crecimiento y una coloración más verde, para realizar la extracción de esporas. Para ello, se utilizó un mililitro de agua destilada estéril desionizada, y se vació con una micropipeta de 1000 µl, desde uno de los bordes de la caja Petri, inclinándola ligeramente para que el agua llegara al otro borde, con otra micropipeta se recuperó la solución acuosa de esporas y se resguardó en crioviales estériles de 1.5 ml a temperatura ambiente.

- Cuantificación de esporas

Las esporas obtenidas fueron cuantificadas utilizando cámaras Neubauer, se extrajo con micropipetas 20 µl de la solución acuosa de esporas, las cuales fueron observadas en un microscopio óptico (Carl Zeiss Serie-Nr). Estas se cuantificaron mediante la fórmula:

$$\text{Concentración (células/ml)} = \frac{\text{número de células observadas en los cuadros} \times 10000}{\text{volumen}} \times 10^6$$

Se realizaron disoluciones hasta llevarlas a una concentración de 1×10^6 esporas/ 100 ml, una vez obtenidas se guardaron en matraces sellados de 100 ml y se dejaron en reposo a temperatura ambiente.

- Extracción de quitina

La quitina se obtuvo de exoesqueletos de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) que fueron proporcionados por algunos restaurantes de la localidad de Puerto Escondido, Oaxaca.

Los exoesqueletos se colocaron en una charola de metal y fueron puestos a secar al sol durante cuatro días con el fin de deshidratarlos. Posteriormente, se pesaron en una balanza analítica y se obtuvieron 15.24 gramos.

Para obtener la quitina se siguió la metodología de extracción química planteada por Percot *et al.* (2003), con algunas modificaciones. Para ello primero se trituró el exoesqueleto seco de camarón en un mortero de porcelana, hasta obtener trozos pequeños. Con

el propósito de eliminar impurezas inorgánicas (desmineralización) en los exoesqueletos, éstos se agregaron en una disolución de HCl 1 M, en proporción: 40 ml por gramo pesado. Posteriormente, se realizaron lavados para retirar el exceso de ácido e inmediatamente se sometió la muestra a una hidrólisis alcalina; la cual se llevó a cabo empleando una disolución NaOH 1M, en proporción 20 ml por cada gramo de exoesqueleto, durante un período de 16 horas, esto con el propósito de eliminar las proteínas contenidas en la muestra. La disolución estuvo contenida en un desecador el cual estuvo sumergido en un baño maría a 70 °C. Una vez que se evaporó la mayor cantidad de NaOH, se agregaron disoluciones HCl 1 M hasta obtener un pH neutro. Seguido a esto se realizaron tres lavados de agua destilada a la quitina obtenida. Para separar el exceso de agua de la quitina se centrifugó a 8000 rpm durante cinco minutos a una temperatura de 5 °C. La pasta obtenida se separó del sobrenadante y empleando nitrógeno líquido se finalizó la molienda, la cual se pasó por un tamiz de malla número 60.

Se obtuvieron 1.97 gramos de quitina, que en términos de rendimiento equivale al 12.93% del exoesqueleto seco pesado inicialmente, la quitina se resguardó en un ultracongelador a una temperatura de -80 °C.

Determinación cualitativa de actividad quitinasa

Para la determinación cualitativa de la actividad quitinasa-positivo se siguió la metodología de García-Espejo *et al.* (2016), con una pequeña modificación. Se prepararon 175 ml medio mínimo con quitina y bromocresol (MQBC en adelante), lo equivalente a ocho cajas Petri, con 0.0525 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.525 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.35 g de KH_2PO_4 , 0.175 g de ácido cítrico monohidratado, 2.625 g de agar, 35 µL de Tween 80, 0.79 g de quitina y 0.0262 g de verde de bromocresol (VBC en adelante). Estas proporciones fueron calculadas respecto al rendimiento final de quitina obtenido mediante el método de Percot *et al.* (2003).

Una vez preparado el medio de cultivo, utilizando un potenciómetro se ajustó el pH a 4.7 y se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Estos

fueron plaqueados e inoculados por quintuplicado con 10 µl de esporas (100 esporas) de la cepa R1 de *Trichoderma* sp. en la región central de las cajas Petri, con la finalidad de hacer más evidente el crecimiento radial; es importante mencionar que no se inocularon tres cajas Petri ya que estas funcionaron como control. Las cajas Petri se incubaron a 30 °C hasta observar la formación de zona de color, que debe cambiar de verde fuerte a azul, producto del incremento de la alcalinidad en el pH.

Resultados

Cinética de crecimiento

La cepa R1 de *Trichoderma* sp. fue inoculada en el medio MQBC en el día 0. Durante los días 0-3 no mostró señales de crecimiento, para el día 4 cubría un área de 30 cm² de diámetro y en el día 6, el micelio ocupaba toda el área de la caja de Petri. Se obtuvo una línea de regresión lineal para ver el comportamiento del crecimiento respecto al tiempo y área aprovechada por *Trichoderma* sp. (Fig. 1).

Para determinar visualmente la actividad quitinolítica positiva, se consideró el cambio de color de verde a azul (+) en los medios. Esta actividad se determinó como positiva hasta el día 4 (Fig. 2). La superficie ocupada por el halo azul sirvió para determinar semicuantitativamente la utilización de la quitina en los medios por *Trichoderma* sp. considerando aprovechamiento: bajo, medio y elevado (+), (++) , (+++), respectivamente (Fig. 2).

Discusión

Agrawal & Kotasthane (2012), describen que la actividad hidrolítica de las quitinasas resulta en la escisión de la quitina en monosacáridos N-acetilglucosamina (en lo sucesivo GlcNAc), unidos mediante enlaces β-(1,4), lo que deriva en un cambio de pH ácidos a alcalinos. Por su parte, Khatri *et al.* (2017) mencionan que estos residuos presentan en su estructura grupos funcionales hidroxilo, carbonilo e imina, los cuales se pueden unir algún indicador aniónico. Entre estos se encuentra

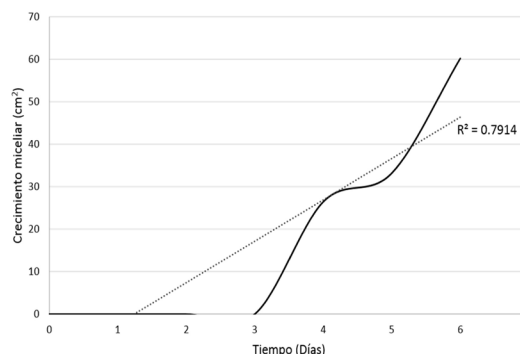


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Trichoderma* sp. en MQBC. El valor de R² muestra que la tasa de crecimiento lineal no fue estrictamente uniforme. El micelio se hizo evidente hasta el día 4 y para el día 6 el micelio se había expandido en los 63 cm² de la caja de Petri.

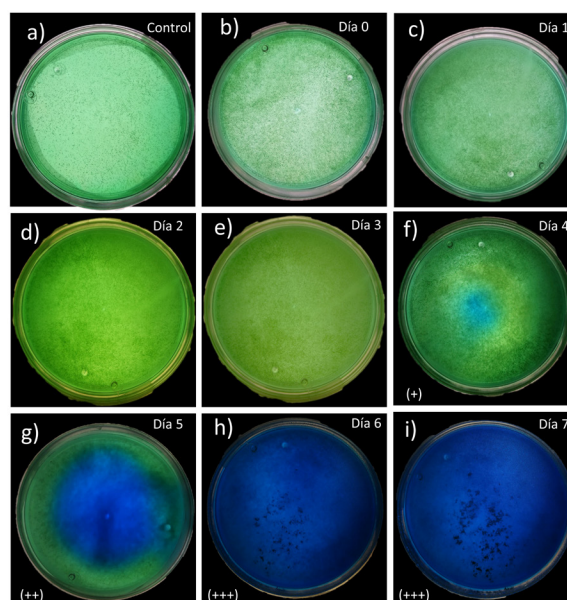


Figura 2. Proyección del viraje para la determinación de la actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. a) Medio mínimo control. b-e) Del día 0 al día 3 de inoculación, no se observó aprovechamiento de quitina por parte del hongo. f) Indicios de aprovechamiento. g) Incremento de la actividad quitinolítica. h-i) Aprovechamiento total de quitina en el medio.

el púrpura de bromocresol y el verde de bromocresol (Cullum 1993). En nuestro estudio utilizamos el VBC considerando que al ser un compuesto aniónico en soluciones ácidas (el estado inicial de nuestro medio MQBC y el control fue a pH 4.7) puede ser un indicador semicuantitativo del aprovechamiento de la

quitina de camarón por parte de hongos quitinolíticos como *Trichoderma* sp. teniendo en cuenta que conjuga iones hidronio (H_3O^+) o iones hidrógeno (H^+) de los grupos funcionales de N-acetilglucosamina a medida que son liberados por la hidrólisis mediada por las quitinasas. Por su parte Jiang *et al.* (2017), indican que el VBC posee un pKa de 4.9 que bajo condiciones ácidas y básicas, muestran una proyección de tonos amarillos a turquesas, respectivamente. De manera que si el pH está por arriba del pKa, la concentración de la base conjugada es más elevada que la concentración del ácido, el color asociado con la base termina siendo más evidente. Basándonos en esta propiedad de inflexión fisicoquímica del VBC y observando una evidente coloración dominante de la conjugación básica en el medio, podemos decir que los resultados que reportamos comprueban exitosamente la actividad positiva de quitinasas en los medios MQBC.

Por otro lado, el GlcNAc al ser un constituyente del ácido hialurónico el cual está involucrado en señalización celular en el sistema inmune y forma parte de diferentes tejidos como el conectivo, el epitelial y neural en humanos, recientemente el GlcNAc se ha utilizado como suplemento alimenticio y en otras terapias farmacológicas en desarrollo (Chen *et al.* 2010). La quitina al ser uno de los recursos de biomasa más abundantes en la naturaleza, hemos visto el potencial para procesarse biotecnológicamente mediante métodos enzimáticos a partir de los desperdicios de exoesqueletos de crustáceos y de esta manera servir como otra fuente para la obtención enzimática de GlcNAc.

Conclusión

El método Percot *et al.* (2003) utilizado para la extracción de quitina de camarón, así como el uso de un colorante indicador de pH adicionado a medios mínimos, permitió obtener un ensayo base para la determinación cualitativa de la acción quitinolítica de la cepa R1 del hongo *Trichoderma* sp.

Agradecimientos

Agradecemos al Instituto de Genética y al Laboratorio de Química de la Universidad del Mar campus Puerto Escondido, por facilitarnos el equipo y reactivos necesarios para llevar a cabo esta investigación, así como a María J. Santos Reyes por brindarnos la cepa R1 de *Trichoderma* sp. A dos revisores anónimos que realizaron comentarios para mejorar el presente trabajo.

Referencias

- Agrawal, T. & A. S. Kotasthane. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. SpringerPlus. 76 (1): 1-10
- Castellanos, J. C. & G. Mosquera. 2013. Guía Práctica 6: Manejo del Hongo en el Laboratorio. Centro Internacional de la Agricultura Tropical (CIAT), p. 16.
- Chaussard, G., & A. Domard. 2004. New Aspects of the Extraction of Chitin from Squid Pens. Biomacromolecules. 5(2): 559-564.,
- Chen, J., C. Shen & L. Chao-Lin. 2010. N-acetylglucosamine: Production and Applications. Marine Drugs. 8: 2493-2516
- Cullum, D. 1993. Introduction to Surfactant Analysis. First ed., Springer Science & Business Media, England
- Dahiya, N., R. Tewari, G. Hoondal. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied Microbiology and Biotechnology. 71(6): 773-782
- De la Cruz, J., A. Hidalgo-Gallego, J. M. Lora, T. Benítez, J. Pintor-Toro & A. Llobell. 1992. Isolation and Characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal of Biochemistry. 206(3): 859-867
- García-Espejo, C., M. Mamani-Mamani, G. Chávez-Lizárraga & M. Álvarez-Aliaga. 2016. Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. Journal of the Selva Andina Research Society. 7(1):20-32
- Harman, G., 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* sp. Phytopathology. 96(2): 190-194
- Hirano, S. 1996. Chitin Biotechnology Applications. Biotechnology Annual Review. 2: 237-258.
- Jiang, Y., C. Fu, S. Wu, G. Liu, J. Guo & S. Zhengquan. 2017. Determination of the Deacetylation Degree of Chitooligosaccharides. Marine drugs, 15(332):1-14.

- Khatri, D., D. N. Tiwari & H. Bariya. 2017. Chitinolytic efficacy and secretion of cell wall-degrading enzymes from *Trichoderma* sp. in response to phytopathological fungi, *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5(6), pp. 1-8,
- Lorito M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R. M. Broadway, A. Tronsmo, S. L. Woo & A. Di Pietro. 1993. Chitinolytic Enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. *Molecular Plant Pathology*. 83: 302-307
- Percot, A., C. Viton, & A. Domard. 2003. Optimization of Chitin Extraction from Shrimp Shells. *Biomacromolecules*. 4(1): 12-18.
- Rojas-Treviño, A., 2011. Conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Palmira, Colombia, pp. 49-53. Consultado el 7 de febrero de 2018: <http://bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertoro-jastrivino.2011.pdf>
- Rollano-Peñaloza, O., S. Widell, P. Mollinedo & A. Rasmusson. 2018. *Trichoderma harzianum* T-22 and BOL-12QD inhibit lateral root development of *Chenopodium quinoa* in axenic co-culture. *Cogent biology* 4(1): 1-12
- Seidl, V., B. Huemer, B. Seiboth & C. P. Kubicek. 2006. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *The FEBS Journal*. 272(22): 5923-5939
- Qin, Y., X. Lu, N. Sun & R. Rogers. (2010). Dissolution or extraction of crustacean shells using ionic liquids to obtain high molecular weight purified chitin and direct production of chitin films and fibers. *Green Chemistry*. 12(6): 968-971
- Tolaimate, A., J. Desbrieres, M. Rhazi & A. Alagui. 2003. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*. 44(26): 7939-7952
- Ulhoa, C. & J. Peberdy. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Thicoderma harzianum*. *Journal of General Microbiology*. 137: 2163-2169
- Vallejos, J., C. Espinal, P. Mollindo, E. Terrazas. 2014. Evaluación de actividad insecticida y quitinolítica de *Trichoderma inhamatum* y *Beauveria bassiana* en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. *Revista Boliviana de Química*. 31(1): 5-9
- Younes, I., & M. Rinaudo. 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*. 3(3): 1133-1174.