

Ciencias Biológicas y de la Salud

Proceedings III

Trejo Macotela, Francisco Rafael *Coordinador*

ECORFAN®

ECORFAN®

Editora en Jefe

RAMOS-ESCAMILLA, María. PhD

Coordinador

TREJO-MACOTELA, Francisco Rafael. PhD

Redactor Principal

SERRUDO-GONZALES, Javier. BsC

Asistente Editorial

SORIANO-VELASCO, Jesús. BsC

ROSALES-BORBOR, Eleana. BsC

Director Editorial

PERALTA-CASTRO, Enrique. MsC

Editor Ejecutivo

VARGAS-DELGADO, Oscar. PhD

Editores de Producción

ESCAMILLA-BOUCHAN, Imelda. PhD

LUNA-SOTO, Vladimir. PhD

Administración Empresarial

REYES-VILLAO, Angélica. BsC

Control de Producción

RAMOS-ARANCIBIA Alejandra. BsC

DÍAZ-OCAMPO Javier. BsC

ISBN: 978-607-8534-78-4

Sello Editorial ECORFAN: 607-8534

Número de Control PCBS: 2018-04

Clasificación PCBS (2018): 071218-104

©ECORFAN-México, S.C.

Ninguna parte de este escrito amparado por la Ley Federal de Derechos de Autor, podrá ser reproducida, transmitida o utilizada en cualquier forma o medio, ya sea gráfico, electrónico o mecánico, incluyendo, pero sin limitarse a lo siguiente: Citas en artículos y comentarios bibliográficos, de compilación de datos periodísticos radiofónicos o electrónicos. Para los efectos de los artículos 13, 162,163 fracción I, 164 fracción I, 168, 169,209 fracción III y demás relativos de la Ley Federal de Derechos de Autor. Violaciones: Ser obligado al procesamiento bajo ley de copyright mexicana. El uso de nombres descriptivos generales, de nombres registrados, de marcas registradas, en esta publicación no implican, uniformemente en ausencia de una declaración específica, que tales nombres son exentos del protector relevante en leyes y regulaciones de México y por lo tanto libre para el uso general de la comunidad científica internacional. PCBS es parte de los medios de ECORFAN-México, S.C, E: 94-443.F:008-(www.ecorfan.org)

Proceedings

Definición de Proceedings

Objetivos Científicos

Apoyar a la Comunidad Científica Internacional en su producción escrita de Ciencia, Tecnología en Innovación en las Áreas de investigación CONACYT y PRODEP.

ECORFAN-Mexico S.C es una Empresa Científica y Tecnológica en aporte a la formación del Recurso Humano enfocado a la continuidad en el análisis crítico de Investigación Internacional y está adscrita al RENIECYT de CONACYT con número 1702902, su compromiso es difundir las investigaciones y aportaciones de la Comunidad Científica Internacional, de instituciones académicas, organismos y entidades de los sectores público y privado y contribuir a la vinculación de los investigadores que realizan actividades científicas, desarrollos tecnológicos y de formación de recursos humanos especializados con los gobiernos, empresas y organizaciones sociales.

Alentar la interlocución de la Comunidad Científica Internacional con otros centros de estudio de México y del exterior y promover una amplia incorporación de académicos, especialistas e investigadores a la publicación Seriada en Nichos de Ciencia de Universidades Autónomas - Universidades Públicas Estatales - IES Federales - Universidades Politécnicas - Universidades Tecnológicas - Institutos Tecnológicos Federales - Escuelas Normales - Institutos Tecnológicos Descentralizados - Universidades Interculturales - Consejos de CyT - Centros de Investigación CONACYT.

Alcances, Cobertura y Audiencia

Proceedings es un Producto editado por ECORFAN-Mexico S.C en su Holding con repositorio en México, es una publicación científica arbitrada e indizada. Admite una amplia gama de contenidos que son evaluados por pares académicos por el método de Doble-Ciego, en torno a temas relacionados con la teoría y práctica de las Área de investigación CONACYT y PRODEP respectivamente con enfoques y perspectivas diversos, que contribuyan a la difusión del desarrollo de la Ciencia la Tecnología e Innovación que permitan las argumentaciones relacionadas con la toma de decisiones e incidir en la formulación de las políticas internacionales en el Campo de las Ciencias. El horizonte editorial de ECORFAN-Mexico® se extiende más allá de la academia e integra otros segmentos de investigación y análisis ajenos a ese ámbito, siempre y cuando cumplan con los requisitos de rigor argumentativo y científico, además de abordar temas de interés general y actual de la Sociedad Científica Internacional.

Consejo Editorial

NUÑEZ - SELLES, Alberto Julio. PhD
Instituto Central de Análisis de Alimentos Utrecht

ESCAMILLA - GARCÍA, Erandi. PhD
Université de Bourgogne

NAVARRO - FRÓMETA, Amado Enrique. PhD
Instituto de Petróleo y Química Azerbaiján

ARMADO - MATUTE, Arnaldo José. PhD
Universidad de los Andes

RIVERA - BECERRIL, Facundo. PhD
Institut National de la Recherche Agronomique

CHEW - HERNÁNDEZ, Mario Luis. PhD
University of Nottingham

SOTERO - SOLIS, Victor Erasmo. PhD
Universidade de São Paulo

CORNEJO - BRAVO, José Manuel. PhD
University of California

OROPEZA - GUZMÁN, Mercedes Teresita. PhD
National Polytechnique de Toulouse

PINA - LUIS, Georgina Esther. PhD
Universidad de la Habana

CARVAJAL - MILLAN, Elizabeth. PhD
École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier

CRUZ - REYES, Juan. PhD
Instituto de Catálisis y Petroleoquímica

STILIANOVA - STOYTCHEVA, Margarita. PhD
Universidad de Tecnología Química y Metalurgia de Sofía

CASTRO - CECEÑA, Ana Bertha. PhD
University of California

CÓRDOVA - GUERRERO, Iván. PhD
Universidad de la Laguna

MELÉNDEZ - LÓPEZ, Samuel Guillermo. PhD
University of California

FRÍAS - DE LEÓN, María Guadalupe. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

RAMÍREZ - LEAL, Roberto. PhD
Centro de Investigación en Materiales Avanzados

GAMBOA - HERNÁNDEZ, Adriana. PhD
Instituto Tecnológico de Saltillo

HERNANDEZ - HERNANDEZ, Francisca. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

CASTAÑÓN - OLIVARES, Laura Rosio. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

OCHOA - TERÁN, Adrián. PhD
Tecnológico Nacional de México

SANTACRUZ - ORTEGA, Hisila del Carmen. PhD
Instituto Tecnológico de Tijuana

VALDEZ - SALAS, Benjamín. PhD
Universidad Autónoma de Guadalajara

FRONTANA - VAZQUEZ, Carlos Eduardo. PhD
Universidad Autónoma Metropolitana

Comité Arbitral

PALOS - PIZARRO, Isidro. PhD
Centro de Investigación en Química Aplicada

VALDÉS - ORDOÑEZ, Alejandro. PhD
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

HERRERA - PÉREZ, Gabriel. PhD
Universidad Autónoma del Estado de Morelos

RIOS - DONATO, Nely. PhD
Universidad de Guanajuato

ALVARADO - FLORES, Jesús. PhD
Universidad Autónoma de Aguascalientes

DE LEON - FLORES, Aned. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

MARTÍNEZ - HERRERA, Erick Obed. PhD
Universidad Autónoma Metropolitana

DUARTE - ESCALANTE, Esperanza. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

SALAZAR - HERNÁNDEZ, Ma. Mercedes. PhD
Universidad de Guanajuato

GARCÍA - ORTEGA, Héctor. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

RANGEL - VILLALOBOS, Héctor. PhD
Universidad de Guadalajara

QUIROZ - CASTILLO, Jesús Manuel. PhD
Universidad de Sonora

CERTUCHA - BARRAGÁN, María Teresa. PhD
Universidad Autónoma de Baja California

SUÁREZ - ALVAREZ, Roberto Osvaldo. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

CALVA - BENÍTEZ, Laura Georgina. PhD
Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca

LÓPEZ - MALDONADO, Eduardo Alberto. PhD
Tecnológico Nacional de México

MAGANA - BADILLA, Héctor Alfonso. PhD
Universidad Autónoma de Baja California

MARTÍNEZ - QUIROZ, Marisela. PhD
Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

LÓPEZ - URETA, Luz Cecilia. PhD
Universidad de Guadalajara

DEL VALLE - GRANADOS, José Mario. PhD
Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada

HURTADO - AYALA, Lilia Angélica. PhD
Universidad Autónoma de Baja California

RIVERA - ITURBE, Fernando Felipe. PhD
Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica

VALDEZ - CASTRO, Ricardo. PhD
Universidad Nacional Autónoma de México

VILLARREAL - GÓMEZ, Luis Jesús. PhD
Universidad Autónoma de Baja California

COTA - ARRIOLA, Octavio. PhD
Universidad de Sonora

Cesión de Derechos

El envío de una Obra Científica a ECORFAN Proceedings emana el compromiso del autor de no someterlo de manera simultánea a la consideración de otras publicaciones científicas para ello deberá complementar el Formato de Originalidad para su Obra Científica.

Los autores firman el Formato de Autorización para que su Obra Científica se difunda por los medios que ECORFAN-México, S.C. en su Holding México considere pertinentes para divulgación y difusión de su Obra Científica cediendo sus Derechos de Obra Científica.

Declaración de Autoría

Indicar el Nombre de 1 Autor y 3 Coautores como máximo en la participación de la Obra Científica y señalar en extenso la Afiliación Institucional indicando la Dependencia.

Identificar el Nombre de 1 Autor y 3 Coautores como máximo con el Número de CVU Becario-PNPC o SNI-CONACYT- Indicando el Nivel de Investigador y su Perfil de Google Scholar para verificar su nivel de Citación e índice H.

Identificar el Nombre de 1 Autor y 3 Coautores como máximo en los Perfiles de Ciencia y Tecnología ampliamente aceptados por la Comunidad Científica Internacional ORCID - Researcher ID Thomson - arXiv Author ID - PubMed Author ID - Open ID respectivamente

Indicar el contacto para correspondencia al Autor (Correo y Teléfono) e indicar al Investigador que contribuye como primer Autor de la Obra Científica.

Detección de Plagio

Todas las Obras Científicas serán testeadas por el software de plagio PLAGSCAN si se detecta un nivel de plagio Positivo no se mandara a arbitraje y se rescindirá de la recepción de la Obra Científica notificando a los Autores responsables, reivindicando que el plagio académico está tipificado como delito en el Código Penal.

Proceso de Arbitraje

Todas las Obras Científicas se evaluarán por pares académicos por el método de Doble Ciego, el arbitraje Aprobatorio es un requisito para que el Consejo Editorial tome una decisión final que será inapelable en todos los casos. MARVID® es una Marca de derivada de ECORFAN® especializada en proveer a los expertos evaluadores todos ellos con grado de Doctorado y distinción de Investigadores Internacionales en los respectivos Consejos de Ciencia y Tecnología el homólogo de CONACYT para los capítulos de America-Europa-Asia-Africa y Oceanía. La identificación de la autoría deberá aparecer únicamente en una primera página eliminable, con el objeto de asegurar que el proceso de Arbitraje sea anónimo y cubra las siguientes etapas: Identificación del ECORFAN Proceedings con su tasa de ocupamiento autoral - Identificación del Autores y Coautores- Detección de Plagio PLAGSCAN - Revisión de Formatos de Autorización y Originalidad-Asignación al Consejo Editorial- Asignación del par de Árbitros Expertos- Notificación de Dictamen-Declaratoria de Observaciones al Autor-Cotejo de la Obra Científica Modificado para Edición-Publicación.

ECORFAN Ciencias Biológicas y de la Salud

Volumen II

El Proceedings ofrecerá los volúmenes de contribuciones seleccionadas de investigadores que contribuyan a la actividad de difusión científica de la Universidad Politécnica de Pachuca para su área de investigación en la función de la Universidad ante los retos de la Sociedad del Conocimiento. Además de tener una evaluación total, en las manos de los directores de la Universidad Politécnica de Pachuca de México se colabora con calidad y puntualidad en sus capítulos, cada contribución individual fue arbitrada a estándares internacionales (RESEARCH GATE, MENDELEY, GOOGLE SCHOLAR y REDIB), el Proceedings propone así a la comunidad académica, los informes recientes sobre los nuevos progresos en las áreas más interesantes y prometedoras de investigación en la función de la Universidad ante los retos de la Sociedad del Conocimiento.

Trejo-Macotela, Francisco Rafael

Coordinador

*Ciencias Biológicas y de la Salud
Proceedings T-II*

Universidad Politécnica de Pachuca - México. Diciembre, 2018

Introducción

La Universidad Politécnica de Pachuca como Institución de Educación Superior de tipo pública, se encuentra obligada a generar procesos de conservación, transferencia y divulgación del conocimiento, esto como parte de las actividades sustantivas de las y los académicos universitarios. El SIMCI, en su emisión 2018, tiene como objetivo difundir nuevas ideas y visiones en materia de Ciencia, Tecnología e Innovación provenientes de trabajos teóricos y experimentales, así como de prototipos, diseños y herramientas, con la finalidad de contribuir al progreso de la región, estado y país. Las obras reúnen un conjunto de trabajos de análisis, ensayos, resultados de investigación en torno a la función de la docencia en la Universidad y los retos que ésta enfrenta ante la Sociedad del Conocimiento, se agradece la participación de todas y todos en la construcción de esta segunda edición, por lo que cada colaborador se hace responsable de su obra independiente. Trejo-Macotela, Francisco Rafael Coordinador

*Trejo-Macotela, Francisco Rafael
Coordinador*

Este volumen contiene 6 capítulos arbitrados que se ocupan de estos asuntos en Ciencias Biológicas y de la Salud.

Calva, Villa, Quezada, Mendoza y Anducho, presentan El género *Trichoderma* una herramienta agrobiotecnológica, como segundo capítulo, *Pérez, Viguera, Ibarra, Álvarez y Mercado*, presentan Expresión heteróloga de *xilanasas* y *aspartil* proteasas de hongo, como tercer capítulo, *Castillo, Molina, Olivares, Segovia y Aguirre*, presentan La metagenómica y bioinformática; Descubriendo los secretos de la ecología microbiana, como cuarto capítulo, *Yañez, Villanueva, Álvarez, Flores y Tovar*, presentan, Efecto de nanopartículas biosintetizadas mediante extractos vegetales en el crecimiento y desarrollo de plantas de interés agrícola: adición de $AgCl/Ag$ a *Latuca sativa*, como quinto capítulo, *Lugo, Moreno, Cuatpotzo, Simancas y Robles*, presentan Proceso de identificación automática de la región de interés en imágenes de larvas de mosquito de cuarto estadio, con fines de clasificación e identificación entre especies de vectores entomológicos, como sexto artículo, *De la Fuente, Cotzomi, Pérez, Ambrocio y García*, presentan Detección de Radiación Gamma y Rayos Cósmicos de muy alta energía (>100 GeV).

Contenido	Pág.
<p>El género <i>Trichoderma</i> una herramienta agrobiotecnológica LÓPEZ-CALVA, Verónica Lizbeth, VILLA-GARCIA, Matilde, QUEZADA-SALINAS, Andrés, MENDOZA-MENDOZA, Artemio³ y ANDUCHO-REYES, Miguel Ángel</p>	1-11
<p>Expresión heteróloga de <i>xilanasas</i> y <i>aspartil</i> proteasas de hongo PÉREZ-RODRÍGUEZ, Joany, VIGUERAS-MORALES, Yajaira, IBARRA-GARCIA, José Antonio, ÁLVAREZ-CERVANTES, Jorge, y MERCADO-FLORES, Yuridia</p>	12-24
<p>La metagenómica y bioinformática; Descubriendo los secretos de la ecología microbiana CASTILLO-ORTEGA, Laura Sofía, MOLINA-VEGA, Aracely, OLIVARES-GARCÍA Erika Dulce, SEGOVIA-CRUZ, Jesús Alberto y AGUIRRE-VAN-WOBESER, Eneas</p>	25-41
<p>Efecto de nanopartículas biosintetizadas mediante extractos vegetales en el crecimiento y desarrollo de plantas de interés agrícola: adición de de AgCl/Ag a <i>Latuca sativa</i> YAÑEZ-CRUZ, María Guadalupe VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela, ÁLVAREZ-GARCÍA, Rocío, FLORES-GONZÁLEZ, Marco Antonio y TOVAR-JIMENEZ, Xochitl</p>	42-58
<p>Proceso de identificación automática de la región de interés en imágenes de larvas de mosquito de cuarto estadio, con fines de clasificación e identificación entre especies de vectores entomológicos LUGO-RODRÍGUEZ, Pamela, MORENO-ALVARADO, Rodolfo, CUATEPOTZO-JIMENEZ, Vanessa, SIMANCAS-ACEVEDO, Eric y ROBLES-CAMARILLO Daniel</p>	59-77
<p>Detección de Radiación Gamma y Rayos Cósmicos de muy alta energía (>100 GeV) DE LA FUENTE, Eduardo, COTZOMI, Jorge, PÉREZ-PÉREZ, Eucario G., AMBROCIO-CRUZ, Silvia Patricia, GARCÍA-LUNA, José L.</p>	78-92

El género *Trichoderma* una herramienta agrobiotecnológica

The *Trichoderma* genus an agrobiotechnological tool

LÓPEZ-CALVA, Verónica Lizbeth¹, VILLA-GARCIA, Matilde¹, QUEZADA-SALINAS, Andrés², MENDOZA-MENDOZA, Artemio³ y ANDUCHO-REYES, Miguel Ángel¹

¹Universidad Politécnica de Pachuca, México

²Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México.

³ University.Nueva Zelanda, Bio-Protection Research Centre. Lincoln

ID 1^{er} Autor: *Verónica Lizbeth, López-Calva* / **ORC ID:** 0000-0002-8196-0016, **CVU CONACYT ID:** 858292

ID 1^{er} Coautor: *Matilde, Villa-García* / **ORC ID:** 0000-0002-1115-6612, **CVU CONACYT ID:** 234139

ID 2^{do} Coautor: *Andrés, Quezada-Salinas* / **ORC ID:** 0000-0002-6476-5251, **CVU CONACYT ID:** 44660

ID 3^{er} Coautor: *Artemio, Mendoza-Mendoza* / **ORC ID:** 0000-0002-1532-3406, **CVU CONACYT ID:** 36731

ID 4^{to} Coautor: *Miguel Angel, Anducho-Reyes* / **ORC ID:** 0000-0003-2401-6608, **CVU CONACYT ID:** 89678

V.Calva, M. Villa, A. Quezada, A. Mendoza y M. Anducho

anducho@upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

Agriculture is one of the main axes on which the economy of a country develops, both in the economic ambit and food security. It is therefore, phytosanitary diseases must be controlled to maintain the quality and abundance of food. To achieve this, producers often resort to the use of chemical fertilizers and pesticides, however, the environmental pollution caused by the excessive use of these, has led to focus efforts on the development new alternatives friendly to the environment, one of which is biological control, which uses living organisms to suppress populations and activities of one or more pathogens. One of the biocontrol agents widely recognized is the genus *Trichoderma*. This group of ascomycetes fungi interacts with the roots of the plants providing protection against pathogens and improving their growth. In this chapter, this microorganism is referred to as a useful agrobiotechnological tool, as well as its application in bioremediation and source of microbial enzymes.

Trichoderma, Biocontrol, Metabolitos secundarios, Biorremediación

1. Introducción

La agricultura constituye una de las principales actividades económicas en el mundo, a partir de la cual se obtienen alimentos que desempeñan un papel clave para lograr la seguridad alimentaria y mejorar la nutrición. Sin embargo, actualmente enfrenta diversos retos para obtener una mayor productividad, uno de estos retos son las enfermedades causadas por fitopatógeno, las cuales generan pérdidas significativas en el rendimiento de diversos cultivos, por lo que la protección vegetal y particularmente la sanidad vegetal, se ha enfocado en su manejo para mantener la calidad y abundancia de los alimentos, utilizando diversos enfoques para prevenir, mitigar o controlar las mismas (Pal & McSpadden, 2006; ONU, 2018).

Más allá de buenas prácticas agronómicas y hortícolas, los productores a menudo dependen en gran medida de fertilizantes y pesticidas químicos. Sin embargo, la contaminación ambiental causada por el uso excesivo e inadecuado de estos insumos, su presencia en el ambiente y la selección de patógenos resistentes a los mismos, ha llevado a generar diversas estrategias alternativas como el control biológico (Benítez et al., 2004).

El término "Control Biológico" se ha utilizado en diferentes campos de la biología para definir la utilización deliberada de organismos vivos introducidos o residentes, con el objetivo de suprimir la actividad y la población de uno o más patógenos de plantas (Pal & McSpadden, 2006). Desde los primeros estudios en esta temática, hasta la actualidad, uno de los microorganismos con mayor aplicación en el control biológico ha sido el género *Trichoderma*, debido a su alto porcentaje de control, capacidad reproductiva, adaptabilidad ecológica, altas tasas de crecimiento *in vitro* e *in vivo* y su efecto favorable en la respuesta sistémica de las plantas, siendo el agente de biocontrol más utilizado entre los hongos antagonistas (Monte, 2001; Infante et al., 2009).

La primera descripción que se realizó para el género de *Trichoderma* se remonta a 1794 por Persoon. A partir de entonces, nuevas especies de *Trichoderma* fueron descritas, comprendiendo más de 200 filogenéticamente definidas para el año 2013. Actualmente se encuentra clasificado taxonómicamente de la siguiente manera: (Jangir et al., 2017; Atanasova et al., 2013; Persoon, 1794)

Reino Mycetae: (Fungi)

División: *Ascomycotina*

Subdivisión: *Pezizomycotina*

Clase: *Sordariomycetes*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocraceae*

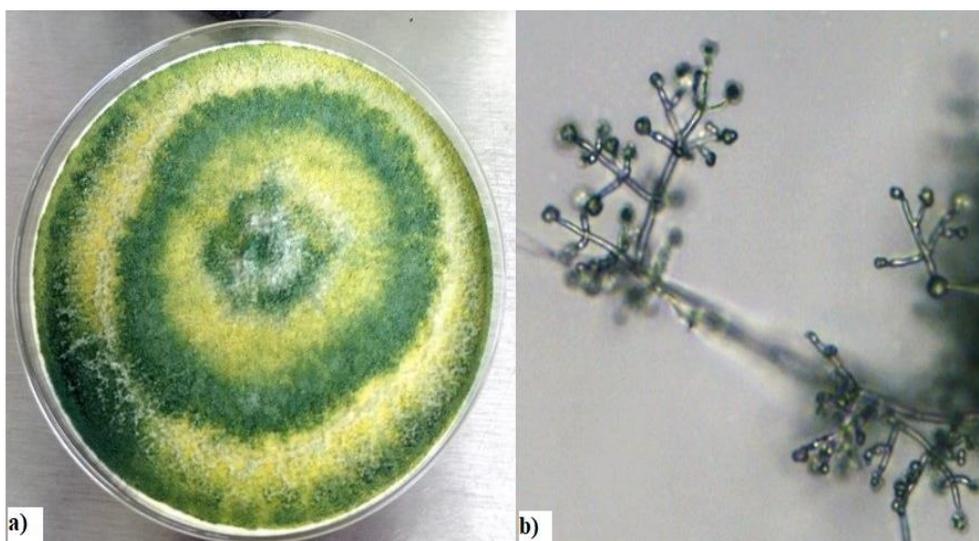
Género: *Trichoderma*

2. Características de *Trichoderma*

Las especies del género de *Trichoderma* son colonizadores ubicuos que tienen la capacidad de asimilar gran variedad de sustratos (Kubicek et al., 2003; Cázares-García et al., 2013). Estos frecuentemente son aislados de suelos, madera, materia orgánica en descomposición y dentro de los tejidos de raíces de diversas plantas (Harman et al., 2004; Błaszczuk et al., 2011). Para su aislamiento e identificación en medios de cultivo sintéticos se consideran características macroscópicas que incluye un crecimiento acelerado de micelio con la presencia de anillos concéntricos de coloraciones, blancas, amarillas y verdes, mientras que el reverso de las colonias es usualmente amarillo, ámbar o incoloro; así mismo, generan una gran cantidad de esporas y en algunas ocasiones presentan olores dulces a coco (Figura 1.1 a).

Entre las características microscópicas relevantes para este género, está la presencia de conidióforos hialinos, altamente ramificados que usualmente emergen en un ángulo de 90° respecto a la ramificación principal con estructura piramidal, fiálides ensanchadas de la parte central en forma de “botella” que pueden ser cilíndricas o subglobosas y se encuentran de forma simple o en grupos; hifas vegetativas ramificadas, lisas, hialinas y septadas (Figura 1.1b). Mientras que en cultivo sumergido produce clamidosporas cuya ventaja es su menor vulnerabilidad, resistencia al estrés ambiental, mayor potencial de inóculo en comparación con conidios y una vida útil más larga (Torres-De la Cruz et al., 2015; Jangir et al., 2017). Las condiciones óptimas para su crecimiento en laboratorio son: temperatura, en un intervalo entre 25-35°C, siendo la óptima 25°C; humedad relativa, del 20 al 80%, con un óptimo de 70% y pH; de 6 a 6.5 (Shukla et al., 2014).

Figura 1.1 Características morfológicas coloniales y microscópicas de *Trichoderma*. Observación realizada con un microscopio de contraste de fases 40X



a) Colonia de *Trichoderma* sp. en medio PDA (Papa-Dextrosa- Agar), aislado de la rizosfera de trigo en el Valle del Mezquital, Hidalgo. b) Cuerpos fructíferos de *Trichoderma* spp. Observación realizada con un microscopio de contraste de fases 40X.

Fuente: Elaboración Propia

3. *Trichoderma* en la agrobiotecnología

Las diferentes especies de *Trichoderma* logran la colonización de un hábitat determinado, para lo cual ejercen mecanismos de control por competencia directa, producción de metabolitos y enzimas, aumento en la resistencia sistémica, producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y micoparasitismo. A continuación, se describen cada uno de ellos (Schuster & Schmoll, 2010; Rai et al., 2016).

3.1 Competencia

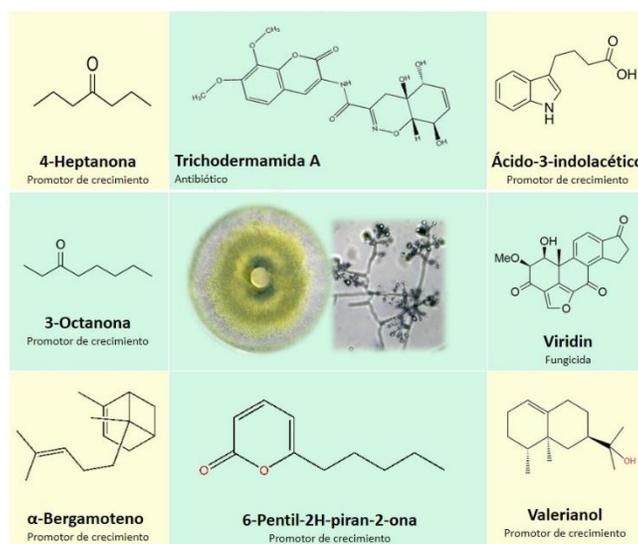
La competencia por espacio y/o nutrientes en la rizosfera de la planta, ha sido considerada como uno de los mecanismos de biocontrol del género *Trichoderma* debido a que son capaces de colonizar la superficie de la raíz, penetrando en ella por los espacios intercelulares hasta la primera o la segunda capa de células (Saravanakumar et al., 2017).

Tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizosfera, además presenta resistencia a metabolitos generados por otras especies (plantas, bacterias y hongos), compuestos fenólicos, y tóxicos como herbicidas, fungicidas y antibióticos (Harman et al., 2004). Por otra parte, posee la capacidad de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, ejemplo de esto es la absorción del hierro por la producción de sideróforos altamente eficientes que funcionan como agentes quelantes (Sun et al., 2016). Además, es muy versátil para utilizar diversos sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, permitiendo su rápida proliferación en un medio (Rai et al., 2016).

3.2 Producción de metabolitos secundarios

Con el fin de sobrevivir y competir en su nicho ecológico, *Trichoderma* posee la capacidad de producir diversos metabolitos secundarios, como micotoxinas y más de 100 moléculas no polares y volátiles de bajo peso molecular con actividad antibiótica, tales como pironas, policétidos, terpenos, butenolidas, auxinas, esteroides y metabolitos derivados de aminoácidos, además de compuestos heterocíclicos e isocianuros (Jeleń et al., 2013). También produce un impresionante repertorio de compuestos no volátiles, que comprenden algunos alcaloides y un número importante de antibióticos peptídicos (Figura 1.2). Cabe mencionar, que para la regulación de la producción de los metabolitos secundarios *intervienen* diferentes factores ambientales como lo son: pH, nutrientes, luz e impacto por lesiones mecánicas (Sivasithamparam & Ghisalberti 1998; Vinale et al., 2008).

Figura 1.2 Ejemplos de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*. Estructuras químicas de metabolitos secundarios producidos por *Trichoderma*. (Nieto-Jacobo et al., 2017; Jeleń et al., 2013; Garnica-Vergara et al., 2016).



Fuente: Elaboración Propia

3.3 Resistencia sistémica en plantas

El género *Trichoderma* ha demostrado ser simbiote de plantas, colonizando sus raíces y generando factores de comunicación químicos que inducen la invasión de las capas externas de la raíz (corteza) por las hifas del hongo (Yedidia et al., 1999). Durante este proceso se induce la resistencia al ataque de patógenos e interacciones sistémicas dentro de la misma; es decir, durante la penetración se estimula el sistema de defensa de la planta, lo que ocasiona un incremento en la producción de enzimas como la quitinasa, glucanasa y enzimas asociadas con la síntesis de fitoalexinas. Aunque *este ascomiceto* está restringido a las raíces, el follaje se vuelve resistente a las enfermedades (Tabla 1.1) (Yedidia et al., 2003; Harman et al., 2004).

La fisiología básica de los cambios en las plantas por *Trichoderma* es originada por una amplia gama de factores de comunicación química, en donde la respuesta particular puede alterarse a medida que cambian estos factores. Por otra parte la interacción con las raíces de las plantas crea un estado de sensibilización en ellas, que les permiten responder de manera más eficiente al ataque de patógenos, la cual se hace evidente con la reducción de síntomas de la enfermedad y la potenciación sistémica de la expresión de genes relacionados con la defensa (Yedidia et al., 2003; Shoresh et al., 2005; Shoresh & Harman, 2006).

Ejemplo de esto se encuentra en el cultivo de pepino (*Cucumis sativus*), en donde estudios recientes demostraron que la vía principal de transducción de señales de *Trichoderma*, es inducida por ácido jasmónico y etileno confiriéndole resistencia sistémica inducida a la planta de pepino (Djonovic et al., 2007). Así mismo Saravanakumar et al., (2016), sugieren que las hidrolasas, *Thph1* y *Thph2*, de *Trichoderma harzianum*, están relacionadas en la inducción de la resistencia sistémica para enfermedades foliares en el maíz. En otros estudios se ha evaluado la resistencia sistémica inducida por *Trichoderma asperelloides* a plantas de *Arabidopsis thaliana* contra *Pseudomonas syringae* mostrando un aumento en la expresión de un conjunto de 137 genes de la planta relacionados con las respuestas de defensa (Brotman et al., 2012).

Tabla 1.1 Especies de *Trichoderma* con actividad antagonista a patógenos de plantas

Microorganismo	Patógeno	Planta	Porcentaje de control	de Referencia
<i>T. koningii</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Algodón	88.12%	Gajera et al, 2016
<i>Trichoderma sp.</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Frijol	82.86%	Kamala & Indira, 2011
<i>T. viride</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Algodón	85.34%	Gajera et al, 2016
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Pepino	86.34%	Chaverri et al, 2015
<i>T. asperellum</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Tomate	40.00%	Kipngeno et al, 2015
<i>T. asperellum</i>	<i>Phytophthora megakarya</i>	Cacao	90.00%	Mbarga et al, 2014
<i>T. asperellum, T. harzianum, T. ghanense</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomate	48.30%	Debbi et al, 2018
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	Maíz	58.00%	Ferrigo et al, 2014
<i>T. atroviride</i> y <i>T. harzianum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	Frijol	50.00%	Gal-Hemed et al, 2011
<i>T. asperellum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Maíz	92.30%	Saravanakumar et al, 2017
<i>T. longibrachiatum</i>	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Melón	No reportado	Martínez et al, 2001

Fuente: Elaboración Propia

3.4 Promotor de crecimiento vegetal

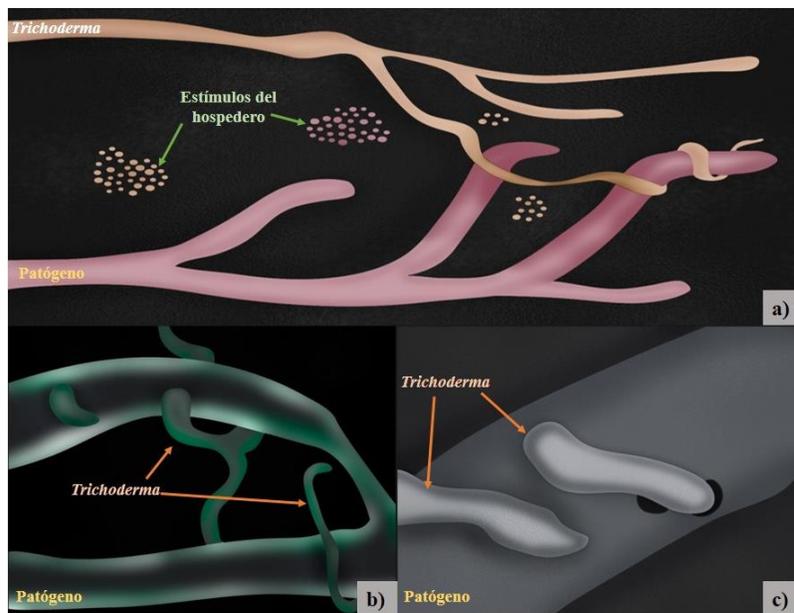
Las especies del género *Trichoderma* mejoran el crecimiento de las plantas, favoreciendo el desarrollo de la raíz, la captación de nutrientes y la resistencia al estrés abiótico, mejorando su productividad en campo hasta en un 300% (Bae et al., 2009). Esto debido a la producción de fitohormonas (auxinas y citoquininas), la solubilidad y el aumento en la disponibilidad de fosfatos, micronutrientes y minerales tales como hierro, manganeso y magnesio (Contreras-Cornejo et al., 2011). Igualmente mejora el verdor de las plantas, dando lugar a mayores tasas en la fotosíntesis por la formación de sustancias como ácido indol acético, ácido antranílico y ácido giberélico (Harman et al., 2004; Harman, 2006).

3.5 Micoparasitismo

El micoparasitismo es el tipo de interacciones biotróficas en el que los organismos se benefician a expensas de otros hongos, teniendo la capacidad de antagonizar, parasitar o incluso matar al hospedante (Figura 1.3). En este mecanismo pueden actuar los fenómenos de antibiosis y competencia, ocurriendo en cuatro etapas: Crecimiento quimiotrófico; donde *Trichoderma* crece en respuesta a algún estímulo de la hifa del hospedante o hacia un gradiente de químicos producidos por el mismo (Figura 1.3a) (Druzhinina et al., 2011).

Reconocimiento: en esta etapa las hifas de *Trichoderma* detectan la presencia de un posible huésped en el medio mediante lectinas específicas (Figura 1.3b). Adhesión o enrollamiento y Actividad lítica: en la cual el hongo crece rodeando al patógeno, posteriormente genera la formación de ovillos y apresorios, cuya función es la de atravesar la pared celular del hongo para favorecer la penetración de sus hifas las cuales utilizarán el contenido intracelular del hospedante a su favor. Esta etapa se encuentra acompañada de la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas las cuales favorecen la ruptura de la pared celular (Figura 1.3c) (Samolski et al., 2009; Kubicek et al., 2011; Druzhinina et al., 2011).

Figura 1.3 Diagrama general de micoparasitismo realizado por *Trichoderma*.



a) Crecimiento quimiotrófico; *Trichoderma* crece en respuesta a estímulos de la hifa del hospedero, **b)** Reconocimiento; Las hifas de *Trichoderma* detectan la presencia de un posible huésped mediante lectinas específicas, **c)** Adhesión o enrollamiento y Actividad lítica; *Trichoderma* crece rodeando al patógeno y penetra al hospedero con la formación de apresorios y la producción de enzimas líticas extracelulares.

Fuente de Consulta: Propia

4. *Trichoderma* otros usos

La acción benéfica de *Trichoderma* no se limita a la lucha contra los patógenos; también se utiliza como promotor del crecimiento vegetal, para la biorremediación, y en la producción de enzimas y metabolitos de importancia industrial (Yedidia et al., 1999; Shores et al., 2010).

4.1 Biorremediación

Es bien conocido que *Trichoderma* es resistente a una amplia variedad de compuestos tóxicos como metales pesados, compuestos organometálicos, efluentes de curtidería y productos químicos nocivos como el cianuro. Esta propiedad hace que este hongo sea un género empleado en la biorremediación para la eliminación de contaminantes tóxicos (Mohsenzadeh & Shahrokh, 2014; Hasan et al., 2016).

Entre los reportes que tiene *Trichoderma* a diferentes compuestos tóxicos, se encuentra la tolerancia al naftaleno (NAPH) y fenantreno (PHE), así mismo este ascomiceto favorece la degradación de plaguicidas en el suelo como, clordano, lindano y dicloro difenil tricloroetano, por lo que es útil para la remediación de sitios contaminados con plaguicidas (Lynch & Moffat, 2005; Hatvani et al., 2006).

Ciertas especies de *Trichoderma* han sido reportadas por tolerar y acumular varios metales pesados como el cobre, zinc, cadmio, níquel y arsénico en condiciones de laboratorio. Así mismo tiene la capacidad de aumentar la absorción de nitratos y otros iones en la raíz facilitando la adsorción de diversos metales tóxicos y metaloides que promueven la actividad de fitoextracción (Asha et al., 2012).

Algunos mecanismos de *Trichoderma* para la tolerancia a los metales, es la inducción en la producción de raíces de la planta de manera abundante que facilitan la hiperacumulación de tóxicos, lo cual de alguna manera la protegen contra el daño oxidativo por una mayor eficiencia en la captación de los nutrientes. Un ejemplo de esta actividad se observa con *T. harzianum* el cual desintoxica de cianuro de potasio y a su vez promueve el crecimiento de la raíz del helecho *Pteris vittata* (Lynch & Moffat, 2005; Mohsenzade et al., 2012).

4.2 Enzimas de *Trichoderma* en la industria

Trichoderma tiene un gran potencial en la producción de enzimas celulasas, xilanasas, proteasas y β -1,3-glucanasas (Verma et al. 2007), en este rubro la especie más estudiada de *Trichoderma* para la producción de enzimas es *T. reesei*. Debido a su capacidad en la producción de una mezcla eficiente de enzimas celulolíticas. A pesar de que otros hongos también producen estas actividades, que en algunos casos presentan propiedades superiores, este microorganismo es todavía utilizado casi exclusivamente por la industria, ya que la tecnología para su uso cuenta con setenta años de experiencia (Bischof et al., 2016; Druzhinina & Kubicek, 2016).

Como productor de celulasas, *T. reesei* hoy en día se centra en la optimización para la producción de bioetanol a partir de material de desecho celulósico. Sin dejar de lado las aplicaciones en la industria papelera y textil (Kumar et al., 2008).

Con su larga historia en la producción de enzimas a escala industrial, *Trichoderma* también ha sido utilizado para la producción de aditivos de alimentos y productos relacionados (Blumenthal, 2004), por ejemplo, varias pectinasas, celulasas, hemicelulasas se aplican para mejorar la producción de zumo de frutas y en la cocción, malteado y producción de alcohol de grano. De igual manera se ha sugerido el uso de estas enzimas, como conservadores de alimentos debido a su efecto antifúngico y en pasta dental para evitar la acumulación de placa (Galante et al., 1998).

Dado lo anterior, el género *Trichoderma* ha sido durante muchas décadas una excelente herramienta agrobiotecnológica, además de su uso en diferentes industrias y en la bioremediación (Schuster & Schmoll, 2010).

Actualmente el grupo de trabajo Aprovechamiento Integral de Recursos Bióticos (AIRB) de la Universidad Politécnica de Pachuca, evalúa cepas autóctonas de *Trichoderma* aisladas del municipio de Mixquiahuala, Hidalgo, las cuales pueden ser potencialmente útiles en el biocontrol del carbón de la espiga, enfermedad que ha generado pérdidas en la producción del maíz de hasta un 50%.

5. Conclusión

Durante décadas el género de *Trichoderma* ha demostrado su efectividad ante enfermedades fitosanitarias, además de mejorar el crecimiento de los cultivos. Sin embargo, se requiere profundizar en su estudio, además de obtener nuevos aislados con propiedades que presenten ventajas de aplicación en lugares específicos, es por esta razón que la investigación básica y aplicada continua para este ascomiceto.

6. Referencias

- Asha S., Manna MC., Asit M., Subba Rao A., Jyoti T., 2012. Exploring bioaccumulation efficacy of *Trichoderma viride*: an alternative bioremediation of cadmium and lead. *National Academy Science Letters*. 3: 299-302.
- Atanasova L., Druzhinina IS., Jaklitsch WM. 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. En: *Trichoderma* biology and applications. Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M. Wallingford, UK: CABI. pp. 10-42.
- Bae H., Sicher RC., Kim MS., Kim S., Strem MD., Melnick RL., Bailey BA. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botánica*. 60: 3279-3295.

- Benítez T., Rincón AM., Limón MC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-60.
- Bischof R. H., Ramoni J., Seiboth B. 2016. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*. 15: 106.
- Błaszczak L., Popiel D., Chelkowski J., Koczyk G., Samuels GJ, Sobieralski K., Siwulski M. 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of Applied Genetics*. 52: 233-243.
- Blumenthal CZ. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39: 214-28.
- Brotman Y., Lisec J., Meret M., Chet I., Willmitzer L., Viterbo A. 2012. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma* induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*. 158:139-46.
- Cázares-García SV., Vázquez-Garcidueñas MS., Vázquez-Marrufo G. 2013. Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: A bioinformatic approach. *Plos One*. 8: 55295.
- Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T., Samuels GJ. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycology*. 107: 558-590.
- Contreras-Cornejo HA., Macías-Rodríguez L., Beltrán-Peña E., Herrera-Estrella A., López-Bucio J. 2011. *Trichoderma* induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*. 6: 1554-1563.
- Debbi A., Bouregghda H., Monte E., Hermosa R. 2018. Distribution and genetic variability of *Fusarium oxysporum* associated with tomato diseases in Algeria and a biocontrol strategy. *Frontiers in Microbiology*. 9: 282.
- Djonović S., Vargas W.A., Kolomiets MV., Horndeski M., Wiest A., Kenerley CM. 2007. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. *Plant Physiology*. 145: 875-889.
- Druzhinina ES., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz BA., Kenerley CM., Monte E., Mukherjee PK., Zeilinger S., Grigoriev IV., Kubicek CP. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*. 9: 749-759.
- Druzhinina IS & Kubicek CP. 2016. Familiar Stranger: Ecological genomics of the model saprotroph and industrial enzyme producer *Trichoderma reesei* breaks the stereotypes. *Advances in Applied Microbiology*. 95: 69-147.
- Ferrigo D., Raiola A., Rasera R. 2014. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*. 65: 51-56.
- Gajera HP., Hirpara DG., Katakpara ZA. 2016. Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Infection Genetics and Evolution*. 45: 383-392.
- Galante YM., Conti A., Monteverdi R. 1998. Application of *Trichoderma* Enzymes in Textile Industry. En: Harman, G.F. and Kubicek, C.P., Eds., *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 2, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, Taylor and Francis. London. pp 311-326.

- Gal-Hemed, I., Atanasova, L., Komon-Zelazowska, M., Druzhinina, Viterbo, A., Yarden, O. 2011. Marine isolates of *Trichoderma* spp. as potential halotolerant agents of biological control for arid-zone agriculture. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 5100-5109.
- Garnica-Vergara A., Barrera-Ortiz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ruíz-Herrera LF., López-Bucio J. 2016. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. *The New phytologist*. 209: 1496-512.
- Harman GE., Howell CR., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 43-56.
- Harman GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96: 190-194.
- Hasan S. 2016. Potential of *Trichoderma* sp. in Bioremediation: a review. *Journal of Basic and Applied Research International*. 3: 776-779.
- Hatvani L., Manczinger L., Kredics L. 2006. Production of *Trichoderma* strains with pesticide polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 89: 387-393.
- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. 24: 14-21.
- Jangir M., Pathak R., Sharma S. 2017. *Trichoderma* and Its Potential Applications. En: Singh D., Singh H., Prabha R. Plant-Microbe Interactions. En: Perspectives of Agro-ecological. Springer, Singapur. pp 323-339.
- Jeleń H., Blaszczyk L., Chelkowski J., Rogowicz K., Strakowska J. 2013. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress*. 13: 589-600.
- Kamala T & Indira S. 2011. Evaluation of indigenous *Trichoderma* isolates from Manipur as biocontrol agent against *Pythium aphanidermatum* on common beans. *Biotechnology*. 1: 217-225.
- Kipngeno P., Losenge T., Maina N. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. *Biological control*. 90: 92-95.
- Kubicek CP., Bissett J., Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C., Szakács G. 2003. The genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study in Southeast Asia isolated. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 310-319.
- Kubicek CP., Aerts A., Alcaraz LD., Antal Z., Atanasova L., Casas-Flores S., Cervantes-Badillo MG., Challacombe J., Chertkov O., Coulpier F., Deshpande N., Druzhinina ES., Ebbola DJ., Esquivel-Naranjo UE., Fekete E., Flipphi M., Glaser F., Gómez-Rodríguez EY., Herrera-Estrella A., Horwitz BA., Kredics L., Martínez DA., McCluskey K., Mukherjee M., Mukherjee PK., Seidl-Seiboth V., Thon M., Von Döhren H., Zeilinger S., Gruber S. 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*. 12: 40.
- Kumar R., Singh S., Singh OV. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 377-391.
- Lynch JM & Moffat AJ. 2005. Bioremediation prospects for the future application of innovative applied biological research. *Annals of Applied Biology*. 146: 217-221.
- Martínez C., Blanc F., Le Claire E., Besnard O., Nicole M., Baccou JC. 2001. Salicylic acid and ethylene pathways are differentially activated in melon cotyledons by active or heat-denatured cellulase from *Trichoderma longibrachiatum*. *Fisiología Vegetal*. 127: 334-344.

- Mbarga JB., Begoude BAD., Ambang Z. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biological Control*. 77: 15-22.
- Mohsenzade F., Chehregani A., Akbari M. 2012. Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils Iran. *International Journal of Environmental Health Engineering*. 9: 26-34.
- Mohsenzadeh F & Shahrokhi F. 2014. Biological removing of Cadmium from contaminated media by fungal biomass of *Trichoderma* species. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 12: 102.
- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *International Microbiology*. 4: 1-4.
- Nieto-Jacobo M.F., Steyaert JM., Salazar-Badillo FB., Nguyen DV., Rostás M., Braithwaite M., Souza JF., Jiménez-Bremont JF., Ohkura M., Stewart AM., Mendoza-Mendoza A. 2017. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science*. 8: 102.
- ONU. Organización de las Naciones Unidas. 2018. La agricultura en el siglo XXI: un nuevo paisaje para la gente, la alimentación y la naturaleza. Recuperado de: <http://www.onu.org.mx/la-agricultura-en-el-siglo-xxi-un-nuevo-paisaje-para-la-gente-la-alimentacion-y-la-naturaleza/>. Consultado en: Agosto, 2018.
- Pal KK. & McSpadden B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1:25.
- Persoon CH. 1794. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme. *Neues Magazin für die Botanik in ihrem ganzen Umfange*. 1: 63-128.
- Rai S., Kashyap PL, Kumar S., Srivastava AK, Ramteke PW. 2016. Identification, characterization and phylogenetic analysis of antifungal *Trichoderma* from tomato rhizosphere. *Springer Plus*. 5: 1939.
- Samolski I., de Luis A., Vizcaíno JA., Monte E., Suárez MB. 2009. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. *BMC Microbiology*. 9: 217.
- Saravanakumar K., Fan L., Fu K., Yu C., Wang M., Xia H. Chen J. 2016. Cellulase from *Trichoderma harzianum* interacts with roots and triggers induced systemic resistance to foliar disease in maize. *Scientific Reports*. 6: 35543.
- Saravanakumar K., Li Y., Yu C., Wang Q., Wang M., Sun J. Chen J. 2017. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific Reports*. 7: 1771.
- Schuster A & Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 787-799.
- Shoresh M & Harman GE., Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual review of phytopathology*. 48: 21-43.
- Shoresh M., Yedidia I., Chet I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Fitopatología*. 95: 76-84.
- Shoresh M & Harman GE. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Fisiología Vegetal*. 147: 2147-2163.
- Shukla DI., Gupta V., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R., Druzhinina I., Tuohy M. 2014. Role of *Trichoderma* species in bioremediation process: biosorption studies on hexavalent chromium. *Health and Environmental Research*. 30: 405-412.

- Sivasithamparam K & Ghisalberti FL. 1998. Secondary metabolism *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume I. Eds. C.P. Kubicek and G.E. Harman. Taylor and Francis Ltd. London. pp. 139-191.
- Sun J., Pei Y., Li E., Li W., Hyde KD, Yin WB., Liu X. 2016. A new species of *Trichoderma hypoxylon harbours* abundant secondary metabolites. *Scientific Reports*. 6: 37369.
- Torres-De la Cruz M., Ortiz-García C., Bautista-Muñoz C., Ramírez-Pool J., Ávalos-Contreras N., Cappello-García S., De la Cruz-Pérez A. 2015. *Trichoderma* diversity in the cocoa agroecosystem in the state of Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 86: 947-961.
- Verma M., Brar SK., Tyagi RD., Surampalli RY., Valéro JR. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 37: 1-20.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti EL., Marra R., Woo SL., Lorito M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 1-10.
- Yedidia I., Benhamou N., Chet I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 1061-1070.
- Yedidia I., Shores M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y., Chet I. 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 7343-7353.

Expresión heteróloga de *xilanasas* y *aspartil* proteasas de hongo

Heterologous expression of *xylanases* and *aspartyl* proteases fungal

PÉREZ-RODRÍGUEZ, Joany^{1†}, VIGUERAS-MORALES, Yajaira Sulim², IBARRA-GARCIA, José Antonio², ÁLVAREZ-CERVANTES, Jorge², y MERCADO-FLORES, Yuridia^{1*}

¹*Universidad Politécnica de Pachuca. México.*

²*Instituto Politécnico Nacional. Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*

ID 1^{er} Autor: *Joany, Pérez-Rodríguez* / **ORC ID:** 0000-0003-3715-2633, **Researcher ID Thomson:** V-8559-2018, **CVU CONACYT ID:** 423548

ID 1^{er} Coautor: *Yajaira Sulim, Viguera-Morales* / **ORC ID:** 0000-0001-6710-5497, **Researcher ID Thomson:** V-8553-2018, **CVU CONACYT ID:** 858288

ID 2^{do} Coautor: *José Antonio, Ibarra-García* / **ORC ID:** 0000-0002-5016-0622, **CVU CONACYT ID:** 30792

ID 3^{er} Coautor: *Jorge, Álvarez-Cervantes* / **ORC ID:** 0000-0002-1764-9880, **CVU CONACYT ID:** 268049

ID 4^{to} Coautor: *Yuridia, Mercado-Flores* / **ORC ID:** 0000-0003-3278-2783, **CVU CONACYT ID:** 122168

J. Pérez, Y. Viguera, J. Ibarra, J. Álvarez e Y. Mercado

yuridiamercado@upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

The xylanases and aspartyl proteases derived from fungi are hydrolytic enzymes with an industrial application. Its importance lay in its biochemical properties, because they reduce time and costs in the production processes, due to its high specificity and selectivity. However, the current demand for these enzymes is not satisfied for the production using the native strain, this because yields low concentrations of the enzymes and requires high biomass density and production costs turns elevated. Thus in recent years, thanks to genetic engineering, new tools have been developed to increase the yield in the production of these enzymes and improve their characteristics, one of which is the heterologous expression. This tool has allowed the obtaining of recombinant proteins through different expression systems, such as, bacteria, yeasts and filamentous fungi. By means of the heterologous expression, the overproduction of heterologous xylanases and aspartyl proteases has been facilitated. Nevertheless, there are aspects to improve or to take in account, and as such there is a constant research to improve these techniques and make them more efficient.

Enzimas, Proteínas Heterólogas, Ingeniería Genética

1. Introducción

Las enzimas son moléculas biológicas complejas, que actúan como catalizadores que intervienen en los procesos metabólicos de los seres vivos, y tienen importancia a nivel biológico, científico e industrial (Beg *et al.*, 2001). Las bacterias, hongos y levaduras tienen la capacidad de excretar diferentes tipos de enzimas durante su crecimiento, siendo las hidrolíticas las que se producen en mayor cantidad. Entre las más importantes se encuentran las celulasas, pectinasas, xilanasas, xilosidasas y proteasas; utilizadas en diferentes procesos industriales (Motta *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). El uso de estas proteínas en diferentes sectores industriales, como es el papelerero, textil, alimentos, producción de bioetanol, entre otros, se debe principalmente a sus propiedades bioquímicas, disminuyendo tiempos y costos en los procesos, comparado con los tradicionales debido a su especificidad y selectividad (Ahmed *et al.*, 2012).

La producción en los últimos años ha evolucionado gracias al uso de procesos de fermentación, utilizando microorganismos seleccionados, sin embargo, la demanda actual del mercado no se satisface debido a la baja concentración, alta densidad de los tejidos y costos de producción (Palma *et al.*, 2002; Binod *et al.*, 2013). La industria en los últimos años, ha tenido que buscar nuevas alternativas para satisfacer sus necesidades, por lo que se ha dado a la tarea de buscar enzimas que cumplan con propiedades específicas, tales como estabilidad en un amplio intervalo de valores de pH y temperatura, alta actividad específica y resistencia a productos químicos, así como también condiciones de facilidad de uso, por lo que las enzimas nativas no son suficientes para satisfacer la demanda, debido al bajo rendimiento (Davids *et al.*, 2013). La ingeniería genética provee de nuevas herramientas para mejorar las características requeridas. Por ejemplo, la expresión heteróloga es importante en la producción de enzimas de interés industrial (Ahmed *et al.*, 2009), como las xilanasas y proteasas.

2. Producción de xilanasas y aspartil proteasas

Las xilanasas representan uno de los mercados de mayor éxito para las hemicelulosas comerciales. Esto debido a su uso potencial en aplicaciones de diversos sectores de la industria, por lo que hay una tendencia creciente en la producción de estas enzimas. Estas proteínas son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis del xilano. Son producidas principalmente por microorganismos como bacterias y hongos, que participan en la degradación de la pared celular de plantas, junto a otras enzimas que hidrolizan polisacáridos (Wong *et al.*, 1988; Subramaniyan y Prema, 2002; Goswami y Pathak, 2013). La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes sistemas de regulación. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general controlado por dos mecanismos; por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales como el xilano, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como xilosa, arabinosa o xilobiosa (Mandal, 2015). Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de estas actividades, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes (Polizeli *et al.*, 2005).

Los hongos filamentosos son productores de xilanasas desde un punto de vista industrial, excretan las enzimas en el medio y sus niveles son más altos que los producidos en levaduras o bacterias. Por otra parte, además de las xilanasas, los hongos producen varias enzimas auxiliares requeridas para la degradación del xilano (Goswani y Pathak, 2003; Motta *et al.*, 2013). Las especies de los hongos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* *Penicillium*, *Neurospora* y de bacterias como *Ruminococcus*, *Fibrobacteres*, *Clostridium* se consideran grandes productores de xilanasas (Kulkarni *et al.*, 1999; Motta *et al.*, 2013).

Sin embargo, las xilanasas son principalmente producidas por *Trichoderma* y *Aspergillus* a escala industrial (Fengxia *et al.*, 2008). Por otra parte, las enzimas proteolíticas, también conocidas como proteasas o peptidasas, son las responsables de catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos de otras proteínas, produciendo péptidos o aminoácidos libres. Constituyen una gran familia de enzimas, divididas en endopeptidasas (EC 3.4.21-99) y exopeptidasas (EC 3.4.11-19), clasificadas según la posición del péptido vínculo para ser escindido (Gupta *et al.*, 2002; Sabotic y Kos, 2012).

Las proteasas de ácido aspártico, también conocidas como aspartil proteasas se encuentra en el grupo de las endopeptidasas y dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría muestran una actividad máxima a pH bajo (pH 3 a 4) y tienen puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 3 a 4.5. Sus masas moleculares están entre los 30 a 45 kDa. Se pueden encontrar en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y virus, en donde desempeñan diferentes e importantes funciones (Horimoto *et al.*, 2009).

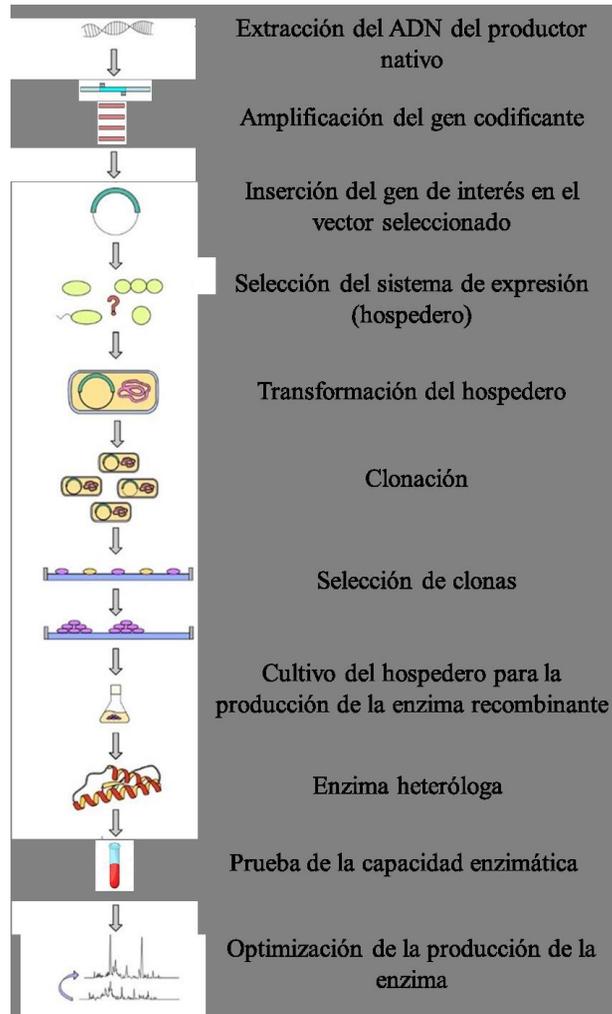
Una de las propiedades más significativas de este tipo de proteasas es su aplicación en la industria láctica, específicamente en la fabricación de quesos debido a su capacidad de coagular proteínas de la leche. Debido a esto, las proteasas ácidas microbianas han reemplazado a la enzima de ternera (cuajo), facilitando la expansión de la industria de la fabricación de queso. Además, juegan un papel prominente en el ablandamiento de la carne y en la panificación (Kumar y Takagi, 1999). La demanda que existe en el mercado de estas enzimas ha generado el desarrollo de nuevas estrategias para la producción, utilizando herramientas de ingeniería genética, como es el mejoramiento de cepas productoras o el uso de sistemas de expresión heteróloga, permitiendo la obtención de grandes cantidades de estas proteínas (Motta *et al.*, 2013).

3. Sistemas de expresión de proteínas

Las técnicas de DNA recombinante junto con los avances sobre el conocimiento de la fisiología y el metabolismo microbiano, han permitido el diseño de procesos donde los microorganismos se utilizan como factorías celulares, mejorando con esto las características específicas de las enzimas ya estudiadas y produciendo cepas modificadas que expresan a gran escala en hospederos de expresión heteróloga (Juturu y Wu, 2012).

Debido a esto, en la última década, han aumentado de forma exponencial la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico e industrial. Las fases necesarias para la producción comercial de proteínas son: clonación del gen de interés en un vector de expresión, transformación del microorganismo hospedero (sistema de expresión), proceso de selección de los transformantes, crecimiento del microorganismo y expresión en biorreactores y por último, recuperación y purificación de la proteína (Figura 2.1) (Ongley *et al.*, 2013).

El tipo de sistema de expresión a utilizar se selecciona en función de diferentes parámetros, como el rendimiento de la producción, el éxito en las modificaciones y el procesamiento post-traducciona, el plegamiento y la glicosilación de las proteínas de interés, la viabilidad económica y el posterior proceso de purificación. Para este fin se han empleado bacterias, levaduras y hongos. Hay diversos reportes descritos de clonación de un gran número de enzimas de varias fuentes. Cabe señalar que las enzimas recombinantes muestran mejores propiedades que las enzimas nativas (Juturu y Wu, 2012; Sharma y Kumar, 2013).

Figura 2.1 Pasos para la expresión heteróloga de enzimas

3.1 Bacterias

Las bacterias son microorganismos que son utilizados como sistemas de expresión de proteínas recombinantes de los cuales *Escherichia coli* es el organismo de mayor elección. El amplio conocimiento que se tiene de esta procarionta permite su uso con mayor frecuencia en la producción de proteínas industriales y farmacéuticas (Petsch y Anspach, 2000).

Las proteínas recombinantes sobreexpresadas en este sistema, se acumulan en el citoplasma o en el espacio periplásmico. Para la expresión de rutina, las cepas de *E. coli* BL21 y K12 se usan con mayor frecuencia (Phillips *et al.*, 1984). Las dificultades que presenta este sistema es que la proteína recombinante forme cuerpos de inclusión, generando problemas de inactivación e insolubilidad (Fischer *et al.*, 1993). La mayoría de los problemas son el resultado de la diferencia entre el uso de codones de *E. coli* y la proteína sobreexpresada, por ejemplo, para proteínas eucariotas.

El uso de codones que tengan estos organismos puede ser diferente al de *E. coli* y podrían ser especialmente un obstáculo (Dong *et al.*, 1996). De tal forma, si una proteína de origen eucariótico contiene un elevado número de codones de bajo uso en *E. coli* puede llevar a una insuficiencia de los tRNAs correspondientes y conducir a la terminación prematura de la traducción, el desplazamiento del marco de lectura y la incorporación errónea de aminoácidos. Para evitar este tipo de problemas, se han desarrollado cepas que pueden sobreexpresar algunos de los tRNAs de estos codones de baja frecuencia en la bacteria y así se pueda llevar a cabo una buena traducción. Dentro de estas se encuentran las cepas BL21 CodonPlus-RIL, BL21 CodonPlus-R y Rosetta (Kurland y Gallant, 1996). Alternativamente se pueden usar otros hospederos bacterianos que pueden reducir este problema (Terpe, 2006).

Diversas cepas de *Bacillus*, bacteria Gram-positiva, también son empleadas en la producción de proteínas heterólogas, debido a que poseen la capacidad de alta secreción y exportación de proteínas directamente al medio extracelular. En contraste con *E. coli*, se sabe poco de esta bacteria, sobre la formación de enlaces disulfuro y la isomerización (Westers *et al.*, 2004). Sin embargo, los genomas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* han sido secuenciados y estas bacterias no producen exotoxinas o endotoxinas dañinas (Demaina y Vaishnavb, 2009).

B. subtilis es un procarionte bien estudiado y ha sido empleado exitosamente en la producción de proteínas heterólogas, su capacidad de secretar directamente en el medio, es una de las mayores ventajas (Li *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque la transformación en este sistema parece ser más fácil, la producción de proteasas que hidrolizan a las proteínas recombinantes podría ser un problema (Murashima *et al.*, 2002).

Otro potencial problema es la modificación post-traduccional de la proteína de origen eucariótico debido que para su función o estructuración se requiere de la adición de grupos funcionales que no obtendrá de la bacteria usada para la expresión heteróloga (Demaina y Vaishnavb, 2009). En tal caso, y para seleccionar adecuadamente el organismo en que se expresará la proteína, se recomienda hacer un análisis bioinformático, por lo que de ser necesarias estas modificaciones se recomienda usar uno de los modelos descritos en la siguiente sección.

3.2 Levaduras

La expresión heteróloga de proteínas en levaduras es altamente atractiva porque provee beneficios adicionales a los sistemas de expresión en bacterias, entre los cuales se encuentran la habilidad para realizar modificaciones post-traduccionales, producir altos niveles de densidad celular y secretar proteínas en el medio de cultivo. Además, las levaduras son libres de toxinas y la mayoría tiene el *status* GRAS (por sus siglas en inglés “generally recognized as safe” y que significa “generalmente reconocido como seguro”). Las dos cepas de levadura más utilizadas son *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Demaina y Vaishnavb, 2009). *S. cerevisiae* es el modelo eucariótico más estudiado para la expresión heteróloga. Su genoma se encuentra completamente secuenciado.

Las mutantes por delección son fácilmente adquiribles y secreta altas cantidades de proteínas en el medio de cultivo. Otra ventaja que presenta es que las proteínas exógenas pueden dirigirse a los compartimentos unidos a la membrana los cuales se aíslan fácilmente para experimentos bioquímicos (Van-Khue y Rajini, 2004). Por otra parte, *P. pastoris* es ampliamente utilizada en la expresión de proteínas heterólogas, debido a que presenta ventajas como: mayor productividad de la proteína de interés, capacidad de secreción, formación de enlaces disulfuro, crece en soluciones con altas concentraciones de metanol y genera bajos costos de producción. Además, este sistema evita la hiperglicosilación (Gellison *et al.*, 1992). Por lo tanto esta levadura ha emergido como un excelente hospedero para la producción comercial de enzimas debido a su alta expresión bajo sus propios promotores o aquellos inducibles con metanol (Juturu y Wu, 2012).

3.3 Hongos filamentosos

Las características conocidas de alta productividad de los hongos filamentosos están en parte relacionadas con sus capacidades inherentes de crecimiento rápido y la gran producción de biomasa en sustratos de bajo costo en fermentadores relativamente simples. Estos organismos son secretores excepcionalmente buenos (Cherry y Fidantsef, 2003). El desarrollo de la tecnología recombinante aprovecha el poder de muchos de estos hongos como hospederos en la producción de proteínas recombinantes específicas como productos finales con aplicaciones en los sectores agrícola, alimentario, biomédico, farmacéutico, energético e industrial (Schuster *et al.*, 2002).

Con este fin, la investigación actual se lleva a cabo en mecanismos celulares para control interno de la calidad de proteínas, estrés de secreción, genómica funcional relacionada con la expresión y secreción de proteínas, modificación postraduccional, aplicación de promotores de expresión alternativos, identificación de factores de transcripción específicos y vinculación de la fisiología fúngica para la productividad.

Además del rendimiento, es igualmente importante que una proteína heteróloga dada se produzca en una forma activa y funcional, por lo que el plegamiento, el procesamiento proteolítico y la adición de glucanos como las principales modificaciones, se llevan a cabo correctamente en estos microorganismos (De Pourcq *et al.*, 2010; Ward, 2012).

Los hongos filamentosos que dominan la escena como hospederos de producción recombinante son *A. niger*, *A. oryzae* y *T. reesei* que se reproducen asexualmente. Consecuentemente, la mayoría de la información sobre la expresión de proteínas heterólogas proviene de estudios que usan estos microorganismos genéticamente bien caracterizados (Nevalainen y Peterson, 2014). Un competidor más reciente para la producción de productos génicos recombinantes heterólogos es *Chrysosporium lucknowense*, las ventajas que posee este organismo son: altas frecuencias de transformación, producción de proteínas a pH neutro, baja viscosidad del caldo de fermentación y tiempos cortos de producción (Emalfarb *et al.*, 2003).

4. Clonación de genes de xilanasas y proteasas de hongos

La búsqueda y selección de xilanasas y proteasas microbianas para aplicaciones industriales, ha permitido la introducción de la tecnología de ADN recombinante (Sunna y Antranikian, 1997), en donde los principales retos en la producción de estas enzimas son obtener una forma pura de estas a partir de una preparación fúngica. Los genes que codifican para estas proteínas se han clonado en hospedadores homólogos y heterólogos con el objetivo de sobrepoducirlas, sin alterar sus propiedades para adaptarse a aplicaciones comerciales (Baba *et al.*, 1994; Ahmed *et al.*, 2009). Se han clonado y expresado varios genes de estas enzimas para mejorar la producción, la utilización del sustrato y otras propiedades comercialmente útiles (Chand and Mishra, 2003).

4.1 Clonación en *E. coli*

Como ya se mencionó, *E. coli* ha sido ampliamente utilizada para la expresión heteróloga de proteínas recombinantes incluyendo xilanasas y proteasas de hongos (Tabla 2.1). Esto se debe principalmente a la amplia elección de vectores y facilidad de clonación de ADN de interés, sin embargo, la principal limitante es que no todas las proteínas se secretan de manera eficiente (Sorensen y Mortensen, 2005).

Existen diversos reportes acerca de la expresión heteróloga de xilanasas en *E. coli*, como es el caso del trabajo de Krisana *et al.*, (2005) quienes reportaron la expresión de una xilanasas heteróloga de *Aspergillus cf. niger* la cual mostró un peso molecular de 20.1 kDa por SDS-PAGE. Otro caso es el de la xilanasas codificada por el gen *xynII*, el cual fue clonado en el vector pET-28a (+), y expresado en la cepa de *E. coli* BL21- CodonPlus (DE3)-RIL (Zhou *et al.*, 2008). El gen *Xyn2* que codifica para una endo- β -1,4-xilanasas de *Trichoderma reesei*, fue clonado y expresado en *E. coli* BL21, la proteína heteróloga fue purificada por cromatografía de afinidad por columna de Ni²⁺-NTA, la cual presentó un pH y temperatura óptimos de 5.0 y 50°C, respectivamente (Jun *et al.*, 2009).

Li *et al* (2010) realizaron la clonación del gen *SAP6*, que codifica para la proteasa ácida de *Metschnikowia reukaufii*. La expresión de dicha proteína se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector de expresión pET-24a, logrando obtener una enzima recombinante de 54 kDa, con una temperatura y un pH óptimo de 40°C y 3.4, respectivamente. Determinaron que la actividad enzimática se ve afectada por los inhibidores Cu⁽²⁺⁾, Mg⁽²⁺⁾, Zn⁽²⁺⁾ y Ag⁽⁺⁾.

También se encontró que la proteína recombinante purificada tenía actividad coagulante de la leche. De igual forma, Jarai *et al.* (1994), expresó una proteasa de tipo aspártica de *Aspergillus niger*, con la capacidad de coagular las proteínas de la leche. La expresión la realizó en *E. coli*, con ayuda del vector pSE103. Esta proteína es codificada por el gen *pepE* y la proteína heteróloga posee un peso molecular de 43 kDa, un pH óptimo de 3 y es estable a un amplio intervalo de temperaturas.

Por otro lado, también se han logrado expresar aspartil proteasas importantes en la industria del Sake, tal como lo mencionan Kitano *et al* (2002), quienes expresaron una proteasa de *Aspergillus oryzae*, que es codificada por el gen *pepA*.

La enzima expresada en *E. coli* DH5 α , presentó un peso molecular de 48 kDa, fue estable a un amplio intervalo de temperatura (30-42°C), con una temperatura óptima de 42°C y es activa a pH ácidos. Doua *et al.* (2014), lograron expresar una proteasa aspártica de *Trichoderma asperellum*, importante para el biocontrol de hongos fitopatógenos. La proteasa recombinante es codificada por el gen *Asp55*, la cual se expresó en *E. coli* BL21, se purificó y evaluó la actividad enzimática mostrando un efecto inhibitor sobre *Alternaria alternata*.

Tabla 2.1 Xilanasas y proteasas heterólogas expresadas en *E. coli*.

Fuente	Gen	Vector	Hospedero	PM (kDa)	pH	Temp. °C	Importancia biotecnológica	Referencia
Xilanasas								
<i>Aspergillus niger</i> BCC14405	<i>Xyn</i>	pGEM-T Easy	<i>E. coli</i> DH5 α	20.1	-	-	Degradación de residuos agroindustriales.	Krisana <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus usamii</i> E001	<i>xynII</i>	pET-28a(+)	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	20	4.6	50	No se ha determinado	Zhou <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoderma reesei</i> Rut C-30	<i>Xyn2</i>	pET28 α	<i>E. coli</i> BL21	24	5.0	50	Blanqueamiento de la pulpa kraft	Jun <i>et al.</i> , 2009
Aspartil Proteasas								
<i>M. reukauffi</i>	SAP6	pET-24a	<i>E. coli</i>	54	3.4	42	Coagulante de la leche	Li <i>et al.</i> , 2010.
<i>A. oryzae</i>	<i>pepA</i>	pUCII8	<i>E. coli</i>	48		42	Producción del sake	Kitano <i>et al.</i> , 2002.
<i>Niger</i>	<i>pepE</i>	pSE103	<i>E. coli</i>	43	3.0	-	Coagulante de la leche	Jarai <i>et al.</i> , 1994
<i>T. asperellum</i>	<i>Asp55</i>	pGEX	<i>E. coli</i>	55.4	5.5	30	Con posible aplicación en el control biológico	Doua <i>et al.</i> , 2014.

4.2 Clonación en levaduras

Varios genes de xilanasas y proteasas de hongos han sido clonados y expresados en las levaduras *S. cerevisiae* y *P. pastoris*. Esto se debe, a que, por una parte, la primera proporciona un procesamiento postraduccional eficiente como la glicosilación y secreta solo unas pocas proteínas; por lo tanto, la purificación es más fácil (Das y Shultz 1987). Mientras que la segunda posee una alta eficiencia de secreción, alcanza altas densidades celulares en medios cultivos de bajo costo y la relativa facilidad de ampliación al proceso industrial (Cregg, 1999; Berrin *et al.*, 2000). La tabla 2.2 muestra xilanasas y proteasas expresadas heterológamente en estos ascomicetos.

La endo- β -1,4-xilanasas de *Trichoderma reesei* que es codificada por el gen *XYN2*, fue expresada en *S. cerevisiae* exitosamente, con un peso molecular de 27 kDa en condiciones desnaturizantes, esta enzima se reguló bajo el control de los promotores *ADH2* y *PGK1* en medio enriquecido (La Grange *et al.*, 1996). Más tarde Ganga *et al.*, (1998) expresaron una xilanasas de *Aspergillus nidulans* en *S. cerevisiae*, la enzima heteróloga fue secretada, cuando la levadura fue crecida en un medio mínimo que contenía glucosa como única fuente de carbono. Otra xilanasas también expresada en *S. cerevisiae* es la reportada por Parachin *et al.*, (2009), la cual fue parcialmente caracterizada, mostrando un peso molecular de 21.2 kDa y un punto isoeléctrico de 7.02.

De la misma manera, se han podido expresar proteasas aspárticas de diferentes fuentes en la levadura *S. cerevisiae*. Por ejemplo; la proteasa de *Trichoderma harzianum*, codificada por el gen *SA76*, se expresó en el vector pYES2, la masa molecular de la proteasa fue de 55 kDa y un pI de 4.5, con una temperatura óptima de 45°C y un pH óptimo de 3.5. El sobrenadante de cultivo de *S. cerevisiae* que expresó la proteasa aspártica fue capaz de inhibir el crecimiento de cinco hongos fitopatógenos (Liu y Yang, 2007). Yamashita *et al* (1986), expresaron una aspartil proteasa de *Saccharomycopsis fibuligera* en *P.pastoris*, por medio del vector pYII, obteniendo una proteasa de 39 kDa, estable a un amplio intervalo de temperatura (20-60°C) y valores de pH (2.6-5).

P. pastoris también es un sistema de expresión muy utilizado para xilanasas y proteasas ácidas. Berrin *et al.*, (2000) realizaron la producción eficiente de una xilanasas recombinante de *A. niger* en esta levadura, obteniendo rendimientos de hasta 60 mg/L en medio sintético. La enzima purificada mostró un peso molecular de 19.8 kDa, y un pH y temperatura óptima de 3.5 y 50°C respectivamente.

Las xilanasas codificadas por los genes *XylB*, *Xyn2*, *XynC* de *A. niger*, *Trichoderma reesei* Rut C-30 y *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente, también fueron clonadas en el vector pPICZαA. Estas enzimas heterólogas mostraron un pH y temperaturas óptimos que van de 5-6.0 y 50-70 °C, respectivamente (Ruaglek *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009; Huy *et al.*, 2011). Otro caso de éxito en la producción de enzimas heterólogas en *P. pastoris* es el de una proteasa producida por *Mucor circinelloides*, la cual se expresó con el vector pGAPZα-A. La caracterización de la proteína recombinante permitió determinar que presentó un peso molecular de 37 kDa, con un pH óptimo de 3.6 y una temperatura óptima de 24°C (Gama *et al.*, 2013). Este mismo sistema de expresión fue el que utilizó Takenaka *et al.* (2017), para expresar una aspartil proteasa originaria de *Aspergillus repense*, permitiéndoles adquirir una proteína recombinante con mejores rendimientos (14 veces mayor) con respecto a la cepa silvestre, además se obtiene fácilmente mediante precipitación con acetona y la recuperación final fue del 83%.

Yang *et al.* (2013) logró expresar una aspartil proteasa de *Trichoderma asperellum* en *P. pastoris*, que es codificada por el gen *TaAsp*. Se purificó y caracterizó la enzima recombinante, determinando un peso molecular de 43 kDa, la actividad se mantuvo relativamente estable a 25-60°C y pH 3.0-9.0, lo que indicó su potencial de aplicación en biocontrol. El valor de pH óptimo y la temperatura de la actividad de la enzima fueron pH 4.0 y 40°C, y bajo esta condición, con caseína como sustrato, la actividad fue de 18.5 U/mL. Yegin y Fernandez-Lahore (2013), reportaron la expresión de una proteasa ácida de *Mucor mucedo* en *P. pastoris*, el gen que codifica para esta proteína se clonó en el vector pGAPZαA. La máxima producción de la enzima se observó con un pH de 3.5 a 20°C.

La enzima recombinante fue purificada y mostró una notable sensibilidad al tratamiento térmico y quedó completamente inactivada después de la incubación a 55°C por 10 min, por lo que podría considerarse como una candidata potencial para ser usada como coagulante de la leche para la industria de queso. La proteinasa aspártica extracelular de *Rhizopus microsporus*, es codificada por el gen *Rmap* el cual se logró clonar y expresar a través de *P. pastoris* mediante el uso del vector pKJII3, obteniendo una enzima recombinante de una masa molecular de 35 kDa, la cual es estable a un amplio intervalo de valores de pH, con aplicación en la terapia antimicótica (Schoen *et al.*, 2002).

Tabla 2.2 Xilanasas y proteasas heterólogas expresadas en levaduras

Fuente	Gen	Vector	Hospedero	PM (kDa)	pH	Temp. (°C)	Importancia biotecnológica	Referencia
Xilanasas								
<i>T. reesei</i> QM6a	<i>Xyn2</i>	pDLGI	<i>S. cerevisiae</i> Y294		4.0	60	Blanqueamiento de la pulpa kraft	La Grange <i>et al.</i> , 1996
<i>A. nidulans</i>		pYLC1	<i>S. cerevisiae</i>	22	6-5	58	No se ha determinado	Ganga <i>et al.</i> , 1998
<i>Cryptococcus flavus</i>	<i>CfXYN1</i>	pGEM-T	<i>S. cerevisiae</i> MFL	21.2	3.0	50	No se ha determinado	Parachin <i>et al.</i> , 2009
<i>A. niger</i>	<i>XylA</i>	pHIL-D2	<i>P. pastoris</i>	19.8	3.5	50	No se ha determinado	Berrin <i>et al.</i> , 2000
<i>Aspergillus terreus</i> BCC129		pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	33	5.0	60	Blanqueamiento de la pulpa kraft Piensos para animales	Chantasingh <i>et al.</i> , 2006
<i>A. niger</i>	<i>XylB</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	21	5.0	58	Piensos para animales	Ruaglek <i>et al.</i> , 2007
<i>T. reesei</i> Rut C-30	<i>Xyn2</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>		6.0	50]	Piensos para animales	He <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus sulphureus</i>	<i>XynB</i>	pGAPzαA	<i>P. pastoris</i>		5.0	50	Piensos para animales	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>P. chrysosporium</i>	<i>XynC</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>		5.0	70	No se ha determinado	Huy <i>et al.</i> , 2011
Aspartil Proteasas								
<i>T. harzianum</i>	<i>SA76</i>	pYES2	<i>S. cerevisiae</i>	55			No se ha determinado	
<i>T. harzianum</i>	<i>SA76</i>	pYES2	<i>S. cerevisiae</i>	55			Posible aplicación en el control biológico	Liu & Yang, 2007.
<i>S. fibuligera</i>	<i>STA1</i>	pYII	<i>S. cerevisiae</i>	39	3.6	48	Posible aplicación en el control biológico	Yamashita <i>et al.</i> , 1986
<i>M. circinelloides</i>	<i>MCAP</i>	pGAPZα-A	<i>P. pastoris</i>	37	3.6	24	No se ha determinado	Gama <i>et al.</i> , 2013.
<i>A. repens</i>	<i>PepA_Mk82</i>	pGEM-T	<i>P. pastoris</i>	41	2	60	Hidrólisis y decoloración de pigmentos rojos	Takenaka <i>et al.</i> , 2007.
<i>T. asperellum</i>	<i>TaAsp</i>	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>	42	4.0	40	Posible aplicación en el control biológico	Yang <i>et al.</i> , 2013
<i>M. mucedo</i>	<i>DSM809</i>	pGAPZαA	<i>P. pastoris</i>	32	3.5	20	No se ha determinado	Yegin y Fernandez-Lahore, 2013.
<i>R. microporus</i>	<i>RMAP</i>	pKJII3	<i>P. pastoris</i>	35	2.5		Terapia antimicótica	Schoen <i>et al.</i> , 2002

4.3 Clonación y expresión en hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son atractivos hospederos para la expresión de proteínas, por su habilidad natural de secretar grandes cantidades de proteína al medio. Sin embargo, solo existen pocos reportes sobre la expresión heteróloga en estos microorganismos (Ahmed et al., 2009), como es el caso del gen *xyn2* del hongo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea*, que codifica para una xilanasas, el cual fue clonado el vector pUC18 y expresado en *T. reesei*. La enzima heteróloga mostró un peso molecular de 23 kDa (Faria et al., 2002).

Otro caso de la expresión heteróloga en *T. reesei* es el reportado por Salles et al (2007), quienes realizaron la clonación de dos genes *xyn5* y *xyn6* que codifican para xilanasas de la familia 11, los cuales fueron aislados del hongo filamentoso termotolerante *Acrophialophora nainiana*.

Otro sistema hospedero que ha sido empleado es *Aspergillus niger* como lo reporta Decelle et al., (2004), quienes clonaron y expresaron tres genes que codifican para endo-1,4- β - xilanasas en este sistema. Las enzimas heterólogas mostraron buenas características bioquímicas. Las xilanasas XynA, XynB y XynC tuvieron una masa molecular de 52, 30 y 50 kDa, respectivamente. La temperatura y pH óptimos oscilaron entre los 4.5 y 70 °C para las tres enzimas. Por otra parte, Dickson et al. (1987), reportaron la expresión de una aspartil proteasa de *Mucor miehei*, usando al hongo *Mucor circinelloides* como hospedero, lo cual les permitió conseguir una mayor concentración de enzima con respecto a la cepa silvestre.

5. Conclusión

La expresión heteróloga de proteínas es una herramienta útil para la producción de enzimas microbianas de importancia industrial como las xilanasas y aspartil proteasas, las cuales son producidas en la cepa original en bajos rendimientos. Esta herramienta biotecnológica ha sido investigada utilizando diferentes hospedadores ya sean bacterianos, levaduriformes y hongos filamentosos, sin embargo, siguen siendo pocos los reportes de este tipo de enzimas, aun tomando en cuenta la importancia industrial que tienen. Probablemente esto se debe, a que se requiere de más investigación para dilucidar los mecanismos con los cuales esta técnica puede ser mejorada y también ser más eficiente.

6. Referencias

- Ahmed S., Imdad, S.S., Jamil, A. (2012). Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electron. Journal of Biotechnology*. 15: 1-8.
- Ahmed S., Riaz S., Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases:an overview. *Applied Microbiology Biotechnology*. 84:19-35.
- Baba T., Shinke, R., Nanmori, T. (1994). Identification and characterization of clustered genes for thermostable xylan-degrading enzymes, β -xilosidase and xylanase, of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Environment Microbiology*. 60:2252-8.
- Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 326-338.
- Berrin J.G., Wiliamson G., Puigserver A., Chaix J.C., McLauchlan W.R., Juge, N. (2000). High level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 19:179–187.
- Binod P., Palkhiwala P., Gaikaiwari R., Nampoothiri K.M., Duggal A., Dey K., Pandey A. (2013). Industrial Enzymes-Present status and future perspectives for India. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 72:271-286.
- Chand S., Mishra, P. (2003). Research and application of microbial enzymes-India's contribution. *Advances Biochemical Engeneering Biotechnology*. 85:95–124.

- Cherry J. R., Fidantsef A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 438-443.
- Cregg J.M. (1999). Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Fernandez JM, Hoeffler JP. Gene expression systems. Academic, New York. pp 157–191.
- Das, R.C., y Shultz, J.L. (1987). Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*. 3:43–48.
- Das R.C., Shultz, J.L. (1987). Secretion of heterologous proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*. 3:43–48.
- Davids T., Schmidt, M., Böttcher D., Bornscheuer, U.T. (2013). Strategies for the discovery and engineering of enzymes for biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 17:215-20.
- De Pourcq K., De Schutter K., Callewaert, N. (2010). Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 1617–1631.
- Decelle B., Tsang A., Storms, R.K. (2004). Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4-*b*-xylanases. *Current Genetics*. 46:166-175.
- Demaina A.L., Vaishnavb P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27:297-306.
- Dickinson L., Harboe M., Van Heeswijck R., Stroman P., Jepsen, L.P. (1987). Expression of Active *Mucor miehei* Aspartic Protease in *Mucor Circinelloides*. *Carlsberg Research Communications*. 52: 243-252.
- Dong H., Nilsson L., Kurland C.G. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rate. *Journal of Molecular Biology*. 260:649-663.
- Doua K., Wanga Z., Zhang R., Wanga N., Fana H., Diaoa G., Liua Z. (2014). Cloning and characteristic analysis of a novel aspartic protease gene *Asp55* from *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research*. 169: 915–923.
- Emalfarb M.A., Burlingame R.P., Olson P.T., Sinitsyn A.P., Parriche M., Bousson J.C. (2003). Transformation system in the field of filamentous fungal hosts. US Patent, US: 6,573,086.
- Faria P., Te'o V.S.J., Bergquist P.L., Azevedo M.O., Nevalainen K.M.H. (2002). Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*. 34:119-123.
- Fengxia L., Mei L., Zhaoxin L., Xiaomei B., Haizhen Z., Yi W. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*. 99:5938-5941.
- Fischer B., Summer I., Goodenough P. (1993). Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*. 41: 3-13.
- Gama J.A., Kangwa M., Fernandez-Lahore, M. (2013). Cloning and expression of an active aspartic proteinase from *Mucor circinelloides* in *Pichia pastoris*. *BMC Microbiology*. 13:250.
- Ganga A., Querol A., Valles S., Ramón D., MacCabe A., Piñaga, F. (1998). Heterologous Production in *Saccharomyces cerevisiae* of Different *Aspergillus nidulans*. Xylanases of Potential Interest in Oenology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 78:315-320.
- Gellison G., Janowicz Z.A., Weydemann U., Melber K., Strasser A.W.M., Hollenberg C.P. (1992). High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*. 10:179–189.

- Goswami G.K., Pathak R.R. (2013). Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*. 2:237-246.
- Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:15–32.
- He J., Yu B., Zhang K., Ding X., Chen D. (2009). Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. *BMC Biotechnology*. 9:1-10.
- Horimoto Y., Dee D., Yada R. (2009). Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnology*. 25: 318-324.
- Huy N.D., Kim S.W., Park S.M. (2011). Heterologous expression of endo-1,4-beta-xylanaseC from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111:654-657.
- Jaraia G., Homberghb H., Buxtona F. (1994). Cloning and characterization of the *pepE* gene of *Aspergillus niger* encoding a new aspartic protease and regulation of *pepE* and *pepC*. *Gene*. 145: 171-178.
- Jun H., Bing Y., Keying Z., Xuemei D., Daiwen C. (2009). Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene in *Escherichia coli* and activity of the enzyme on fiber-boudb substrates. *Protein Expression and Purification*. 67: 1-6.
- Juturu, V y Wu, J.C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. 30: 1219-1227.
- Kitano, H., Kataoka, K., Furukawa, K., y Hara, S. (2002). Specific Expression and Temperature-Dependent Expression of the Acid Protease-Encoding Gene (PepA) in *Aspergilhs oryzae* in Solid-State Culture (Rice-Koji). *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93: 563-567.
- Krisana, A., Rutchadaporn, S., Jarupan, G., Lily, E., Sutipa, T., y Kanyawim, K. (2005). Endo β -1,4-xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. *Journal Biochemical Molecular Biology* 38:17–23.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23:411-456
- Kumar C.G., Takagi H. (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*.17:561–594.
- Kurland C., Gallant J. (1996). Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology* 7:489–493.
- La Grange D., Pretorius I., Zyl W.H.V. (1996). Expression of a *Trichoderma reesei* b-Xylanase Gene (*XYN2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Enviroment Microbiology*. 62: 1036–1044.
- Li H., Liu J., Wu J., Xue Y., Gan L., Long M. (2014). Comparative Analysis of Enzymatic Hidrolysis of Miscanthus Xylan using *Aspergillus niger*, *Hypocrea orientalis*, and *Trichoderma reesei* Xylan-degrading Enzymes. *BioResources*. 9: 2191-2202.
- Li J., Chi Z., Wang X. (2010). Cloning of the SAP6 gene of *Metschnikowia reukaufii* and its heterologous expression and characterization in *Escherichia coli*. *Microbiological Research*. 165: 173-182.
- Li W., Zhou X., Lu P. (2004). Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*. 155:605–610.

- Liu Y., Yang Q. (2007). Cloning and heterologous expression of aspartic protease SA76 related to biocontrol in *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 277:173-181.
- Mandal A. (2015). Review on Microbial Xylanases and their Applications. *International Journal of Life Sciences*. 4:178-187.
- Motta F.L., Andrade C.C.P., Santana M.H.A. (2013). A review of xylanase production by the fermentation of Xylan: classification, characterization and applications. In: Chandel AK, da Silva SS (eds) *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass Techniques, Applications and Commercialization*. INTECH, Chennai, pp251-275.
- Murashima K., Chen C.L., Kosugi A., Tamaru Y., Doi R.H., Wong S.L. (2002). Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *Journal of bacteriology*. 184:76–81.
- Nevalainen H., Peterson R. (2014). Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much? *Frontiers in Microbiology*. 75:1-10.
- Ongley S.E., Bian X., Neilan B.A., Muller R. (2013). Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. RSC publishing. *Natural Product Reports*.
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M., McCarthy I., Del Rio L.A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:521-530.
- Parachin N.S., Siqueira S., De Faria F.P., Goncalves F.A.T., Pepe L.M.D.M. (2009). Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYNI in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 59:52–57.
- Petsch D., Anspach F.B. (2000). Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology*. 76:97–119.
- Phillips T.A., Van Bogelen R.A., Neidhardt F.C. (1984). *Ion* gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *Journal of bacteriology*. 159:283–287.
- Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67: 577-591.
- Ruanglek V., Sriprang R., Ratanaphan N., Tirawongsaroj P., Chantasigh D., Tanapongpipat S., Pootanakit K., Eurwilaichitr L. (2007). Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4-_-xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 41:19-25.
- Sabotic J., Kos J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:1351-1375.
- Salles B.C., Te’o V.S.J., Gibbs M.D., Bergquist P.L., Filho E.X.F., Ximenes E.A., Nevalainen K.M.H. (2007). Identification of two novel xylanase-encoding genes (xyn5 and xyn6) from *Acrophialophora nainiana* and heterologous expression of xyn6 in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Letters*. 29:1195-1201.
- Schoen C., Reichard Y.U., Monodz M., Kratzin H.D., y Ruè Chel R. (2002). Molecular cloning of an extracellular aspartic proteinase from *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during infection. *Medical Mycology*. 40: 61-71.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C., Van Dijck P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:426-435.
- Sharma M., Kumar A. (2013). Xylanases: An overview. *British Biotechnology Journal*. 3:1-28.

- Sorensen H.P., Mortensen K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal Biotechnology*. 115:113–128.
- Subramaniyan S., Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases. *Enzymology, Molecular Biology and Application. Critical Reviews in Biotechnology*. 22:33–64.
- Sunna A., Antranikian G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 17:39-67.
- Takenaka S., Umeda M., Senba H., Koyama D., Tanaka K., Yoshida K., Doi M. (2017). Heterologous expression and characterisation the *Aspergillus* aspartic protease involved in the hydrolysis and decolorisation of red-pigment proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97: 95-101.
- Terpe K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:211–222.
- Van-Khue T., Rajini R. (2004). Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca²⁺ signaling and Ca²⁺-transporting ATPases. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 287: 580–589.
- Ward O. (2012). Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 30: 1119–1139.
- Westers L., Westers H., Quax W.J. (2004). *Bacillus subtilis* as a cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1694:299–310.
- Wong K.K.Y., Tan L.U.L., Saddler J.N. (1988). Multiplicity xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiological Reviews*. 52: 305-317.
- Yamashita I., Hirata D., Machida M., Fukui S. (1986). Cloning and Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the Secretable Acid Protease Gene from *Saccharomycopsis jibuligera*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 50:109-113.
- Yang X., Cong H., Jinzhu C., Zhang J. (2013). Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29:2087–2094.
- Yegin S., Fernandez-Lahore M. (2013). A Thermolabile Aspartic Proteinase from *Mucor mucedo* DSM 809: Gene Identification, Cloning, and Functional Expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*. 54:661–672.
- Zhou C., Bai J., Deng S., Wang J., Zhu J., Wu M., Wang W. (2008). Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usarii* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 99:831–838.

La metagenómica y bioinformática; Descubriendo los secretos de la ecología microbiana

Metagenomics and bioinformatics; Discovering the secrets of microbial ecology

CASTILLO-ORTEGA, Laura Sofía¹, MOLINA-VEGA, Aracely¹, OLIVARES-GARCÍA Erika Dulce¹, SEGOVIA-CRUZ, Jesús Alberto¹, AGUIRRE-VAN-WOBESER, Eneas²

¹*Universidad Politécnica de Pachuca, Carretera Pachuca -Ciudad Sahagún Km. 20, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, 43830 Zempoala, Hidalgo, México*

²*Cátedras CONACyT/Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México*

ID 1^{er} Autor: *Laura Sofía, Castillo-Ortega* / **ORC ID:** 0000-0003-0640-9248, **Researcher ID Thomson:** V-5596-2018, **CVU CONACYT ID:** 561356

ID 1^{er} Coautor: *Aracely, Molina-Vega* / **ORC ID:** 0000-0002-3450-4253, **Researcher ID Thomson:** V-5544-2018, **CVU CONACYT ID:** 858301

ID 2^{do} Coautor: *Erika Dulce, Olivares-García* / **ORC ID:** 0000-0003-3379-556X, **Researcher ID Thomson:** V-5674-2018, **CVU CONACYT ID:** 858686

ID 3^{er} Coautor: *Jesús Alberto, Segovia-Cruz* / **ORC ID:** 0000-0002-4266-453X, **Researcher ID Thomson:** V-5734-2018, **CVU CONACYT ID:** 735424

ID 4^{to} Coautor: *Eneas, Aguirre-Van-Wobeser* / **ORC ID:** 0000-0002-5604-0525, **CVU CONACYT ID:** 38634

S. Castillo, A. Molina, E. Olivares, J. Segovia y E. Aguirre

lsco_01@micorreo.upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

With the progress of the new generation sequencing (NGS), nowadays it is possible to study the structure of the microbial communities and estimate the diversity of microorganisms present in the ecosystem, as well as to propose the possible interactions that take place in this community. In this review we briefly explain the importance of metagenomics application, for the description of microbiomes, highlighting its importance for the study of the microbial community structure and the estimation of the bacterial diversity in diverse ecological environments, such as: the intestine of parasitic insects of *Agave* spp, rhizospheric soil of milpas and parasitized wood decay for the *Trametes* fungi, as well as sediments and hot spring in Geysers of Tecozautla in the State of Hidalgo.

Bacterial Diversity, Insect, Milpas, Thermophiles, Wood in Decomposition

Introducción

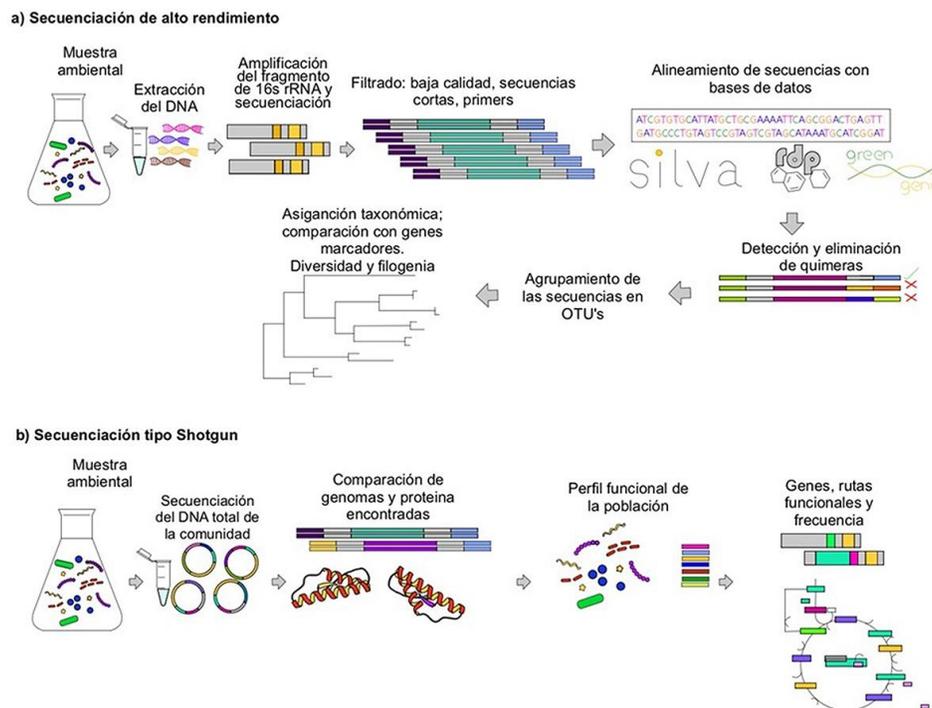
Uno de los grandes retos de la Biología ha sido estudiar la estructura poblacional y la diversidad de los microorganismos presentes en cualquier ambiente, esto con el fin de entender las relaciones biológicas y los procesos metabólicos que ahí se presentan. En un principio, la identificación de los microorganismos dependía del cultivo *in vitro* y su posterior identificación (microorganismos dependientes de cultivo). Con el auge de las técnicas de biología molecular y el desarrollo del método Sanger para la secuenciación de DNA (Sanger *et al.*, 1977), se logró primeramente la identificación de microorganismos utilizando genes marcadores y posteriormente genomas completos (Alcaraz *et al.*, 2008; Warren *et al.*, 2008).

Se estima que el porcentaje de microorganismos dependientes de cultivo estudiados radica entre el 1 y 3% del total de los microorganismos presentes en cualquier ambiente (Whitman *et al.*, 1998). El 97% restante de los microorganismos se consideran aún no cultivables, debido a que poseen exigencias nutricionales especiales difíciles de reproducir en el laboratorio, por lo tanto, su estudio depende únicamente del análisis de DNA (Handelsman, 2004). En años recientes, con la secuenciación masiva surge la metagenómica, definida como el análisis genómico del DNA colectivo de los microorganismos dentro de un ambiente, independientemente si pueden ser cultivados o no, enfocándose en la recopilación de información genética a través de las secuencias de DNA (Neethu *et al.*, 2010; Forbes *et al.*, 2017), dejando de lado al organismo en su forma individual, para centrarse en los genes de una comunidad y cómo su presencia influye en las actividades de los demás. Junto con la metagenómica, también se desarrollan métodos computacionales y bases de datos para la comprensión de la composición genética y de las actividades de las comunidades microbianas que, al ser tan complejas, no han sido completamente caracterizadas (Demain & Adrio, 2008).

Dentro de las técnicas de metagenómica se pueden describir dos vertientes. En la primera, se utiliza secuenciación de alto rendimiento que permite inferir la diversidad microbiana mediante análisis de marcadores genéticos, que nos sirven como indicadores de la presencia de microorganismos. Los más utilizados son: 16S rDNA para procariotas e ITS y/o 18S rDNA para hongos (Jansson & Hofmockel, 2018). Las secuencias obtenidas se analizan bioinformáticamente para conocer la diversidad en un ambiente (*alfa* diversidad), así como para hacer comparaciones entre ambientes o condiciones de muestreo diferentes (*beta* diversidad). La identificación taxonómica de las secuencias se logra mediante la comparación con bases de datos que contienen grandes números de secuencias del mismo marcador, muchas de las cuales se encuentran ya identificadas. Ejemplos de dichas bases de datos son SILVA, NCBI, *Greengenes* y *Ribosomal Database Project* (Quast *et al.*, 2013).

La segunda vertiente es la metagenómica funcional, donde se realiza la secuenciación masiva del DNA extraído de la muestra, con el fin de lograr la mayor cantidad de genomas completos de los microorganismos presentes, que posteriormente, con la ayuda de software y la comparación de las secuencias con bases de datos, se hace inferencia sobre las características metabólicas de los microorganismos, así como las funciones que realizan en el ambiente (Figura 3.1) (Hugenholtz, 2002; Rappe & Geovanni, 2003; Hernández-León *et al.*, 2010).

Figura 3.1 Flujo de trabajo para los análisis metagenómicos; a) secuenciación de alto rendimiento; b) secuenciación tipo shotgun



Con el impacto de la metagenómica, se han desarrollado técnicas novedosas para la obtención de miles de secuencias de fragmentos de DNA conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés). Con la aplicación de estas técnicas es posible responder a preguntas fundamentales de ecología microbiana, que además en muchos casos involucran la relación ecológica microorganismo-huésped (Handelsman, 2004; Riesenfeld *et al.*, 2004, Taylor *et al.*, 2007; Brinkmann *et al.*, 2017; Choudhari *et al.*, 2017). Entonces, la metagenómica ofrece un camino para el estudio de comunidades microbianas enteras, que permite inferir en la composición filogenética, conocer la diversidad de especies y su capacidad metabólica (Neethu *et al.*, 2010; Choudhari *et al.*, 2017). A continuación, se describe el uso de la metagenómica para conocer la diversidad bacteriana en diferentes ecosistemas.

La metagenómica en el estudio del microbioma de los insectos

Los insectos representan uno de los grupos más diversos de organismos en el planeta, capaces de adaptarse a condiciones ambientales extremadamente diversas. En particular, los insectos herbívoros pueden habitar y alimentarse de una amplia gama de especies vegetales y así participar en una gran variedad de interacciones con microorganismos (Despres *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2013). Entre las principales relaciones insecto-microorganismo se pueden describir las relaciones benéficas como las nutricionales o de defensa, proporcionados por los simbioses a sus anfitriones. Además, al establecer relaciones mutualistas, los microorganismos facilitan al huésped la obtención de nutrientes como aminoácidos y vitaminas, secretan enzimas digestivas que ayudan a la degradación de los complejos dietéticos o la desintoxicación de metabolitos secundarios nocivos (Douglas, 2009; Berasategui *et al.*, 2016). En interacciones de defensa, los microorganismos protegen a su anfitrión contra patógenos, parásitos, parasitoides o depredadores, a menudo a través de la producción de compuestos antimicrobianos o toxinas (Flórez *et al.*, 2015; Berasategui *et al.*, 2016).

Shi *et al.*, en 2013 realizaron el análisis comparativo del metagenoma de los simbioses intestinales en saltamontes, gusanos cortadores y termitas, revelando diferencias entre las tres especies de insectos en la abundancia y la composición taxonómica de las poblaciones de bacterias simbioses presentes en el intestino. Sin embargo, a pesar de las diferencias estructurales de estas comunidades microbianas, comparten la característica de degradar y utilizar los diferentes tipos de alimentos o sustratos consumidos por sus huéspedes, principalmente los residuos vegetales (Shi *et al.*, 2013).

Las principales procariotas encontradas en el intestino de estos insectos están asociadas a grupos bacterianos de espiroquetas y *Fibrobacter* que a su vez se caracterizan por la producción de enzimas que hidrolizan celulosa y xilano (Warnecke *et al.*, 2007). Así mismo Russella *et al.*, (2009) encontró que algunos de los microorganismos simbióticos del intestino de las hormigas están relacionados con el consumo de plantas como alimento, de los cuales destaca la presencia de bacterias de tipo *Rhizobiales* (Russella *et al.*, 2009). Los lepidópteros constituyen el segundo orden de insectos más diverso. Algunos de ellos son considerados como plagas agrícolas, como *Acanthoscelides obtectus* (Gorgojo del frijol), *Acrobasis nuxvorella* Neunzig (Gusano barrenador de la nuez), *Aculops lycopersici* (Ácaro del bronceado del tomate), *Agrotis ipsilon* (Gusano cortador), *Aleurocanthus woglumi* Ashby (Mosca negra de los cítricos), *Anastrepha ludens* (Mosca mexicana de la fruta), *Anthonomus eugenii* Cano (Picudo del chile).

De estos insectos, la mayoría de las investigaciones se centran en su efecto fitopatógeno, pero poco se sabe acerca de los géneros bacterianos asociados a diferentes partes anatómicas de ellos. Es un hecho, que las bacterias juegan un papel fundamental en la biología de ellos. Estudios indican que el hábitat, la planta sustrato y la edad del insecto huésped pueden tener un gran impacto en el microbioma intestinal (Paniagua *et al.*, 2018). El microbioma intestinal de los lepidópteros se ve afectado a lo largo del ciclo de vida del insecto, como es el caso de *Spodoptera littoralis*, en estadios tempranos en el intestino predominan géneros de bacterias como *Enterococcus*, *Pantoea* y *Citrobacter*, mientras que *Clostridia* aumenta su población en la última etapa de metamorfosis del insecto. Curiosamente, solo los *Enterococos* persistieron a través de la metamorfosis, algunas otras bacterias como *Proteobacterias* y *Firmicutes* se mantienen junto con el insecto durante toda su vida. Además, se hizo la comparación entre machos y hembras, resaltando que para el caso de las hembras adultas estas albergan altas proporciones de *Enterococcus*, *Klebsiella* y *Pantoea*, mientras que los machos albergan mayormente *Klebsiella* (Bosheng *et al.*, 2016).

En los últimos años el interés por los insectos como alimento humano se ha ampliado, debido a su alto valor nutricional (FAO, 2013). En el estado de Hidalgo se cuenta con una amplia variedad de insectos comestibles, incluyendo las plagas comestibles del *Agave*, el gusano rojo (*Comadia redtenbacheri*) y gusano blanco (*Acetrocneme hesperiaris*). Estas dos especies tienen características biológicas y gastronómicas diferentes, pero ambas son ampliamente apreciadas debido a su exquisito sabor. El consumo de estos gusanos es considerado una tradición ancestral (Ramos-Elorduy *et al.*, 2011). Por lo general, se consumen fritos o asados, condimentando una salsa picante y servido en una tortilla (FAO, 2013). El gusano blanco (Figura 3.2b) de *Agave* parasita las hojas carnosas grandes de *A. atrovirens* Karw., *A. salmiana*, *Otto ex Salm*, *A. mapisaga* Trel, *A. lehmanni*. *Jacobi*, *A. maximiliana*, *Baker*. *A. americana*. Debido al tamaño de las larvas, estas, se encuentran distribuidos en diferentes hojas del *Agave* (Ramos-Elorduy, 2006). El gusano rojo de *Agave* (Figura 3.2a), parásita el tallo de *A. atrovirens* *K. ex SD*, *A salmiana O ex SD*, *A mapisaga T*, creando una colonia de 40 a 60 gusanos ubicados en la unión con las hojas carnosas, por lo que el tallo y las hojas deben ser eliminados durante la recolección, causando la muerte del *Agave*. Las larvas se encuentran en la misma etapa y tienen aproximadamente el mismo tamaño, ya que provienen de la misma ovoposición. Estas larvas también se usan para darle una mejor presentación al mezcal, adicionando un gusano en la botella o como sal de gusano (Hernández *et al.*, 2005, Ramos-Elorduy, 2006).

Figura 3.2 Lepidópteros que habita *Agave* sp. **a)** *Comadia redtenbacheri*. **b)** *Acetrocneme hesperiaris*.



Debido a su importancia en la gastronomía mexicana, (Llenderal-Cázares *et al.*, 2017), estudios describen al gusano rojo como un barrenador de *Agaves* con un ciclo de vida largo. Los estudios del microbiota del gusano blanco se han limitado al aislamiento del microbiota cultivable externa e interna que compara diferentes modos de crianza (Hernández-Flores *et al.*, 2015).

De esta forma, se demostró una mayor diversidad de bacterias en las larvas obtenidas de productores que en las obtenidas directamente de plantas de maguey en la naturaleza. En el caso de gusano blanco, no se cuenta con estudios científicos que describan las comunidades bacterianas asociadas a este insecto. Considerando la importancia gastronómica y cultural, el creciente interés por el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y tomando en cuenta la trascendencia de las bacterias simbiotas en insectos, es adecuado realizar un análisis metagenómico del microbioma intestinal de estos gusanos, utilizando técnicas independientes de cultivos para obtener resultados sobre la diversidad bacteriana intestinal.

La metagenómica en el análisis de diversidad bacteriana en milpas tradicionales

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, su territorio alberga dos regiones biogeográficas (neártica y neotropical) y un elevado número de endemismos, por lo que posee gran variedad de ecosistemas y variación genética en las especies que los habitan (Plascencia *et al.*, 2011). Así mismo, México fue uno de los centros de desarrollo de la agricultura hace 10,000 años (Ranere *et al.*, 2009), de manera que muchas de las plantas domesticadas son originarias de este país (Plascencia *et al.*, 2011); como la calabaza (*Cucurbita argyrosperma* Huber), el maíz (*Zea mays*) y varios cultivos arbóreos como jobo (*Spondias purpurea*), huaje (distintas especies del género *Leucaena*) y aguacate (*Persea* spp.), por mencionar algunos. Posiblemente, de los cultivos desarrollados en México, el maíz es el de mayor importancia, siendo la base de la alimentación de millones de personas a nivel mundial, particularmente en el continente americano (Ranere *et al.*, 2009).

El maíz fue domesticado a partir su ancestro silvestre *el teocintle*, hace aproximadamente 9,000 años, en la región suroeste del país desde donde se expandió hacia todo el continente (Matsuoka *et al.*, 2002; Ranere *et al.*, 2009). Las antiguas civilizaciones mayas, aztecas y olmecas de México, basaban su dieta en el maíz y era su cultivo más venerado. Hoy en día, el maíz forma parte en la vida, historia y tradición, por lo que representa parte de la identidad de los mexicanos (O'Leary, 2016).

Los antiguos agricultores influyeron en la evolución del maíz, dando lugar a una serie de sistemas agrícolas muy variados. Estas prácticas agrícolas tradicionales son resultado de procesos co-evolutivos entre sistemas sociales y ecológicos, donde las variedades locales están adaptadas a condiciones ecológicas, climáticas, y a las necesidades culturales de las comunidades que las realizan (Asturias, 2004).

La milpa es un sistema surgido en Mesoamérica (Lozada-Aranda *et al.*, 2017), que constituye un espacio dinámico de recursos genéticos, con interacción de la diversidad biológica y cultural. Se caracteriza por ser un cultivo donde coexisten diferentes tipos de maíz, y plantas como el frijol, calabaza, chile, tomate y otras plantas particulares de las diferentes zonas del país (Figura 3.3), que se usan según la temporada o tradiciones culturales específicas (Eguiarte *et al.*, 2017; Linares & Bye, 2011).

La diversidad de cultivos dentro de la milpa depende de cada región, no sólo por el clima, pendiente o tipo suelo, sino por el grupo humano asociado a ella que, de acuerdo con sus necesidades, conocimientos y tradiciones conforman milpas únicas (Lozada-Aranda *et al.*, 2017). Esta diversidad vegetal, con el resto de la comunidad biológica, incluyendo sus microorganismos asociados, forman el agroecosistema de milpa, el cual ha sido desarrollado y ha evolucionado durante miles de años gracias a las actividades de nuestros ancestros (Eguiarte *et al.*, 2017).

Figura 3.3 Milpa tradicional de maíz y frijol. Comunidad de Santo Domingo, Tepoztlán, Morelos, México



La interacción de una gran cantidad de especies convierte a la milpa en un ecosistema donde se aprovechan de manera complementaria sus diferentes recursos. En este ecosistema se favorecen interacciones ecológicas benéficas (control biológico de insectos, fertilidad del suelo y polinización), favoreciendo no solo a las especies que en ella conviven sino a las comunidades humanas que las manejan, dado que los productos que de ahí se obtienen, ya que forman parte de dieta diaria en algunas regiones del país siendo la base de su alimentación. La milpa alberga una increíble diversidad microbiana con miles de adaptaciones y genes novedosos que representan posibles aplicaciones médicas, agronómicas y biotecnológicas (Eguiarte *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta los valores de la milpa, es interesante investigar la microbiota asociada que puede ser la base de una agricultura libre de agroquímicos y sostenible. Sin embargo, la estructura y la diversidad de las comunidades bacterianas asociadas, ha sido poco estudiada (Rebollar *et al.*, 2017).

Los microorganismos del suelo tienen una participación importante en los procesos ecosistémicos como formación de suelo, crecimiento de las plantas, y los ciclos biogeoquímicos, y comprenden una gran parte de la diversidad genética en la Tierra (Van Der Heijden *et al.*, 2008). El microbioma que participa en la fisiología y desarrollo de las plantas se encuentra particularmente en la rizosfera. Entre estos microorganismos benéficos para las plantas podemos encontrar a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), fijadoras del nitrógeno, solubilizadoras de fosfato, y cepas con actividad de biocontrol de plagas, por mencionar algunas (Hernández *et al.*, 2003).

Los estudios de secuenciación de alto rendimiento permiten conocer la composición y diversidad microbiana del suelo en una variedad de hábitats sin la necesidad de cultivo (Jansson y Hofmockel, 2018). En este sentido, Vogel *et al.*, en el 2009 proponen que el suelo sea la próxima iniciativa global de secuenciación metagenómica, ya que representaría un gran valor económico y ambiental, debido a la diversidad de vías y genes que podrían participar en procesos de biodegradación de contaminantes, síntesis de biocombustibles y producción de nuevos fármacos, además de proporcionar información sobre la ecología de los microorganismos que son benéficos o perjudiciales en la producción de cultivos. De esta manera, actualmente la metagenómica del suelo se ha planteado como una herramienta para la agricultura sostenible (Goel *et al.*, 2017).

Se han realizado varias investigaciones en el área de la microbiología asociada a la agricultura. En los últimos años se determinó en cultivos de maíz, la presencia de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Lysobacter* formando parte de la comunidad microbiana de la rizosfera del cultivo, constituyendo *Pseudomonas* el género dominante. Se ha determinado que distintas cepas de *Pseudomonas*, *Lysobacter* y *Streptomyces* favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Hernández *et al.*, 2003; García-Salamanca *et al.*, 2013).

Otros estudios en leguminosas han determinado que algunas bacterias del orden *Rhizobiales*, así como algunos miembros de *Betaproteobacteria* (Burkholderiales) forman nódulos en las raíces, dentro de las cuales convierten el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_3) disponible, a cambio de compuestos de carbono liberados por la planta. Algunas plantas, como Alder (*Alnus* spp.) y Casuarina (*Casuarina* spp.), forman nódulos en asociación con actinobacterias fijadoras de N_2 del género *Frankia*, también varias bacterias de vida libre y endófitas (p. Ej., *Azotobacteraceae*, *Cyanobacterias*), pueden fijar cantidades significativas de N_2 (Tkacz y Poole, 2015).

En otros estudios en calabaza (*Cucurbita* sp.), se han determinado microbiomas dominantes de *Enterobacteriaceae*, donde *Lysobacter*, *Paenibacillus* y *Lactococcus* son importantes para el mantenimiento de la salud de la planta (Adam *et al.*, 2018). En estudios de cultivos como el maíz se ha encontrado, que la diversidad microbiana está asociada con el tipo de suelo y las prácticas de cultivo (Peiffer *et al.*, 2013). Los estudios de diversidad bacteriana para suelos agrícolas se han centrado principalmente en la caracterización de comunidades microbianas evaluadas en un solo punto de tiempo y principalmente en monocultivos. Sin embargo, los policultivos, como la milpa son muy importantes debido a su papel central en el desarrollo de la agricultura sostenible (Rebollar *et al.*, 2017).

Con lo antes mencionado, se destaca que la milpa es un sistema agrícola ancestral, en donde el cultivo del maíz se complementa con el de otras especies de valor alimenticio y/o medicinal. Esta diversidad vegetal, a su vez atrae una alta diversidad de otros organismos, por lo que las milpas son consideradas agroecosistemas, en los cuales las plantas influyen el suelo por afectar las concentraciones de nutrientes, exudar compuestos orgánicos, promover el crecimiento de microorganismos benéficos e inhibir el crecimiento de otros potencialmente dañinos.

Las interacciones entre los componentes de la milpa, incluyendo el suelo, la vegetación y las bacterias, podrían tener beneficios para la productividad agrícola de estos sistemas, por lo que es esencial entender la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo de la milpa a lo largo del ciclo de producción agrícola. Para ello, se hace uso de herramientas bioinformáticas que permitan analizar el DNA metagenómico de muestras de rizosfera en milpas, para examinar los cambios en la estructura y diversidad de las comunidades bacterianas a lo largo de ciclos agrícolas, mediante la secuenciación de alto rendimiento de los amplicones del gen 16S rDNA.

La metagenómica para el estudio de la biodiversidad termófila del géiser de Tecozautla e identificación de microorganismos con posible aplicación biotecnológica

Los microorganismos extremófilos son organismos adaptados para crecer bajo condiciones que, desde una perspectiva humana, son hostiles y donde otros organismos no sobreviven. La resistencia de los organismos a tales ambientes se debe principalmente a sus características estructurales y fisiológicas que les permiten resistir a estas condiciones extremadamente selectivas.

Estas propiedades se deben a biomoléculas específicas incluyendo lípidos, enzimas, osmolitos, polímeros y aminoácidos (de Champdoré *et al.*, 2007; Aerts *et al.*, 2014). Se consideran ambientes extremos: manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, suelos y mares polares fríos, así como glaciares alpinos, lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos.

Dependiendo del ambiente los organismos se clasifican como: acidófilos, alcalófilos, psicrófilos, halófilos, barófilos, xerófilos, osmófilos, oligotróficos y los termófilos, que se caracterizan por tener un crecimiento óptimo a temperaturas de entre 45 y 80 °C. Además de éstos se conocen a los hipertermófilos que tienen temperaturas de crecimiento óptimo a ≥ 80 °C con capacidad de crecer a ≥ 90 °C. Por último, se denominan extremotolerantes y extremoresistentes, a aquellos microorganismos que pueden tolerar valores extremos de uno o más parámetros fisicoquímicos, aunque crecen de manera óptima en condiciones "normales", por ejemplo, los metalotolerantes, radioresistentes y toxicotolerantes (Canganella y Wiegel, 2014; Rampelotto, 2016).

La importancia de los microorganismos extremófilos destaca en las diversas aplicaciones que podrían tener sus enzimas, las cuales se utilizarían en el desarrollo de bioprocesos industriales, enfocándose en la industria del papel, curtido de pieles, detergentes, textiles, productos farmacéuticos, químicos, alimentos, bebidas, biocombustibles, alimentación animal y cuidado personal, entre otros (Adrio y Demain, 2014).

Desde el descubrimiento pionero de Thomas Brock de microorganismos en las aguas termales del Parque Nacional de Yellowstone, Wyoming en la década de 1960, se han descubierto organismos termófilos, hipertermófilos y arqueas. Estas a su vez, se encontraron en formas planctónicas, como células dispersas en los fluidos geotérmicos, biofilms y biomats en las superficies y dentro de los depósitos minerales (Brock, 1967; Jahnke *et al.*, 2001).

Una de las aplicaciones más importantes de los organismos extremófilos ha sido la *Taq* polimerasa, aislada de *Thermus aquaticus*, que tiene su principal aplicación en la reacción en cadena de la polimerasa mejor conocida como PCR. Esta reacción permite la amplificación de fragmentos de DNA en pocas horas. Actualmente, esta enzima se obtiene por expresión heteróloga en la bacteria *Escherichia coli* (Lawyer *et al.*, 1993).

La diversidad microbiana y las técnicas moleculares modernas, como la metagenómica, ha permitido caracterizar la microbiota de ambientes termófilos. Por ejemplo, en estudios recientes en la fuente termal de Sungai Klah en Malasia (50-110 °C) se pudieron encontrar predominantemente los filos de *Aquificae*, *Thermotogae*, *Ignavibacteriae*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes*, *Thermodesulfobacteria*, *Acidobacteria*, *Euryarchaeota*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi*.

Al hacer el análisis de la diversidad microbiana de la fuente termal de Siloam Sudáfrica (63°C) se encontró una similitud en filas, incluyendo *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Chloroflexi*, con la presencia adicional de *Firmicutes*. En el caso de la identificación de genes que codifican para enzimas novedosas mediante NGS se han identificado enzimas tales como: lipasas, xilanasas, celulasas, endoxilanasas, β -galactosidasas, β -xilosidasas/ α -arabinofuranosidasas, β -pectinasas, α -fucosidasas, fitasas, nitrilasas y polimerasas, entre muchas otras que toleran o soportan condiciones extremas (Tekere *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2015; De Castro *et al.*, 2016).

Hoy en día existe la necesidad de nuevas enzimas, mejoradas o más versátiles para desarrollar procesos de producción más novedosos, sostenibles y económicamente competitivos. Las investigaciones que se han llevado a cabo en ambientes termófilos nos demuestran que están presentes los tres reinos de la vida y aunque se han hecho avances importantes, aún se siguen descubriendo nuevas especies que contribuyen a dilucidar la gran diversidad microbiana del planeta; (De Castro *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta todo lo anterior, es importante realizar el análisis metagenómico de diversos ambientes extremos. En el estado de Hidalgo, México, existe un géiser en el municipio de Tecozautla (Figura 3.4) donde brota agua azufrada y alcalina a 95 °C. Por lo que estudios metagenómicos basados en la secuenciación 16S rDNA son necesarios para analizar, comprender y describir la diversidad y estructura poblacional, así como las vías metabólicas utilizadas en estos ambientes, lo que biotecnológicamente nos permitirá posiblemente descubrir nuevos productos con aplicación industrial (Lewin *et al.*, 2013).

Figura 3.4 Géiser de Tecozautla, Hgo



Metagenómica en el estudio de las comunidades bacterianas asociadas a la degradación de madera en descomposición

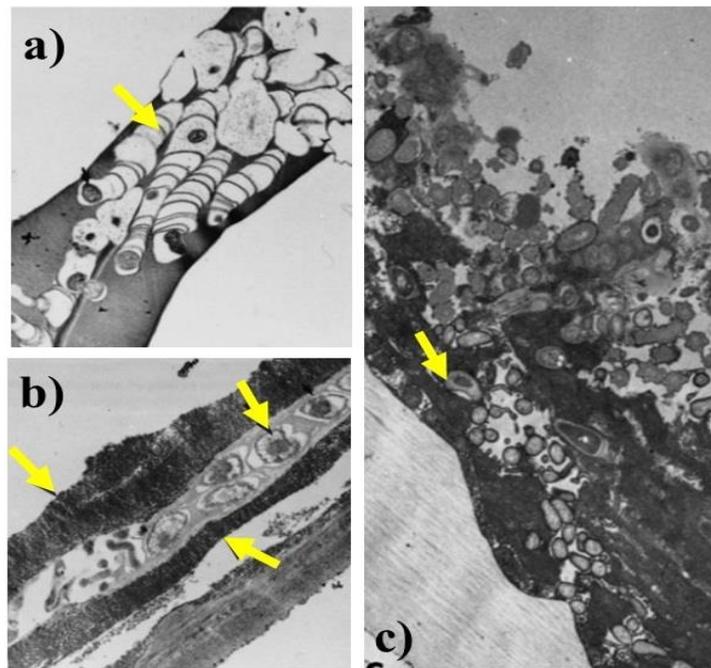
El 30 % de la superficie terrestre se encuentra cubierta por bosques (Keenan *et al.*, 2015), donde se albergan alrededor de 73 billones de toneladas de carbono, formando parte de la madera muerta (Pan *et al.*, 2011). El carbono se reincorpora a su ciclo biogeoquímico, gracias a la acción de organismos saprofiticos que se encargan de degradar los polímeros de lignina, celulosa y hemicelulosa (Clausen, 1996; Arantes *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Hervé *et al.*, 2013). La mayoría de las investigaciones sobre degradación de madera se centran en los hongos, clasificados de acuerdo con el tipo de pudrición que provocan, las cuales se han caracterizado como podredumbre blanca, blanda o marrón (Hattaka, 2001; Morgenstern *et al.*, 2008). Los hongos son considerados como los degradadores primarios de los componentes de la madera, gracias a la producción de enzimas que actúan sobre los polímeros de carbono (Arantes *et al.*, 2011; Hervé *et al.*, 2013). Sin embargo, durante los procesos de degradación, estos necesitan de la presencia de bacterias, con las cuales establecen relaciones simbióticas y mutualistas que le permitan desarrollarse, colonizar y degradar la madera en descomposición.

Dentro de las interacciones bacteria-hongo, se encuentra el cleptoparasitismo, fenómeno por el cual las bacterias remueven los compuestos aromáticos generados por la degradación fúngica de la madera (Seigle-Murandi *et al.*, 2000). Así mismo, las bacterias son capaces de producir vitaminas y realizar la fijación de nitrógeno para que el hongo pueda asimilarlo fácilmente (Hoppe *et al.*, 2014; Weißhaupt *et al.*, 2011). Algunas bacterias también son capaces de realizar micofagia, ya que se alimentan de los hongos, sin llegar a matarlo, es decir, se encuentran viviendo parásitamente de ellos (Leveau y Preston, 2008; Johnston *et al.*, 2016).

Trabajos de investigación han demostraron que, en ausencia de bacterias, los hongos desarrollan menor cantidad de biomasa, comparado con el crecimiento acompañado de bacterias (Blanchette y Shaw, 1978). De la misma manera, se ha evidenciado que algunas bacterias necesitan de los hongos para sobrevivir. *Burkholderia cepacia* es una bacteria que presenta mayor crecimiento cuando el micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* está presente (Yara *et al.*, 2006). Aunque se ha comprobado la importancia de las bacterias durante el proceso de degradación de la madera, el número de investigaciones enfocadas en estos microorganismos es menor en comparación con las investigaciones que se han realizado en hongos. Las bacterias son los primeros microorganismos en comenzar el proceso de degradación, acondicionan el medio para que los hongos lleguen y se establezcan (Greaves, 1971; Van der Wal *et al.*, 2007). El medio por el cual las bacterias colonizan a la madera no es de todo claro, por lo que se considera que éstas pueden proceder del aire, del agua, del suelo o de la madera misma (Green y Bohannan, 2006; Van der Wal *et al.*, 2007; Folman *et al.*, 2008; Hervé *et al.*, 2013; Johnston *et al.*, 2016), o son arrastradas por organismos que colonizan la madera como hifas de hongos o por los insectos (Greaves, 1971; Blanchette y Shaw, 1978).

Las bacterias también son capaces de degradar los polímeros que forman la madera. Se han caracterizado bacterias con la capacidad de descomposición de la lignina y celulosa (Bugg *et al.*, 2011; Brown y Chang, 2014; Johnston *et al.*, 2016; Lladó *et al.*, 2016). Las lesiones causadas a la madera por las bacterias se pueden observar como túneles, cavitaciones o como la erosión en la superficie de los troncos (Figura 3.5) (Kim y Singh, 2010). Las bacterias tienen menor capacidad para degradar la madera en descomposición en comparación con la actividad degradadora de los hongos que crecen en forma micelial sobre la madera (Greaves, 1971; Clausen, 1996). No obstante, se considera que las bacterias poseen medios no caracterizados de metabolizar los polímeros de madera, pues de manera particular, en las bacterias no se han encontrado enzimas habituales para la degradación de celulosa (López-Mondéjar *et al.*, 2016; Johnston *et al.*, 2016). Otra característica importante de algunas cepas bacterianas es la degradación de pectina, permitiendo el acceso a los polímeros de celulosa (Clausen, 1996; Lynd *et al.*, 2002).

Figura 3.5 Lesiones de la madera causada por bacterias a) túneles; b) cavitaciones; c) erosión



Fuente: (Modificado Kim y Singh, 2010)

La presencia de los hongos modifica notablemente las poblaciones bacterianas. Por ejemplo, en cultivo *in vitro* de madera inoculados con el hongo de la podredumbre blanca *Hypholoma fasciculare*, se observó que la presencia del hongo puede alterar la abundancia y la composición de las comunidades bacterianas (de Boer *et al.*, 2010; Folman *et al.*, 2008; Valásková *et al.*, 2009). Otros factores que afectan la estructura de la diversidad bacteriana es el tipo de árbol, el contenido de agua, el pH y la relación C-N (Folman *et al.*, 2008, Hoppe *et al.*, 2014). En un principio, el estudio de las relaciones bacteria-hongo consistían en la aplicación de técnicas de microbiología tradicional.

Actualmente, con el uso de las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), se ha logrado un estudio más amplio de los *phylas* de bacterias presentes en la madera en descomposición. Estudios de metagenómica realizados en arboles de *Fagus sylvatica*, *Picea abies*, *Betula sp.*, *Pinus sylvestris*, *Keteleeria ecelynniana* a diferentes estados de pudrición se encontraron principalmente los clases de *Alpha*, *Beta*, *gamma* y *Delta proteobacteria*, así como en los *phyla Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Zhang *et al.*, 2008; Folman *et al.*, 2008; Hervé *et al.*, 2013; Hoppe *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Hoppe *et al.*, 2015; Kielak *et al.*, 2016; Rintha-Kanto *et al.*, 2016; Johnston *et al.*, 2016). Gracias a estas técnicas hoy en día se conocen un gran número de bacterias tanto cultivables y no cultivables que habitan la madera, lo que permite además hacer inferencias acerca de los procesos metabólicos que se llevan a cabo en el proceso de la podredumbre de la madera en descomposición. Sin embargo, aún falta enfocar las investigaciones en dilucidar las rutas metabólicas que involucren la relación hongo-bacteria para degradación de la madera en descomposición.

Para ello, se pueden emplear herramientas *omicas* como la transcriptómica, proteómica o metabolómica, sin mencionar que aún quedan muchos hongos de la podredumbre por estudiar (Johnston *et al.*, 2016). Por ejemplo, en México los bosques templados son el segundo bioma más extenso del país, particularmente en la madera muerta crecen hongos del género *Trametes*, organismo saprófito característico de especies de pudrición blanca, presentes prácticamente en cualquier tipo de ecosistema, el más representativo de este género es *Trametes versicolor*, el cual presenta en su cuerpo fructífero una variada gama de colores (Floudas *et al.*, 2012). Hasta el momento no hay trabajos que apliquen técnicas NGS para describir la relación *Trametes* y las comunidades microbianas asociadas en el proceso de degradación de la madera muerta (Figura 3.6), esta es una potencial razón para generar estudios de metagenómica que nos permita inferir la diversidad y estructura microbiana asociada a este hongo además de analizar comparativamente cambios en su microbioma en diferentes zonas geográficas de la república mexicana.

Figura 3.6 *Trametes* sp. creciendo en madera muerta



Conclusiones

La diversidad de las comunidades microbianas está estrechamente relacionada con el ambiente en el que se encuentran, hasta el momento las investigaciones realizadas en cada uno de los ecosistemas mencionados en este artículo no han permitido la caracterización de la estructura y funcional del microbiota que en ellos habitan. La aplicación de las técnicas de microbiología convencional hoy día no es suficiente para entender lo que ocurre en cada ambiente, es por ello que al utilizar la metagenómica para conocer la diversidad y funcionalidad de las comunidades microbianas se amplía el conocimiento de la estructura, riqueza y funcionalidad de cada ecosistema.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento económico a los becarios: Castillo Ortega Laura Sofía (No. Beca: 486519); Molina Vega Aracely (No. Beca: 489854) Olivares García Erika Dulce (No. Beca:489906); Segovia Cruz Jesús Alberto (No. Beca: 487838)

Referencias

- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., y Berg G. (2018). The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant and Soil*, 422(1-2), 35-49.
- Adrio, J., y Demain, A. (2014). Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, 4(1), 117-139.
- Aerts, J., Röling, W., Elsaesser, A., y Ehrenfreund, P. (2014). Biota and Biomolecules in Extreme Environments on Earth: Implications for Life Detection on Mars. *Life (Basel)*, 4(4), 535-565.
- Alcaraz, L., Olmedo, G., Bonilla, G., Cerritos, R., Hernández, G., Cruz, A., y Herrera-Estrella, L. (2008). The genome of *Bacillus coahuilensis* reveals adaptations essential for survival in the relic of an ancient marine environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5803–5808.
- Arantes, V., Milagres, A., Filley, R., y Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of non enzymatic Fenton-based reactions. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 38(4), 541-55.
- Asturias, M. (2004). Maíz de alimento sagrado a negocio del hambre. Historia e importancia del maíz. (1° ed.) Quito: Red por una América latina libre de transgénicos.
- Bases de datos:
- Silva, Link: <https://www.arb-silva.de/>
 - GreenGene, Link: <https://greengenes.lbl.gov/>
- Berasategui, A., Shukla, S., Salem, H., y Kaltenpoth, M. (2016). Potential applications of insect symbionts in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 1567-77.
- Blanchette, R., y Shaw C. (1978). Associations among bacteria, yeasts and *basidiomycetes* during wood decay. *Phytopathology*, 68(4), 631-637.
- Bosheng Chen, Beng-Soon Teh, Chao Sun, Sirui Hu, Xingmeng Lu, Wilhelm Boland, Yongqi Shao. (2016). Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of the insect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports* 6, Article number: 29505
- Brinkmann, C., Marker, A., y Kurtböke, D. (2017). An overview on marine sponge-symbiotic bacteria as unexhausted sources for natural product discovery. *Diversity*, 9(4), 1-31.
- Brock, T. (1967). Life at high temperatures. *Science*, 230, 132-138.
- Brown, M., y Chang M. (2014). Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology*, 19, 1–7.
- Bugg, T., Ahmad, M., Hardiman E., y Singh R. (2011). The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation 22(3), 394–400.
- Canganella, F., y Wiegel, J. (2014). Anaerobic Thermophiles. *Life (Basel)*, 4(1), 77-104.
- Chan, C., Chan, K., Tay, Y., Chua, Y., y Goh, K. (2015). Diversity of thermophiles in a Malaysian hot spring determined using 16S rRNA and shotgun metagenome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 5(6), 177.
- Choudhari, S., y Grigoriev, A. (2017). Phylogenetic heatmaps highlight composition biases in sequenced reads. *Microorganisms*, 5(1), 4.
- Clausen, C. (1996) Bacterial associations with decayingwood: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37(1-2), 101–7.

- de Boer, W., Folman, L., Gunnewiek, P., Svensson, T., Bastviken, D., Öberg, G., del Rio, J. y Boddy, L. (2010). Mechanism of antibacterial activity of the white-rot fungus *Hypholoma fasciculare* colonizing wood. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(5), 380–8.
- de Champdoré, M., Staiano, M., Rossi, M. y D'Auria, S. (2007). Proteins from extremophiles as stable tools for advanced biotechnological applications of high social interest. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(13), 183–191.
- De Castro, M., Rodríguez-Belmonte, E. y González-Siso, M. (2016). Metagenomics of thermophiles with a focus on discovery of novel thermozymes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1521.
- Demain, A., y Adrio, J. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*. 38(1), 41-55.
- Despres, L., David, J., y Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(6), 298–307.
- Douglas, A. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23(1), 38–47.
- Eguiarte, L., Equihua, Z. y Espinoza A. (2017). La ciencia de la milpa: La milpa es un espejo de la diversidad biológica y cultural de México. *Oikos*, 17, 7-10.
- FAO. (2013). Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security. FAO, Rome, Italy. 12.
- Flórez, L., Biederman, P., Engl, T., y Kaltepoth, M. (2015). Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports*, 32 (7), 904-936.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R., Henrissat, B., Martínez, A., Otiillar, R., Spatafora, J., Yadav, J., Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P., de Vries, R., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Go´recki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Ku´es, U., Kumar, T., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nolan, M., Ohm, R., Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J., St. John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, IV., Hibbett, D., (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 29(336),1715–1719.
- Folman, L., Gunnewiek, P., Boddy, L., y de Boer, W. (2008). Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 181–191.
- Forbes, J. D., Knox, N. C., Ronholm, J., Pagotto, F., y Reimer, A. (2017). Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. *Frontiers in Microbiology*, 8(4), 1069.
- García-Salamanca, A., Molina-Henares, M., van Dillewijn, P., Solano, J., Pizarro-Tobías, P., Roca, A., Duque, E. y Ramos, J.L. (2013). Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. *Microbial Biotechnology*, 6 (1), 36-44.
- Goel, R., Suyal, D., Narayan, D., y Soni, R. (2017). Soil metagenomics: A tool for sustainable agriculture. *Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics*, 217-225.
- Greaves, H. (1971). The bacterial factor in wood decay. *Wood Science and Technology*, 5(1), 6–16.
- Green, J., y Bohannan, B. (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(9), 501-507.

- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 669–685.
- Hattaka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M. and Steinbuchel, A., Eds., *Biopolymers*, Vol. 1: Lignin, Humic Substances and Coal, Wiley-VCH, Weinheim, 129-180.
- Hernández, A., Caballero A., Mabel P., Ramírez R y Heydrich M. (2003). Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays L.*) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(5), 45-55.
- Hernández, L., Llanderal, C., Castillo, M., Valdez, C., y Nieto, H. (2005). Identificación de instares larvales de *Comadia redtenbacheri* (HAMM) (Lepidoptera: Cossidae). *Agrociencia*, 39(5), 539-544.
- Hernández-Flores, Llanderal-Cázares, Guzmán-Franco, y Aranda-Ocampo. (2015). Bacterias presentes en larvas de *Comadia redtenbacheri* (Lepidoptera: Cossidae). *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 1150-1158.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M., y Santoyo, G. (2010). Soil Metagenomics: *new challenges and biotechnological opportunities*. *FYTON*. 79,133-139.
- Hervé, V., Le Roux, X., Uroz, S., Gelhaye, E., y Frey-Klett, P. (2013). Diversity and structure of bacterial communities associated with *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Environmental Microbiology*, 16(7), 2238–52.
- Hoppe, B., Kahl, T., Karasch, P., Wubet, T., Bauhus, J., Buscot, F. y Krüger, D. (2014). Network analysis reveals ecological links between N-Fixing bacteria and wood-decaying fungi. *PLoS One*, 9(2), e91389.
- Hoppe, B., Krüger, K., Kahl, T., Arnstadt, T., Buscot, F., Bauhus, J. y Wubet, T. (2015). A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. *Scientific Reports*, 5(1), 9456.
- Hugenholtz, P. (2002). Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, 3(2).
- Jahnke, L., Eder, W., Huber, R., Hope, J., Hinrichs, K., Hayes, J., Des Marais, J., Cady, S., y Summons, E. (2001). Signature lipids and stable carbon isotope analyses of *Octopus spring* hyperthermophilic communities compared with those of aquificales representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5179-5189.
- Jansson, J., y Hofmockel, K., (2018). The soil microbiome from metagenomics to metaphenomics. *Current Opinion in Microbiology*, 43, 162-168.
- Johnston, S., Boddy, L., y Weightman, A. (2016). Bacteria in decomposing wood and their interactions with wood-decay fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), 179.
- Keenan, R., Reams, G., Achard, F., de Freitas, J., Grainger, A., y Lindquist, E. (2015). Dynamics of global forest area: results from the FAO Global Forest Resources Assessment. *Forest Ecology and Management*, 352(52), 9–20.
- Kielak, A., Scheublin, T., Mendes, L., van Veen, J., y Kuramae, E. (2016). Bacterial community succession in pine-wood decomposition. *Frontiers in Microbiology*, 7(1), 231.
- Kim Y. S. y Singh A. P., Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: a review, *IAWA Journal*. 21(2), 135–155.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., 1 Saiki, S.R., Chang, S., Landre, P.A., Abrarnson, R.D., y Gelfand, D. H. (1993). High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and a Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity. *PCR Methods and Applications*. 2(4), 275-287.

- Leveau, J., y Preston, G. (2008). Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial-fungal interaction. *New Phytol*, 177, 59–76.
- Lewin, A., Wentzel, A., y Valla, S. (2013). Metagenomics of microbial life in extreme temperature environments. *Current Opinion in Biotechnoly*. 24,516–525.
- Linares, E. y Bye, R. (2011). ¡La milpa no sólo es maíz! En *Haciendo milpa: la protección de las semillas y la agricultura campesina*. Edits. Carreón G. A., Cobo O. M. F., Y San Vicente T. A. Universidad Nacional Autónoma de México. 1, 1-91.
- Lladó, S., Zúifcáková, L., Větrovský, T., Eichlerová, I., y Baldrian, P. (2016). Functional screening of abundant bacteria from acidic forest soil indicates the metabolic potential of *Acidobacteria* subdivision 1 for polysaccharide decomposition. *Biology and Fertility of Soils*, 52(2), 251–260.
- Llateral-Cázares, C., Castro-Torres, R., y Miranda-Perkins, K. (2017). Bionomics of *Comadia redtenbacheri* (Hammerschmidt, 1847) (Lepidoptera: Cossidae). *SHILAP Revista de Lepidopterología*, 45(179), 373-383.
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., y Baldrian, P. (2016). Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*, 6, 25279.
- Lozada-Aranda, M., Rojas-Barrera, I., Mastretta-Yanes, A., Ponce-Mendoza, A., Burgeff, C. Orjuela, R., y Oliveros-Galindo, O. (2017). Las milpas de México. *Oikos*, 17,10-13.
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W., y Pretorius S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506–577.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M., Sánchez, G., Buckler, E., y Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *National Academy of Sciences*, 7, 252.
- Morgenstern I., Klopman S. y Hibbett. (2008). Molecular Evolution and Diversity of Lignin Degrading Heme Peroxidases in the *Agaricomycetes*. *Journal of Molecular Evolution*. 66, 243–257.
- Neethu Shah, Haixu Tang, Thomas G. Doak, and Yuzhen Ye. (2010). Comparing bacterial communities inferred from 16s rna gene sequencing and shotgun metagenomics. *Biocomputing*, 165-176.
- O'Leary, M. (2016). Maíz: de México al mundo. El Batán, México: CIMMYT. Recuperado de <https://www.cimmyt.org/maize-from-mexico-to-the-world>.
- Pan, Y., Birdsey, R., Fang, J., Houghton, R., Kauppi, E., Kurz, W., Phillips, O., Shvidenko, A., Lewis, L., Canadell, G., Ciais, P., Jackson, B., Pacala W., McGuire, D., Piao, S., Rautiainen, A., Sitch, S., y Hayes, D. (2011). A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Science*, 333, 988–93.
- Paniagua Voirol, L., Frago, E., Kaltenpoth, M., Hilker, M., y Fatouros, N. (2018). Bacterial Symbionts in Lepidoptera: Their Diversity, Transmission, and Impact on the Host. *Frontiers in Microbiology*, 9(27), 556.
- Peiffer, J., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. y Dangl, J. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of science*. 110(16), 6548–6553.
- Plascencia, R., Castañón, B. y Raz-Guzmán, A. (2011). La biodiversidad en México su conservación y las colecciones biológicas. *Ciencias*, 101, 36-43.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. Peplies, J. y Glöckner F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tolos. *Nucleic Acids Research*, 41,590-596.

- Ramos-Elorduy, J., Moreno M., Vázquez I., Landero I., Oliva-Rivera, H. y Camacho H. (2011). Edible *Lepidoptera* in Mexico: Geographic distribution, ethnicity, economic and nutritional importance for rural people. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 7, 2.
- Ramos-Elorduy, J. (2006). Threatened edible insects in Hidalgo, Mexico and some measures to preserve them. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, Volumen 2, 51.
- Rampelotto, P. (2016). *Biotechnology of extremophiles: Advances a challenges*. Springer, 1-7.
- Ranere, A., Piperno, D., Holst, I., Dickau, R., e Iriarte J. (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5014-5018.
- Rappe, M., y Giovannoni J., (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57,369-394.
- Rebollar, A., Sandoval-Castellanos, E., Roessler, K., Gaut, B.S., Alcaraz, L. Benítez, M. y Escalante, A. (2017). Seasonal Changes in a Maize-Based Polyculture of Central Mexico Reshape the Co-occurrence Networks of Soil Bacterial Communities. *Frontiers in microbiology*, 8, 2478.
- Riesenfeld, C.S., Goodman, R.M., y Handelsman, J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental microbiology*, 6 (9), 981-9.
- Rintha-Kanto, J., Sinkko, H., Rajala, T., Al-Soud, W., Sørensen, S., Tamminen, V., y Timonen, S. (2016). Natural decay process affects the abundance and community structure of bacteria and Archaea in *Picea abies* logs. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 403–10.
- Russella Jacob A., Moreaua Corrie S., Goldman-Huertasa Benjamin, Fujiwara Mikiko, Lohmana David J. y Piercea Naomi E. (2009). Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21236-21241.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Seigle-Murandi, F., Guiraud, P., Croize, J., Falsen, E. y Eriksson, L. K-E. (2000). Bacterial are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdssall. *Applied and enviromental Microbiology*, 62, 2477-2481.
- Shi, W, Xie, S, Chen, X, Sun, S, y Zhou, X. (2013). Comparative genomic analysis of the endosymbionts of herbivorous insects reveals eco-environmental adaptations: biotechnology applications. *PLoS Genet* 9(1), e1003131.
- Sun, H., Terhonen, E., Kasanen, R., y Asiegbu, O. (2014). Diversity and community structure of primary wood-inhabiting bacteria in boreal forest. *Geomicrobiology Journal*, 31, 315–24.
- Taylor, M., Radax, R., Steger, D., y Wagner, M. (2007). Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological. *Microbiology and molecular biology review*, 71(2), 295-347.
- Tekere, M., Lötter, A., Olivier, J., Jonker, N. y Venter., S. (2011). Paper Metagenomic analysis of bacterial diversity of Siloam hot water spring, Limpopo, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 10(78), 18005-18012.
- Tkacz, A., y Poole, P. (2015). Role of root microbiota in plant productivity. *Journal of Experimental Botany*, 8(66), 2167–2175.
- Valásková, V, de Boer, W, Klein Gunnewiek, P., Pospisšek, M., y Baldrian, P. (2009). Phylogenetic composition and properties of bacteria coexisting with the fungus *Hypholoma fasciculare* in decaying wood. *ISME Journal*, 3,1218–21.

- Van der Heijden, M.G., Bardgett, R.D. y Van Straalen, N.M. (2008), The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems, *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Van der Wal, A., de Boer, W., Smant, W., y van Veen, A. (2007). Initial decay of woody fragments in soil is influenced by size, vertical position, nitrogen availability and soil origin. *Plant Soil*, 301, 189–201.
- Vogel, T., Simonet, P., Jansson, J., Hirsch, P., Tiedje, J., van Elsas, J., Bailey, M., Nalin, R., y Philippot, L. (2009). TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 252.
- Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., y Richardson, T. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* 450, 560–565.
- Warren, W., Hillier, W., Marshall Graves, J., Birney, E., Ponting, C., Grützner, F., y Wilson, R. (2008). Genome analysis of the *platypus* reveals unique signatures of evolution. *Nature*, 453(7192), 175–183.
- Weißhaupt, P., Pritzkow, W., y Noll, M. (2011). Nitrogen metabolism of wood decomposing *basidiomycetes* and their interaction with diazotrophs as revealed by IRMS. *International Journal of Mass Spectrometry*, 307, 225–31.
- Whitman, B., Coleman, C., y Wiebe J. (1989) Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(12), 6578-6583.
- Yara, R., Maccheroni, W., Horii, J. y Azevedo, J. (2006). A bacterium belonging to the *Burkholderia cepacia* complex associated with *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology*, 44, 263–8.
- Zhang H-B, Yang M-X, Tu R. (2008). Unexpectedly high bacterial diversity in decaying wood of a conifer as revealed by a molecular method. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 471–474.

Efecto de nanopartículas biosintetizadas mediante extractos vegetales en el crecimiento y desarrollo de plantas de interés agrícola: adición de de AgCl/Ag a *Latuca sativa*

Effect of biosynthesized nanoparticles by plant extracts on the growth and development of plants of agricultural interest: addition of AgCl/Ag to *Latuca sativa*

YAÑEZ-CRUZ, María Guadalupe†, VILLANUEVA-IBÁÑEZ, Maricela*, ÁLVAREZ-GARCÍA, Rocío, FLORES-GONZÁLEZ, Marco Antonio y TOVAR-JIMENEZ, Xochitl

Universidad Politécnica de Pachuca, Laboratorio de Nanotecnología, Sistemas Biológicos y Aplicaciones Industriales

ID 1^{er} Autor: *María Guadalupe, Yañez-Cruz* / **ORC ID:** 0000-0002-0124-0300, **Researcher ID Thomson:** V-4798-2018, **CVU CONACYT ID:** 638837

ID 1^{er} Coautor: *Maricela, Villanueva-Ibáñez* / **ORC ID:** 0000-0003-3209-8340, **Researcher ID Thomson:** V-4121-2018, **CVU CONACYT ID:** 38497

ID 2^{do} Coautor: *Rocío, Álvarez-García* / **ORC ID:** 0000-0001-7573-3290, **Researcher ID Thomson:** V-4112-2018, **CVU CONACYT ID:** 201058

ID 3^{er} Coautor: *Marco Antonio, Flores-González* / **ORC ID:** 0000-0002-5116-5003, **Researcher ID Thomson:** V-4622-2018, **CVU CONACYT ID:** 201498

ID 3^{er} Coautor: *Xochitl, Tovar-Jimenez* / **ORC ID:** 0000-0002-6626-6237, **Researcher ID Thomson:** V-4155-2018, **CVU CONACYT ID:** 63558

M. Yañez, M. Villanueva, R. Álvarez, M. Flores y X. Tovar

*villanueva@upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

The field of nanotechnology is leading to a rapid propagation of nanomaterials to the environment due to the new or improved properties such as size, distribution and morphology, however their possible impacts are still not completely known. The silver-based nanoparticles (NPs) are one of the most frequently silver materials used in products for human consumption, due to their antimicrobial properties. Biosynthesis of silver nanoparticles has received considerable attention because avoids the use of toxic precursors, it has also been observed that when silver chloride NPs (AgCl) are synthesized, a silver phase (Ag) is obtained, which can lead to an improvement of its antimicrobial properties, and therefore, the potential release of NPs to the environment. It is important understand the interaction with biological systems, where plants play an important role because they are an essential component in all ecosystems. It has been reported that NPs can be absorbed by the roots and transported to different tissues of the seedlings, the impact they cause depends on their physicochemical properties, such as concentration, size, chemistry and morphology, to name a few. For this reason and due to the few studies of this type, this work presents the effect that biosynthesized NPs have on plants, particularly the effect of AgCl / Ag NPs obtained from an aqueous extract when they are added to *Lactuca sativa*. In this way, the effects on the growth and development of the plant, through *in vivo* and *in vitro* tests, are reported in this work. The acute phytotoxic effects were evaluated as percentage of germination, elongation of the root and hypocotyl, biomass, length and width of the leaves as well as content of chlorophyll a, b and c.

Biosíntesis, nanopartículas, cloruro de plata, *L. sativa*

1. Introducción

El desarrollo de la nanotecnología en la fabricación de nuevos nanomateriales es cada vez mayor, debido a las propiedades nuevas y mejoradas que presentan respecto a sus materiales *bulk*. Dentro de los nanomateriales que se desarrollan actualmente, destacan las nanopartículas (NPs) a base de plata y recientemente las de cloruro de plata (AgCl NPs) por ser cada vez más empleadas en productos de consumo humano, dadas sus propiedades antimicrobianas (Trinh, Nguyen, & Nguyen, 2015), por ejemplo, en la elaboración de productos textiles, como agente antimicrobiano en desodorantes, vendajes, agentes cicatrizantes, instrumentos quirúrgicos, catéteres o prótesis de huesos, detergentes, purificadores de agua o pinturas, así como líquidos antimicrobianos, en recubrimiento de frutos para prolongar su conservación, para la fabricación de materiales que están en contacto con los alimentos, etc.

La síntesis de NPs por métodos biológicos destaca por ser un proceso de obtención que no hace uso de precursores tóxicos, en su lugar se emplean microorganismos como bacterias, levaduras y hongos, así como extractos de plantas, para la reducción de iones metálicos (Sahayaraj & Rajesh, 2015), en este sentido, el uso de plantas puede ser ventajoso sobre otros procesos biológicos ya que se evita el elaborado proceso del mantenimiento de cultivos celulares (Kuppusamy, Yusoff, Maniam, & Govindan, 2016). Se ha observado que las AgCl NPs provenientes de este tipo de métodos, presentan además una porción no determinada de Ag NPs, lo que podría mejorar sus propiedades antimicrobianas dando lugar a la liberación no intencional en nuestro entorno.

A pesar de los enormes beneficios que brindan las NPs en diferentes sectores de la industria, es inevitable la liberación de estas al ambiente a través de su transporte, uso y eliminación, lo que constituye un grave problema que debe ser abordado inmediatamente. Dentro de los escasos estudios que se han realizado sobre el impacto de las NPs en cultivos vegetales, la gran mayoría han obtenido los nanomateriales por síntesis química, encontrando efectos tanto benéficos como adversos en el crecimiento y desarrollo de semillas de diferentes especies vegetales. Oliveira et al. (2004) reportan el efecto de Ag NPs en forma coloidal, en polvo y en solución con tamaños de 2-20, 20 y 5 nm, respectivamente, sobre *Lolium*, *Hordeum vulgare* y *Linum usitatissimum*, donde las partículas mostraron efectos inhibitorios en la elongación de tallo y raíz con tan sólo 10 mg/L; Lee, Kwak, & An (2012), evaluaron el efecto de Ag NPs recubiertas de citrato, en estado coloidal con tamaños de partícula de 5-25 nm, sobre *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor*, los resultados mostraron la reducción del crecimiento de las plántulas y signos de necrosis dependientes de la concentración de NPs. Por otro lado Iram et al. (2014), reportaron efectos estimulantes en el crecimiento de raíz de *Raphanus sativus* L. al aplicar 13.5 µg/mL de Ag NPs, sin embargo, este efecto era dependiente de la concentración, ya que al aumentar la dosis a 27 µg/mL, mostraba inhibición en la elongación de la raíz.

Recientemente los estudios sobre los efectos de NPs se han enfocado también en aquellas provenientes de biosíntesis, ya que se asumía que los efectos tóxicos inducidos por las NPs provenientes de métodos químicos estaban asociados a los compuestos tóxicos adsorbidos en la superficie de los nanomateriales; sin embargo, diversos estudios demuestran que las características fisicoquímicas de las NPs son las que están directamente relacionadas con la actividad biológica y su comportamiento en el medio. El tamaño y concentración de las NPs son algunos de los puntos críticos que determinan su toxicidad (Auffan, Rose, Wiesner, & Bottero, 2009). En la tabla 4.1 se muestra un compendio de trabajos relacionados con el efecto de nanopartículas obtenidas por biosíntesis en cultivos de interés agrícola.

Tabla 4.1 Estudios del efecto de nanopartículas obtenidas por biosíntesis sobre cultivos vegetales de interés

Nanopartícula (tamaño y dosis aplicada)	Planta en estudio	Efectos	Referencia
Au 20-50 nm 1.96-196 mg/L	<i>Allium cepa</i>	No mostró efectos carcinogénicos ni citotóxicos. Estimuló el índice mitótico y la germinación de polen conforme aumentaba la concentración de NPs.	(Gopinath, Venkatesh, Ilangovan, Sankaranarayanan, & Arumugam, 2013)
CaCO ₃ 40-75 nm 3336 mg/L	<i>Vigna mungo</i> (L.). Hepper	El mayor % de germinación, elongación de plántulas y biomasa se obtuvo al adicionar las NPs biosintetizadas, en comparación con el control (CaCl ₂) y el blanco (agua destilada).	(Yugandhar & Savithramma, 2016)
Au ~15.9 nm 5000-20 000	<i>Vigna radiata</i> L.	Completa inhibición de la germinación de semillas a partir de 15 000 mg/L con las NPs y el extracto empleado para la síntesis. El efecto inhibitorio puede relacionarse a los metabolitos presentes en el extracto, como alcoholes, aldehídos, cetonas y lactonas.	(Garg & Malik, 2014)
Ag ~ 13 nm 20 y 50 mg/L	<i>Pennisetum glaucum</i>	El % de germinación se vio favorecido al aumentar la dosis de NPs aplicada. A partir de 20 mg/L, disminuyó la elongación de raíz y tallo, los autores proponen que pudo ser debido a que las NPs se adhieren a las raíces de las plantas y ejercen toxicidad física o química en las plantas.	(Parveen & Rao, 2014)
MgO 25 y 27 nm Concentración no especificada	<i>Cicer arietinum</i> <i>Solanum lycopersicum</i>	El tiempo de contacto de las NPs con <i>C. arietinum</i> favoreció el % de germinación, contenido de clorofila y carotenoides, respecto al control. Mientras que <i>S. lycopersicum</i> mostró un decremento significativo incluso al someter la semillas solamente durante 2h con NPs.	(Moorthy, Ashok, Rao, & Viswanathan, 2015)
Ag ~17 nm 100 mg/L	<i>Triticum aestivum</i> L. <i>Solanum lycopersicum</i> L.	En la germinación <i>T. aestivum</i> tuvo un incremento en la longitud de las plántulas, y los pigmentos fotosintéticos respecto al control. Mientras que en la etapa vegetativa, se observó un decremento en el contenido de biomasa, elongación de raíz y tallo. Para <i>S. lycopersicum</i> , el contenido de clorofila y carotenoides aumentó y con ello, la acumulación de proteínas solubles.	(Farghaly & Nafady, 2015)
Ag ~20 nm 0.1-50 mg/L	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	10 ppm de NPs promovieron el % de germinación en comparación con el control. Contenido de biomasa, elongación de radícula y tallo mostraron efectos negativos al adicionar 50 ppm. Se observó una menor bioacumulación de NPs por irrigación que por aspersión foliar.	(Malathi & Palani, 2016)
ZnO ~16 nm 0-500 mg/L	<i>Solanum lycopersicum</i>	Efecto dependiente de la concentración de NPs aplicadas. 100 mg/L mostraron un aumento en el % de germinación, crecimiento de plántulas e índice de vigor. El contenido de clorofila, proteína y azúcar incrementa significativamente con la concentración más baja.	(Singh et al., 2016)
ZnO ~20 nm 0-150 mg/L	<i>Vigna radiata</i> L.	Se promovió el % de germinación y el crecimiento de plántulas de <i>V. radiata</i> Las NPs pueden penetrar el recubrimiento de la semilla y estimular las hormonas del crecimiento específicamente el ácido indolacético, el cual además interviene en el proceso de absorción de agua.	(Jayarambabu & Rao, 2016)
Au ~39 nm 0-2000 mg/L	<i>Oryza sativa</i>	No se muestran efectos significativos en los parámetros evaluados: elongación de raíz, muerte celular, formación de peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica.	(Ndeh, Maensiri, & Maensiri, 2017)
Ag ~30 nm 0-80 mg/L Ag NPs comerciales funcionalizadas con citrato ~20 nm	<i>Triticum aestivum</i> <i>Phaseolus mungo</i>	No se detectan efectos significativos en el % de germinación para ninguna de las especies en estudio. Se observaron efectos fitotóxicos en la elongación de raíz y tallo por encima de 60 mg/L. Los autores sugieren que 30 mg/L pueden ser apropiados para el desarrollo de aplicaciones comerciales en el tratamiento de semillas y control de fitopatógenos.	(Kim et al., 2017)
Ag 1-16 nm 0-900 mg/L	<i>Lupinus termis</i> L.	El % de germinación, así como el contenido de biomasa, elongación de radícula e hipocótilo se ven favorecidos al añadir 0.1 mg/L respecto al control, sin embargo, por encima de esta concentración hay una disminución en los parámetros de crecimiento, así como acumulación de prolina foliar.	(Al-huqail, Hatata, Al-huqail, & Ibrahim, 2017)
Au 20-30 nm 0-179 mg/L	<i>Allium cepa</i> <i>Gloriosa superba</i>	No mostraron algún tipo de toxicidad. La adición de Au NPs promueve la división mitótica celular (87%), así mismo, la germinación de polen se ve favorecida hasta un 98.66%.	(Balalakshmi et al., 2017)
AgCl/Ag 30-50 nm 0.013-130 mg/L	<i>Latuca sativa</i> L. <i>var. longifolia</i>	Los efectos fitotóxicos de las NPs son dependientes de la concentración aplicada. 0.013 ppm estimulan el % de germinación elongación de hipocótilo y biomasa. A partir de 1.3 ppm se observaron efectos adversos sobre las características fisiológicas de las plántulas, que impiden su posterior desarrollo y crecimiento.	(Yañez Cruz et al., 2017)
Ag 0-100 mg/L	<i>Triticum aestivum</i>	Las NPs aplicadas promovieron el % de germinación, crecimiento de radícula, hipocótilo y contenido de biomasa respecto al control. El efecto estimulante de las NPs se ve favorecido al incrementar la concentración de NPs.	(Sabir, Arshad, Satti, & R, 2018)

Como se puede apreciar en la tabla 4.1, la información disponible sobre los nanomateriales biosintetizados y su efecto en cultivos vegetales se encuentra en pleno desarrollo, aún no del todo explicada y en principio sugiere que es baja la repercusión de esas nanopartículas en los cultivos vegetales; sin embargo, es también evidente que la concentración de NPs aplicada es determinante, por esta razón, un mejor entendimiento de las interacciones entre las NPs y los sistemas biológicos es de suma importancia para evaluar su efecto y posible transporte trófico. Este trabajo tiene como objetivo poner en evidencia los efectos que presenta la adición de diferentes concentraciones de NPs de Ag/AgCl provenientes de una síntesis biológica sobre el crecimiento y desarrollo de un cultivo hortícola de importancia a nivel mundial (*L. sativa* L. var. *longifolia*) mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

2. Materiales y métodos

2.1 Síntesis y caracterización de AgCl/Ag NPs

Se emplearon AgCl/Ag NPs sintetizadas a partir del protocolo propuesto por Villanueva-Ibáñez, Yañez-Cruz, Álvarez-García, Hernández-Pérez, & Flores-González (2015), que se obtienen adicionando a dos viales diferentes 3 mL y 5 mL de los extractos de la perfolia de *Zea mays* preparados por decocción y molienda respectivamente, 10 mL de una solución de AgNO₃ 5 mM, ajustando el volumen final a una concentración de 2 mM con agua desionizada, que se mantienen a 25° C y agitación constante durante 4 h, posteriormente se realizó una separación de las partículas mediante centrifugación a 8 000 rpm durante 15 min, donde se retiró el sobrenadante y se realizaron lavados al precipitado por triplicado, la acumulación de estos precipitados se re-dispersó en agua desionizada en el volumen inicial y se empleó para los análisis posteriores. Se emplearon técnicas complementarias para conocer la morfología, tamaño, estructura cristalina y concentración de las partículas a emplear en los ensayos de toxicidad.

2.2 Análisis de viabilidad de las semillas

Las semillas fueron adquiridas en *Hydro Enviroment*, evaluando en primer lugar la viabilidad mediante el método de germinación sobre papel y la prueba de tetrazolio, recomendados por las normas ISTA (Ellis, Hong, & Roberts, 1985). El número de semillas empleado fue de 400 para ambas pruebas, las condiciones para la prueba de germinación sobre papel fueron siete días en cajas Petri de vidrio estériles, 20°C, 1500 lux de iluminación, papel filtro Whatman no. 40 como soporte. Las semillas fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito de sodio al 10 % durante 10 minutos y se enjuagaron varias veces con agua desionizada hasta eliminar el exceso. Para la prueba de tetrazolio se empleó una solución de la sal al 0.5 % en la cual se sumergieron durante 24 h a 30 °C en oscuridad, transcurrido el tiempo se evaluaron respecto a la coloración obtenida.

2.3 Ensayos de toxicidad *in vitro*

2.3.1 Prueba preliminar de toxicidad

Se realizó una prueba preliminar, según lo recomienda la USEPA (Greene, Bartels, Warren-Hicks, Parkhurst, & Linder, 1988), para el caso de sustancias cuya toxicidad es desconocida, empleando diluciones logarítmicas (100, 10, 1, 0.1, 0.01) que permitieron establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0%. Las diluciones de las NPs se prepararon con agua desionizada. Para el experimento se colocó en cada caja Petri estéril un disco de papel filtro Whatman No. 40 y se adicionaron 9 mL de cada solución a ensayar, con ayuda de unas pinzas rectas se colocaron 30 semillas en cada caja dejando un espacio de dos a tres veces su diámetro de manera que permitiera la elongación de las raíces. Se emplearon como controles positivos la sal precursora de AgNO₃ y controles negativos con agua desionizada y extracto a las mismas diluciones que las NPs, con tres repeticiones para cada tratamiento (90 unidades experimentales), se incubaron en una cámara de germinación durante 7 días a 20 ± 2°C con 1500 lux de iluminación.

2.3.2 Prueba de exposición de las semillas por inmersión

Esta prueba se realizó con base a los estudios realizados por Song et al. (2013) con la finalidad de evaluar la recuperación de las plántulas de *L. sativa* transcurridas 48 h de exposición a diferentes concentraciones de AgCl/Ag NPs, la elección de las concentraciones se llevó a cabo a partir del análisis estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar, eligiendo aquellas que causaron un efecto significativo en las características fisiológicas de las plántulas.

Para la evaluación de la toxicidad, se pusieron en contacto 20 mL de cada una de las soluciones con sus respectivos controles, empleando 60 unidades experimentales distribuidas en 3 frascos con 20 semillas cada uno, se mantuvieron en agitación constante a temperatura ambiente durante 48 h. Al finalizar ambas pruebas *in vitro* se evaluaron los efectos fitotóxicos agudos como el porcentaje de germinación, elongación de radícula e hipocótilo, peso húmedo y seco.

2.4 Ensayos de toxicidad *in vivo*

Este ensayo fue realizado en dos etapas sucesivas: Prueba de toxicidad aguda con una duración de 4 semanas y posterior a su trasplante la toxicidad subcrónica de 6 semanas.

2.4.1 Etapa 1: Prueba de toxicidad aguda (4 semanas)

Como se reporta en la literatura, la toxicidad, bioacumulación y disolución de las NPs está directamente influenciada por el medio de exposición, por lo que se retomaron las concentraciones empleadas en el ensayo preliminar (0.013, 1.3, 13 ppm precipitado y sobrenadante) para realizar el estudio *in vivo*, con el suelo artificial, excepto la concentración más alta pues no dio lugar a la obtención de plántulas con las estructuras esenciales que permitieran su posterior desarrollo.

El sustrato empleado fue la mezcla *Sunhine No. 3* compuesta por una combinación uniforme de musgo, *Sphagnum Canadiense* y vermiculita, se preparó mezclándolo y humedeciéndolo con agua desionizada hasta quedar saturado, posteriormente se adicionaron 64 g del sustrato a cada maceta, colocando una semilla a 1 cm de profundidad, cada tratamiento se realizó por triplicado. La prueba se llevó a cabo en condiciones naturales de luz e iluminación en invernadero, durante cuatro semanas, el riego de NPs se realizó cada tercer día adicionando gota a gota 0.5 mL de cada tratamiento empleado alrededor del tallo de la plántula, el nivel de humedad del sustrato se revisó diariamente el cual con ayuda de un aspersor era humedecido con agua desionizada durante las primeras tres semanas, en la cuarta semana se adicionó al agua la solución nutritiva *Hoagland* para hortalizas, proporcionada por los proveedores de *Hydro Enviroment* con un contenido del 10% de Nitrógeno (N), 8% Fósforo (P) y 18% Potasio (K). Luego del periodo de exposición aguda un porcentaje de las plántulas de cada tratamiento fue empleado para medir los efectos fitotóxicos y el resto se utilizó para continuar con la prueba de toxicidad subcrónica.

2.4.2 Etapa 2: Prueba de toxicidad subcrónica (6 semanas)

Las plántulas previamente expuestas en el ensayo de exposición aguda (30 días) se trasplantaron a macetas más grandes y continuaron su crecimiento durante 6 semanas más en diferentes ambientes:

a) En sustrato

Se realizó el trasplante a macetas de 11.5 cm de profundidad x 13 cm de ancho, conteniendo 400 g de sustrato preparado como se describió anteriormente. Las concentraciones ensayadas fueron las mismas que en el ensayo de toxicidad aguda: 0, 0.013, 1.3, y 13 ppm esta última de sobrenadante y de precipitado. Cada tratamiento se realizó por triplicado, bajo condiciones naturales de luz e iluminación en invernadero. El nivel de humedad se revisó diariamente, y se mantuvo con solución nutritiva *Hoagland*. La adición de NPs se siguió efectuando cada tercer día gota a gota con 0.5 mL de NPs de cada concentración empleada alrededor del tallo.

b) En hidroponia

Se realizó el trasplante a un sistema de hidroponia de raíz flotante, por ser de los más recomendados para este tipo de hortalizas. En este caso solo se seleccionó como concentración más alta el punto que ocasionó un efecto significativo según el análisis estadístico realizado, 1.3 ppm, y la concentración más baja a la que no se observó efecto significativo en las características fisiológicas de las plántulas, 0.013 ppm; además del blanco, 0 ppm. Para ello se prepararon 10 L de cada concentración, empleando solución nutritiva *Hoagland* y agua desionizada, los contenedores a los que se les adicionaron las NPs con la solución nutritiva se mantuvieron protegidos de la luz para evitar crecimiento de hongos. El sistema contó con un *timer* al que se le programó la recirculación de la solución durante 10 minutos cada 2 horas, como lo recomienda el proveedor.

2.4.3 Evaluación de la adición de NPs a plántulas de *L. sativa* después de 4 semanas de crecimiento

a) Prueba de exposición directa al tallo

Para realizar este ensayo se trasplantaron plántulas que durante las primeras 4 semanas no habían sido expuestas a NPs, en macetas de 11.5 cm de profundidad x 13 cm de ancho, conteniendo 400 g de sustrato preparado como se describió anteriormente, para adicionar a partir de este momento alrededor del tallo de la plántula, 0.5 mL de NPs cada tercer día. El nivel de humedad se revisó diariamente y el riego se realizó con la solución nutritiva *Hoagland*. La duración de la prueba fue de 6 semanas, cada tratamiento se realizó por triplicado.

b) Prueba de exposición foliar

El trasplante se realizó como se describió en la prueba directa en sustrato, con la diferencia de que la adición de las NPs se llevó a cabo con ayuda de un aspersor directo sobre las hojas, se verificó que con una aplicación se añadían 0.5 mL de cada tratamiento. Al finalizar todas las pruebas de toxicidad *in vivo* se evaluó número de hojas, largo y ancho de hojas, elongación de la raíz y tallo, peso seco y húmedo, así como contenido de clorofila *a*, *b*, y *c*.

2.5 Análisis de los datos

Todos los resultados se expresaron como el promedio de tres repeticiones realizadas para cada prueba. Los datos presentados se evaluaron con base a comparaciones con el control correspondiente en cada caso, mediante la prueba de Tukey, empleando el programa NCSS (Windows Vista, Versión 0.7.1.17, Kaysville, Utah), reportándose diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.001$.

3. Resultados

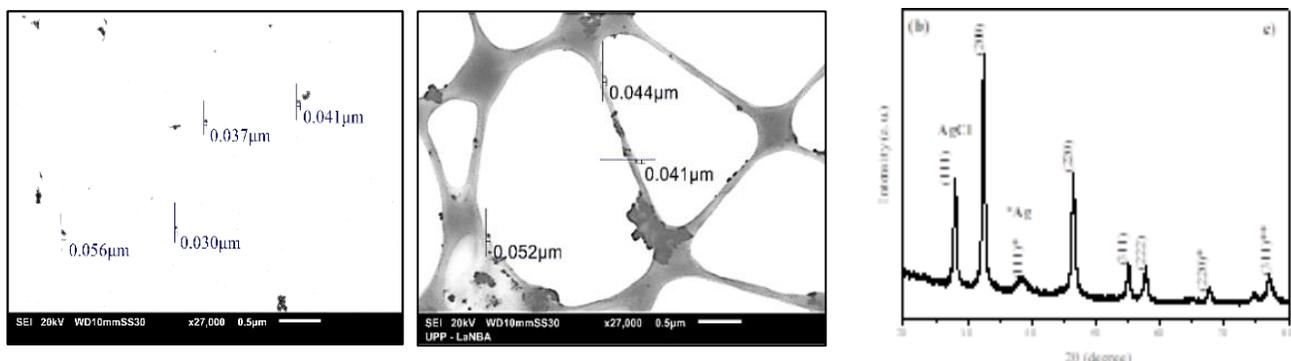
3.1 Caracterización de las AgCl/Ag NPs

La caracterización de las NPs obtenidas a partir de los extractos por infusión y decocción confirmó la formación de partículas semiesféricas de 144 nm y 487 nm respectivamente, estos aglomerados se encontraban conformados por partículas más pequeñas de 30-50 nm. Con el difractograma realizado se confirmó la presencia de ambas estructuras cristalinas Ag y AgCl, para ambos extractos, y mediante el análisis de absorción atómica se conoció la concentración de Ag que fue de 136.51 ppm. A partir de estos datos, se realizaron los ensayos de toxicidad que a continuación se mencionan.

3.2 Viabilidad de las semillas de *L. sativa*

El porcentaje de germinación obtenido con ambas pruebas fue de 60%, según lo establecido en las normas, se debe aumentar el número de semillas a evaluar en las pruebas subsecuentes a 30 semillas, para obtener al menos 18 semillas germinadas en cada caja y poderlas emplear para los estudios posteriores.

Figura 4.1 a) Micrografía de la síntesis de AgCl/Ag NPs a partir del extracto de la perfolia de *Zea mays* obtenido por infusión y b) por decocción; c) Difractograma de Ag y AgCl NPs obtenido para ambos extractos



a)

b)

c)

3.3 Ensayos de toxicidad *in vitro*

Los ensayos de toxicidad *in vitro* recomendados por Greene et al. (1988) tienen como objetivo evaluar los efectos fitotóxicos en los primeros días de crecimiento, ya que es durante esta etapa donde ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de una planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta (Cecilia Sobrero & Ronco, 2008).

3.3.1 Prueba preliminar de toxicidad

Este ensayo permitió establecer el intervalo de concentración de NPs a utilizar en los estudios posteriores. Se partió de la concentración inicial de NPs que se tiene según los resultados obtenidos mediante absorción atómica. A partir del análisis ANOVA empleando la prueba de Tukey con una $p < 0.001$ se observó que el efecto en la fisiología de las plántulas está directamente relacionado con la concentración empleada, puesto que, para el hipocótilo, al adicionar 0.013 ppm presenta un efecto estimulante en la elongación, mientras que si esta concentración aumenta a 1.3 ppm su medida disminuye hasta un 50% respecto al control.

El análisis estadístico mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas de todas las variables estudiadas (hipocótilo, radícula, peso húmedo y peso seco) respecto al control al adicionar 0.13 ppm de NPs obtenidas a partir del extracto por infusión.

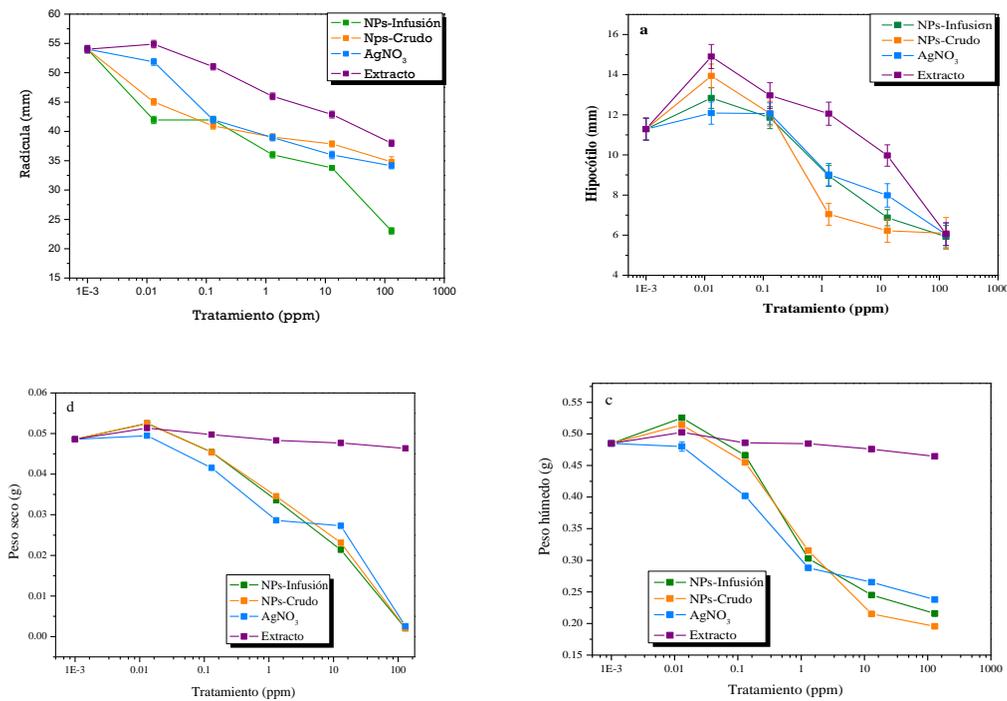
Así mismo, se observó que el tamaño de partícula influyó en la elongación de radícula principalmente, ya que ambas NPs biosintetizadas mostraron inhibición, pero el efecto fue mayor para las NPs obtenidas por infusión con tamaños de 144 nm que para las NPs obtenidas con tamaños de 486 nm.

Los controles, AgNO_3 y extracto, mostraron también un efecto dependiente de la concentración aplicada, siendo el hipocótilo a 1.3 ppm de ambos controles donde mostraron el mayor efecto, por otro lado, el extracto no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control en el contenido de biomasa con ninguna de las concentraciones aplicadas.

A partir de los resultados obtenidos en esta prueba y con el análisis ANOVA, se eligieron las concentraciones que dan lugar a plántulas “normales”, es decir aquellas que posean todas sus estructuras esenciales (hipocótilo, cotiledón y radícula) y con diferencias estadísticamente significativas respecto al control, siendo a partir de 0.13 ppm de cada tratamiento.

3.3.2 Prueba de exposición de las semillas por inmersión

Figura 4.2 Prueba preliminar, para determinar el efecto en la elongación de a) Hipocótilo, b) Radícula, c) Peso húmedo y d) Peso seco sobre la germinación de semillas de *L. sativa* al ser expuestas a 0.013, 0.13, 1.3, 13 y 130 ppm de AgCl/Ag NPs durante siete días mediante un ensayo in vitro. Los datos corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo



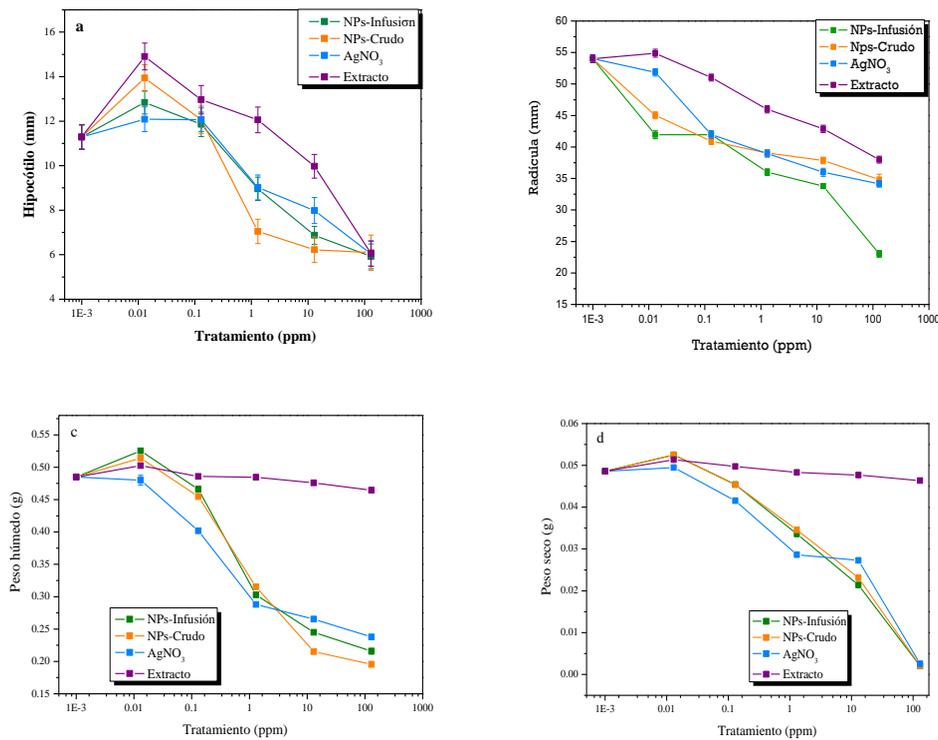
La elección de las concentraciones de los tratamientos empleados en esta prueba, se realizó considerando los resultados obtenidos en la prueba preliminar, donde se seleccionó aquella en donde no se observó efecto alguno, es decir no existía diferencia estadísticamente significativa respecto al control, y la menor concentración que ocasionó efecto significativo en la fisiología de las plántulas, siendo así 0.013 y 0.13 ppm las concentraciones elegidas, además se añadió un valor intermedio a evaluar.

Esta prueba se realizó con la finalidad de evaluar la recuperación de las plántulas al ser expuestas solamente durante sus primeras 48 h de germinación, además de evaluar el efecto que tiene el tipo de exposición, tal como reporta Song et al. (2013) al preparar las NPs y diluirlas, ya que aunque aparentemente se observe que están dispersas y se disuelven rápidamente, algunas pueden formar aglomerados y precipitarse o bien, al emplear la técnica con el soporte del papel filtro pudieran quedar ahí ancladas imposibilitando la absorción de las NPs por las plántulas y de esta manera no se observe el efecto real de cada tratamiento aplicado. Por ello, se ponen contacto mediante inmersión y agitación que permita la mezcla total de las soluciones sin dañar las semillas.

Los resultados obtenidos en la prueba de inmersión se observan en el gráfico 2, en este caso ninguna de las concentraciones empleadas tuvo efectos estimulantes, sino al contrario, 0.013 ppm de ambas NPs y de la sal precursora ocasionaron inhibición en la elongación de raíz y radícula, así como la disminución de biomasa, así mismo este efecto es dependiente de la concentración, ya que al aumentar la dosis se ve afectada directamente la inhibición de las variables evaluadas.

De igual modo, se observa el efecto en el tamaño de las NPs aplicadas, ya que las NPs obtenidas por infusión muestran un mayor efecto inhibitorio en todos los casos que las de mayor tamaño, siendo la elongación de radícula y contenido de biomasa, las variables que mayoritariamente se ven afectadas, con una disminución de hasta un 50% respecto al control. Por otro lado, para el extracto acuoso de la perfolia de *Zea mays*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la elongación de radícula, pero sí en el contenido de biomasa.

Figura 4.3 Prueba de inmersión para la evaluación del efecto en la elongación de a) Hipocótilo, b) Radícula, c) Peso húmedo y d) Peso seco sobre la germinación de semillas de *L. sativa* al ser expuestas a 0.013, 0.065 y 0.13 ppm de AgCl/Ag NPs durante las primeras 48 h mediante un ensayo *in vitro*. Los datos corresponden al promedio de tres repeticiones realizadas para cada ensayo



3.4 Ensayos de toxicidad *in vivo*

La mayoría de los estudios realizados sobre los efectos de diversos tipos de NPs en semillas de importancia, han sido en su gran mayoría solamente sobre la etapa de la germinación; en este trabajo es de interés de evaluar el efecto de NPs biosintetizadas en el crecimiento y desarrollo de *Lactuca sativa* ya que, en su etapa de madurez, no es tan frágil como las plántulas. Por lo tanto, se evaluó la toxicidad de las NPs en plantas maduras en un ensayo en invernadero, en sustrato y en hidroponía, así mismo, se determinó el efecto de la adición de NPs por aspersión foliar y directo sobre el tallo.

Las concentraciones elegidas para este ensayo, fueron las mismas que se emplearon en la prueba preliminar, puesto que como se observó en la prueba por inmersión, el tipo de contacto que tengan las semillas con las NPs influye directamente en el comportamiento que las mismas presenten, por lo tanto y considerando lo reportado por Navarro et al. (2008), si las NPs se encuentran en estado coloidal, permanecerán dispersas, manteniendo su reactividad y comportamiento catalítico y de este modo podrán interactuar fácilmente con la materia orgánica presente en el medio, por ello se eligió trabajar con las mismas concentraciones, excepto con la concentración más alta.

Las AgCl/Ag NPs empleadas en los posteriores ensayos fueron obtenidas a partir del extracto obtenido por infusión, por ser las de menor tamaño con posibilidad de mostrar un mayor efecto tal como se observó en los estudios *in vitro*. Posterior a la síntesis de las NPs se les realizan lavados con la finalidad de eliminar el exceso de materia orgánica presente, obteniendo un precipitado y un sobrenadante, resultante de la separación de las NPs, ambas muestras se analizaron por absorción atómica, empleando solamente la concentración más alta de precipitado como referencia para realizar la dilución de la muestra de sobrenadante. El control empleado en todos los casos fue el de agua desionizada (0 ppm) para todos los ensayos realizados.

3.4.1 y 3.4.2 Etapa 1 y 2: Prueba de toxicidad aguda y subcrónica (4 y 6 semanas) en sustrato

La tabla 4.2 muestra el efecto de la adición de concentraciones logarítmicas de AgCl/Ag NPs sobre el contenido de biomasa y clorofilas *a*, *b*, y *c*. Las variables de peso seco y peso húmedo que están marcadas con asterisco se refieren a aquellas que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Se observa que a las cuatro semanas que se evaluó el peso seco y peso húmedo, todas las concentraciones evaluadas, excepto la de 1.3 ppm mostraron un efecto estimulante respecto al control, así mismo a las 10 semanas de exposición, fue a 1.3 ppm donde se observó un efecto significativo solamente en el contenido de peso húmedo, mientras que, para el contenido de biomasa, todas las dosis aplicadas mostraron efectos estimulantes.

Por otro lado, el contenido de clorofila presente a las 4, 6 y 10 semanas se ve disminuido en el control, debido a que esta disminuye conforme aumenta la maduración. De forma complementaria a los datos de peso seco y húmedo, se observa que a 1.3 ppm se tiene un efecto significativo respecto al control, el cual ocasiona un decremento en el contenido de clorofila conforme aumenta el tiempo de exposición.

Tabla 4.2 Prueba de toxicidad aguda y subcrónica. Efecto en peso húmedo, peso seco y contenido de clorofila *a*, *b* y *c* al ser expuestas a 0.013, 0.13, 1.3 y 13 ppm de AgCl/Ag NPs durante 4, 7 y 10 semanas en sustrato

Variables	AgCl/Ag NPs					
	Control 0 mg/L (H)	0.013 mg/L (P)	0.13 mg/L (P)	1.3 mg/L (P)	13 mg/L (P)	13 mg/L (S)
Tiempo de exposición: 4 semanas (trasplante)						
P. húmedo	2.65 ± 0.04	3.19 ± 0.06*	3.07 ± 0.02*	1.92 ± 0.07*	2.82 ± 0.35	3.17 ± 0.03*
P. seco	0.15 ± 0.004	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.007	0.13 ± 0.004	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.005*
Clorofila <i>a</i>	24.87	24.84	24.77	24.48	24.78	22.82
Clorofila <i>b</i>	24.32	24.22	27.35	15.72	26.48	12.94
Clorofila <i>c</i>	24.60	23.22	31.42	10.88	28.14	7.77
Tiempo de exposición: 7 semanas						
Clorofila <i>a</i>	12.26	1.26	16.86	5.07	10.26	22.05
Clorofila <i>b</i>	9.82	72.04	13.18	4.27	7.38	12.03
Clorofila <i>c</i>	0.46	0	6.59	1.54	2.43	5.33
Tiempo de exposición: 10 semanas						
P. húmedo	189.91 ± 0.45	199.85 ± 0.62*	211.36 ± 0.58*	174.96 ± 0.17*	160.11 ± 0.86*	218.80 ± 0.33*
P. seco	16.19 ± 0.19	20.53 ± 0.15 *	18.07 ± 0.10 *	22.47 ± 0.04 *	16.23 ± 0.18	21.38 ± 0.35 *
Clorofila <i>a</i>	4.67	5.87	6.61	6.12	24.32	9.57
Clorofila <i>b</i>	15.51	3.02	5.19	3.90	16.30	4.85
Clorofila <i>c</i>	14.95	0.02	9.15	7.67	17.07	2.32

Los datos de peso húmedo y peso seco corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo, (\pm desviación estándar), los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey. (P): precipitado y (S): sobrenadante de NPs resultantes de los lavados; (H): Agua desionizada.

La tabla 4.2, muestra el efecto de la adición de NPs a 0.013 y 1.3 ppm, durante 4 semanas en sustrato y posteriormente 3 y 7 semanas en un sistema de hidroponía de raíz flotante. Donde se observa que a 0.013 ppm se tiene un efecto estimulante en peso húmedo y seco, mientras que a 1.3 ppm muestra un efecto inhibitorio respecto al control, donde en ambos casos solamente el peso húmedo representa diferencias estadísticamente significativas. A diferencia de la exposición en sustrato, en este caso se observa que, al aumentar el tiempo de exposición, el peso seco y peso húmedo tienen una disminución significativa que ocasiona hasta un 80% y 30 % en la reducción de los pesos al adicionar 1.3 y 0.013 ppm respecto al control, mientras que cuando se evaluó en sustrato, 0.013 ppm mostraban efectos benéficos al inducir un aumento en el contenido de biomasa conforme aumentaba el tiempo de exposición. En cuanto al contenido de clorofila se observa que 0.013 ppm actuaron como estimulante, mientras que 1.3 ppm propiciaron una reducción significativa en el contenido de clorofilas presente, siendo la clorofila *c*, la que se redujo en mayor proporción respecto a la *a* y *b*.

La figura 4.4 a, muestra el efecto de la adición de 0.013-13 ppm de AgCl/Ag NPs sobre la elongación de raíz y tallo al exponerlas durante 4 y 6 semanas de crecimiento en sustrato. El análisis estadístico muestra diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos aplicados excepto a 0.13 ppm para la elongación de raíz a las 4 semanas de exposición.

Tabla 4.3 Prueba de toxicidad subcrónica. Efecto en peso húmedo, peso seco y contenido de clorofila a, b y c al ser expuestas a 0.013, 013, 1.3 y 13 ppm de AgCl/Ag NPs durante 4 semanas en sustrato y posteriormente 3 y 6 semanas en hidroponía

Variables	Control	AgCl/Ag NPs	
	0 mg/L (H)	0.013 mg/L (P)	1.3 mg/L (P)
Tiempo de exposición: 4 semanas (sustrato). Trasplante			
P. húmedo	2.65 ± 0.04	3.19 ± 0.06*	1.92 ± 0.07*
P. seco	0.15 ± 0.004	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.004
Clorofila a	24.87	24.84	24.48
Clorofila b	24.32	24.21794	15.72
Clorofila c	24.60	23.22	10.88
Tiempo de exposición: 7 semanas, 3 en hidroponía			
Clorofila a	16.3555	24.73016	9.58362
Clorofila b	13.20706	31.7042	24.84854
Clorofila c	5.07988	48.92768	0.053
Tiempo de exposición: 10 semanas, 7 en hidroponía			
P. húmedo	71.99 ± 0.83	46.41 ± 0.47*	12.21 ± 0.14*
P. seco	7.41 ± 0.20	5.72 ± 0.42*	1.20 ± 0.15*
Clorofila a	25.45912	16.34019	12.83048
Clorofila b	21.92484	20.70498	4.27828
Clorofila c	22.38568	20.20814	5.5448

Los datos de peso húmedo y peso seco corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo, (\pm desviación estándar), los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey. (P): precipitado de NPs resultantes de los lavados; (H): Agua desionizada.

3.4.1 y 3.4.2 Etapa 1 y 2: Prueba de toxicidad aguda y subcrónica (4 y 6 semanas) en hidroponía

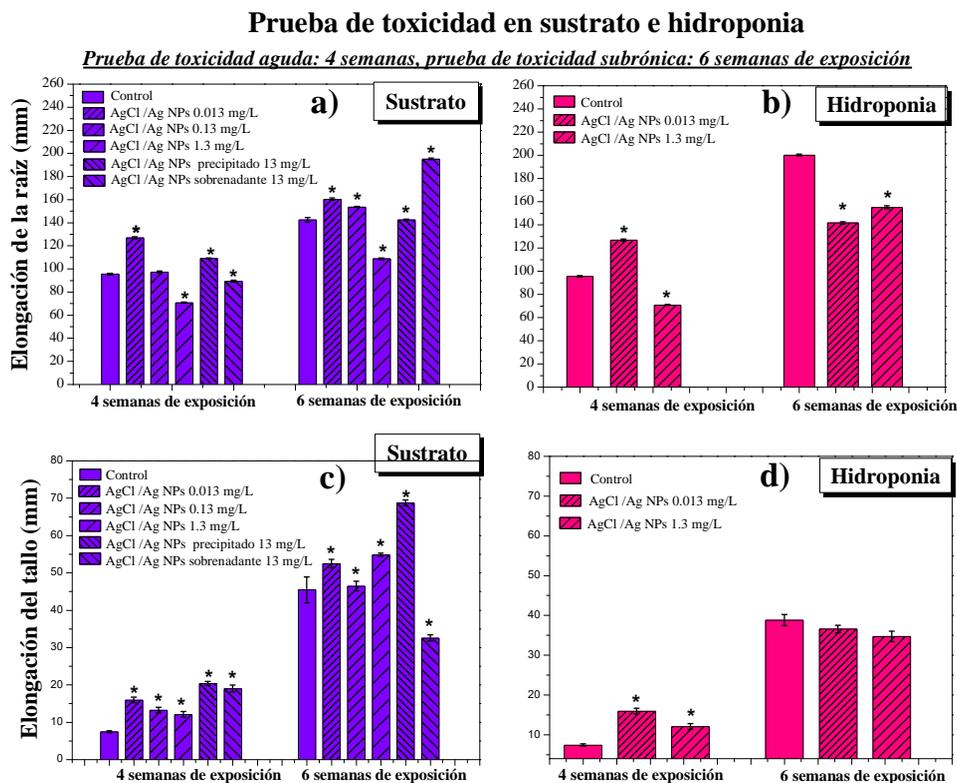
El efecto de las NPs sobre la elongación de raíz en sustrato, muestran que nuevamente 1.3 ppm ocasionan efectos significativos en la reducción del tamaño de la raíz a las 4 y 6 semanas de exposición, mientras que, con las demás concentraciones, se observa un efecto estimulante en su crecimiento dependiente del tiempo de exposición, ya que en las primeras 4 semanas 0.013 ppm ocasionaba el mayor efecto estimulante, mientras que a las 6 semanas fue la muestra de 13 ppm de sobrenadante.

Por otro lado, aquellas que fueron trasplantadas al sistema de hidroponía, 0.013 ppm pasó de ser una concentración que promover un efecto estimulante a ocasionar una disminución del tamaño, afectando aún más que la concentración más alta que se aplicó.

Para el caso de la elongación de la raíz al ser expuesta en sustrato, el análisis mostró diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos aplicados durante los dos periodos de exposición, en la primera etapa, todas las concentraciones mostraron efectos benéficos al aumentar el tamaño de la raíz, mientras que al aumentar el tiempo de exposición, 13 ppm de sobrenadante ocasionaron una reducción en la elongación de la raíz de un 20% respecto al control.

El efecto en la elongación de raíz cuando se trasplantó a hidroponía, tuvo el mismo efecto que para el tallo, ya que ambas concentraciones aplicadas ocasionaron un decremento en la misma, sin embargo, según el análisis estadístico, este decremento no era significativo respecto al control.

Figura 1.4 a) Efecto en la elongación de la raíz de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 0.13, 1,3 y 13 ppm de sobrenadante y precipitado de AgCl/Ag NPs durante 4 y 10 semanas, en sustrato y b) en hidroponía c) Efecto en la elongación del tallo de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 0.13, 1,3 y 13 ppm de sobrenadante y precipitado de AgCl/Ag NPs durante 4 y 10 semanas, en sustrato y d) en hidroponía. Los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey, correspondientes al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo



3.4.3 Evaluación de la adición de NPs a plántulas de *L. sativa* después de 4 semanas de crecimiento directa al tallo y foliar

En la tabla 4.4 se muestra el peso seco, peso húmedo y contenido de clorofila como variables de respuesta al exponer a plantas de *L. sativa* después de su trasplante durante 3 y 6 semanas a 0.013 y 1.3 ppm de AgCl/Ag NPs mediante la aplicación directa al tallo y por aspersión a las hojas.

Este experimento pone en evidencia el efecto que tiene, la aplicación de las NPs ya sea directo al tallo o en las hojas, ya que respecto al peso húmedo y peso seco obtenidos, se observa que 0.013 ppm ocasionan un decremento al ser exponer a *L. sativa* durante 6 semanas mediante aspersión foliar, mientras que al aplicar las NPs directamente sobre el tallo, éstas presentan un efecto estimulante en el aumento de peso seco y húmedo que es directamente proporcional a la concentración aplicada, es decir, entre mayor concentración, mayor es el contenido de biomasa presente.

Mientras que para el contenido de clorofila, en la exposición foliar a 0.013 ppm aumentaba el porcentaje obtenido, a 1.3 ppm se daba un decremento significativo. Por otro lado, para la exposición directa, un aumento en la concentración de las NPs propiciaba también un aumento en el contenido de clorofilas dependiente también del tiempo de exposición.

Los efectos en la elongación de raíz y tallo al aplicar NPs durante 6 semanas en sustrato e hidroponía se muestran en la figura 4.5. El análisis ANOVA realizado mostró diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos empleados para las variables de respuesta evaluadas. Un efecto estimulante en el crecimiento del tallo, dependiente de la concentración fue observado al adicionar 0.013 y 1.3 ppm de AgCl/Ag NPs en la exposición directa al tallo, caso contrario al aplicarlas en las hojas, ya que en este caso mostraron un efecto adverso proporcional a la concentración aplicada, siendo el mismo efecto para el tallo.

Tabla 4.4 Prueba de exposición después del trasplante en sustrato. Efecto en peso húmedo, peso seco y contenido de clorofila a, b y c al ser expuestas a 0.013 y 1.3 ppm de AgCl/Ag NPs durante 6 semanas por contacto directo sobre el tallo y aspersión foliar

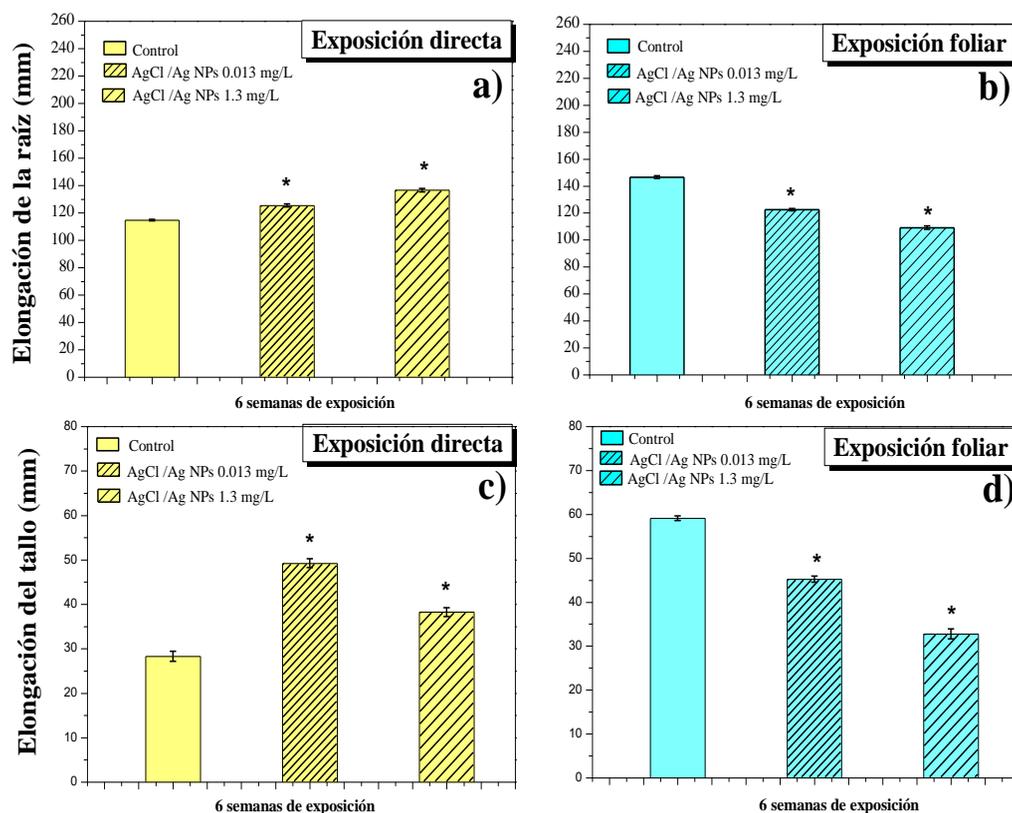
Variables	Tratamientos					
	Control		AgCl/Ag NPs			
	0 mg/L (H)		0.013 mg/L (P)		1.3 mg/L (P)	
Tiempo de exposición: 3 semanas						
	Foliar	Directa	Foliar	Directa	Foliar	Directa
Clorofila a	16.3555	4.96648	24.73016	3.33764	9.58362	9.17747
Clorofila b	13.20706	3.84854	31.7042	2.1666	24.84854	6.98878
Clorofila c	5.07988	1.50936	48.92768	1.60976	0.053	2.3019
Tiempo de exposición: 6 semanas						
P. húmedo	194.46 ± 0.07	163.28 ± 0.30	192.77 ± 0.06*	187.22 ± 0.16*	195.82 ± 0.08*	239.31 ± 0.30*
P. seco	17.7 ± 0.38	14.40 ± 0.42	16.38 ± 0.38	17.36 ± 0.47	19.20 ± 0.01	20.45 ± 0.28
Clorofila a	6.11049	6.18202	6.17962	6.15289	5.18109	8.73947
Clorofila b	4.97904	4.20004	3.8796	4.46126	3.77124	4.23298
Clorofila c	6.20818	6.857	12.65732	9.57986	3.46986	3.6271

Los datos de peso húmedo y peso seco corresponden al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo, (\pm desviación estándar), los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey. (P): precipitado de NPs resultantes de los lavados; (H): Agua desionizada.

Con respecto a la elongación del tallo en la exposición directa, se observó de igual manera un efecto estimulante en su crecimiento, siendo 0.013 ppm la que propiciaba aún más su crecimiento, respecto a la concentración más alta evaluada.

Figura 4.5 a) Efecto en la elongación de la raíz de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 1,3 ppm de AgCl/Ag NPs durante 6 semanas directo al tallo de la plántula y b) por aspersión foliar c) Efecto en la elongación del tallo de *L. sativa* al ser expuesta a 0.013, 0.13, 1,3 y 13 ppm de sobrenadante y precipitado de AgCl/Ag NPs durante 4 y 10 semanas, directo al tallo de la plántula y d) por aspersión foliar. Los datos con asterisco (*) representan diferencias estadísticamente significativas a $p < 0.01$ comparadas con el control, mediante la prueba de Tukey, correspondientes al promedio de 3 repeticiones realizadas para cada ensayo.

a) Evaluación de la adición de NPs a plántulas de *L. sativa* después de 4 semanas de crecimiento



4. Discusión

Los efectos fitotóxicos evaluados en los ensayos *in vitro* demostraron que la toxicidad de las NPs es dependiente de la concentración, tamaño y tipo de contacto que tengan las AgCl/Ag NPs sintetizadas, tal como se ha reportado para partículas obtenidas por métodos químicos, como reportan Hong et al. (2005) que evaluaron la adición de NPs de TiO₂ sobre *Spinacia oleracea*, los resultados mostraron que al tratar las plántulas con 0.25% de NPs de TiO₂ aumentaba el peso fresco y seco, la clorofila *a* y *b* y la tasa fotosintética con respecto a los controles, sin embargo, por encima de 0.4 % disminuían las características fisiológicas en gran medida.

Así mismo, el trabajo reportado por Iram et al. (2014) que reportan el efecto de Ag NPs de 6 nm, obtenidas a partir del glicoxilano empleado como agente reductor, extraído de *Mimosa pudica*, donde las Ag NPs mostraron un efecto estimulante en el crecimiento de raíz, dependiente de la concentración, ya que al exponer las plántulas a las concentraciones más altas de 27 µg/mL presentaban inhibición en la elongación de la raíz, mientras que a la concentración más baja; 13.5 µg/mL, se encontraba el efecto estimulante.

Thuesombat, Hannongbua, Akasit, & Chadchawan (2014), demostraron el efecto dependiente de la concentración y tamaño al evaluar Ag NPs sobre la germinación de *Oryza sativa*. La germinación de las semillas y el posterior crecimiento de las plántulas disminuyeron conforme el tamaño y concentración de Ag NPs aumentaba. La exposición de las plántulas a las concentraciones más altas de NPs entre 100 y 1000 ppm y el rango de diámetro de 20-150 nm aumentaba el nivel de inhibición de la germinación y posterior crecimiento de las plántulas, debido principalmente a la penetración y transporte de NPs a través de los tejidos de la planta.

Como se observa, el tamaño y concentración de NPs están directamente relacionados con la reactividad interfacial y la capacidad de atravesar las barreras fisiológicas. En varios estudios se ha demostrado que la absorción y fitotoxicidad de las NPs son dependientes del tamaño de partícula, con tamaños de partícula más pequeños generalmente existen niveles de acumulación más altos, teniendo como consecuencia una mayor toxicidad en comparación con los mismos materiales a granel, tal como se observó para la sal precursora, que demostró un menor efecto que las NPs evaluadas a la misma concentración.

Con los ensayos de toxicidad *in vivo* se pusieron en evidencia los efectos, de medio en el que se ponen en contacto las NPs, tiempo de exposición y forma en la que se apliquen las partículas. Además, la respuesta de la toxicidad de las partículas evaluadas difiere a los estudios en placas Petri, ya que las mismas concentraciones evaluadas, mostraron efectos estimulantes en el crecimiento de raíz y tallo al exponerlas en sustrato mientras que en los ensayos *in vitro* disminuían hasta un 50% su elongación.

Tal efecto fue reportado por Lee et al. (2012), al evaluar Ag NPs recubiertas de citrato, en estado coloidal con tamaño de partícula de 5-25 nm y moda de 10 nm sobre *Phaseolus radiatus* y *Sorghum bicolor*, el estudio fue realizado en placas Petri con agar-agar y un suelo artificial, sus resultados mostraron efectos adversos sobre el crecimiento de las plántulas, dependientes de la concentración, a 40 mg/L el porcentaje de crecimiento de *P. radiatus* y *S. bicolor* respecto al control era de 20 y 47%, detectando signos de necrosis en las raíces de ambas plantas, mientras que para los ensayos en suelo fue de alrededor del 20% con 2000 mg/kg de suelo seco. Los autores mencionan que estos efectos pueden ser debido a cambios en las propiedades fisicoquímicas de las NPs en suelo, y la tendencia a la aglomeración de las partículas, es posible que los agregados fueran más grandes que el tamaño de poro de la célula de la raíz de la planta, y así algunos agregados no pasaron a través de las células de la planta.

Una mayor agregación puede ser la principal razón para la reducción de la fitotoxicidad de los Ag NPs en suelo que en el estudio *in vitro*. Además, en el presente trabajo, las NPs pueden ser absorbidas por la superficie de vermiculita, que puede retener más Ag debido a su alta capacidad de intercambio catiónico. Por otro lado, la plata tiende a formar enlaces S-Ag-S por unión con azufre inorgánico y orgánico, por lo que se redujeron las cantidades de nanopartículas disponibles para las plantas.

Las plantas tienden a responder de forma morfológica y fisiológica a las condiciones ambientales en las que se desarrollan, modificando la velocidad de crecimiento, la producción de estructuras secundarias y la cantidad de pigmentos entre otras características. La clorofila, responsable de la fotosíntesis, donde la energía lumínica es transformada en energía química por plantas, algas y algunas bacterias, se considera una medida indirecta del estado nutricional de la planta. Los factores exógenos importantes para que se lleve a cabo la transformación lumínica son: energía radiante, humedad, temperatura y estrés hídrico. Las plantas sometidas a cualquier tipo de estrés tienden a perder capacidad fotosintética y disminuir el contenido de clorofila de sus hojas.

5. Conclusiones

La concentración, tamaño, y tipo de exposición de AgCl/Ag NPs que se aplique durante la germinación está directamente relacionada con la elongación de radícula, hipocótilo y biomasa de las plántulas de *L. sativa*. En las pruebas de toxicidad en cajas Petri, se observó que 1.3 ppm son suficientes para ocasionar un decremento significativo en las características fisiológicas, en comparación con el control, mientras que 0.013 ppm ocasiona un efecto estimulante en el tamaño de raíz. La toxicidad de las NPs se ve disminuida al aplicarla sobre un suelo artificial, el contenido de clorofila como factor de estrés se ve mayormente afectado con 1.3 ppm, el peso seco, peso húmedo elongación de raíz y tallo se ven influenciados por el tiempo y tipo de contacto que se tenga con las NPs, siendo la exposición en hidroponía y foliar las que se ven mayormente afectadas conforme aumenta a concentración de NPs aplicada. Un buen entendimiento de las propiedades fisicoquímicas de las NPs ayuda a relacionar los efectos que las partículas pueden presentar en el medio, es por ello que es de vital importancia su caracterización para alertar los posibles riesgos a los que se exponen los sistemas biológicos y de manera indirecta, a los seres humanos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACyT por la beca de MGYC y por el apoyo al proyecto INFR 2018 (294909). También agradecen al M.M. R. González Montes de Oca (LaNBA-UPP) y a la Dra. M.A. Hernández-Pérez (ESIQUIE-IPN) por los análisis realizados.

Referencias

- Al-huqail, A. A., Hatata, M. M., Al-huqail, A. A., & Ibrahim, M. M. (2017). Preparation, Characterization of silver Phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.013>
- Auffan, M., Rose, J., Wiesner, M. R., & Bottero, J. Y. (2009). Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution*, 157(4), 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.10.002>
- Balalakshmi, C., Gopinath, K., Lokesh, R., Arumugam, A., Naiyf, S., Kadaikunnan, S., Benelli, G. (2017). Green synthesis of gold nanoparticles using a cheap *Sphaeranthus indicus* extract: Impact on plant cells and the aquatic crustacean *Artemia nauplii*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.06.040>
- Cecilia Sobrero, M., & Ronco, A. (2008). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de *Lactuca sativa* L. In *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México*. Vol. 39, pp. 561–563. México.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., & Roberts, E. H. (1985). *Handbook_of_seed_technology_for_genebanks_433.pdf*. In *Handbook of seed technology for genebanks. Volume 1. Principles and methodology* (p. 210). Italy: International Board for Plant Genetic Resources. Handbooks for Genebanks, No. 2.
- Farghaly, F. A., & Nafady, N. A. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of *Rosmarinus officinalis* and Its Effect on Tomato and Wheat Plants. *Journal of Agricultural Science*, 7(11), 277–287. <https://doi.org/10.5539/jas.v7n11p277>

- Garg, P., & Malik, C. P. (2014). Influence of Nanoparticles on Seed Germination and Seedling Growth of *Vigna radiata* L., 4(1), 1–12.
- Gopinath, K., Venkatesh, K. S., Ilangoan, R., Sankaranarayanan, K., & Arumugam, A. (2013). Green synthesis of gold nanoparticles from leaf extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced mitotic cell division and pollen germination activity. *Industrial Crops & Products*, 50, 737–742. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.060>
- Greene, J. C., Bartels, C. L., Warren-Hicks, W. J., Parkhurst, B. R., & Linder, G. L. (1988). *Protocols for short-term toxicity screening of hazardous-waste sites*. United States.
- Hong, F., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L., & Yang, P. (2005). Effect of Nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*, 105(1–3), 269–279. <https://doi.org/10.1385/BTER:105:1-3:269>
- Iram, F., Iqbal, M. S., Athar, M. M., Saeed, M. Z., Yasmeen, A., & Ahmad, R. (2014). Glucoxylation-mediated green synthesis of gold and silver nanoparticles and their phyto-toxicity study. *Carbohydrate Polymers*, 104(1), 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.002>
- Jayarambabu, N., & Rao, K. V. (2016). Journal of Scientific Zinc Oxide Nanoparticles Synthesized From *Curcuma Longa* Extract for Seed Germination, (January), 1–6. <https://doi.org/10.20448/journal.510/2016.3.1/510.1.70.74>
- Kim, D., Saratale, R. G., Shinde, S., Syed, A., Ameen, F., & Ghodake, G. (2017). SC. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.123>
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., & Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications – An updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 473–484. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.11.013>
- Lee, W. M., Kwak, J. Il, & An, Y. J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86(5), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.10.013>
- Malathi, S., & Palani, P. (2016). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles and its impact on the germination of *Solanum Lycopersicum* L., 343–346.
- Moorthy, S. K., Ashok, C. H., Rao, K. V., & Viswanathan, C. (2015). MgO nanoparticles by *Neem* leaves through green method. *Materials Today: Proceedings*, 2(9), 4360–4368. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.10.027>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Ndeh, N. T., Maensiri, S., & Maensiri, D. (2017). The effect of green synthesized gold nanoparticles on rice germination and roots *, (8), 10.
- Parveen, A., & Rao, S. (2014). Effect of Nanosilver on Seed Germination and Seedling Growth in *Pennisetum glaucum*. <https://doi.org/10.1007/s10876-014-0728-y>
- Sabir, S., Arshad, M., Satti, S. H., Tayyaba, B., & Farqaulit, F. (2018). Effect of green synthesized silver nanoparticles on seed germination and seedling growth in wheat, 12(4), 1–7.
- Sahayaraj, K., & Rajesh, S. (2015). Bionanoparticles: synthesis and antimicrobial applications, (September), 228–244.

- Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., Yadav, V., & Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nano zinc oxide and evaluation of its impact on germination and metabolic activity of *Solanum lycopersicum*. *Journal of Biotechnology*, 233, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.010>
- Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., & Lee, E. J. (2013). Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033>
- Thuesombat, P., Hannongbua, S., Akasit, S., & Chadchawan, S. (2014). Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104(1), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.022>
- Trinh, N. D., Nguyen, T. T. B., & Nguyen, T. H. (2015). Preparation and characterization of silver chloride nanoparticles as an antibacterial agent. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 6(4). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/6/4/045011>
- Villanueva-Ibáñez, M., Yañez-Cruz, M. G., Álvarez-García, R., Hernández-Pérez, M. A., & Flores-González, M. A. (2015). Aqueous corn husk extract - Mediated green synthesis of AgCl and Ag nanoparticles. *Materials Letters*, 152(August), 166–169. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.03.097>
- Yañez Cruz, M. G., Villanueva Ibáñez, M., Álvarez García, R., Flóres González, M. A., Tovar Jiménez, X., Cadena Ramírez, A., & Hernández Pérez, M. de los Á. (2017). Influencia del método de obtención del extracto de perfolia de maíz en la biosíntesis de nanoestructuras de AgCl/Ag y fitotoxicidad en plántulas de *Latuca sativa* L. var. *longifolia*. *Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología*, 1(1), 20–25.
- Yugandhar, P., & Savithramma, N. (2016). Green synthesis of calcium carbonate nanoparticles and their effects on seed germination and seedling growth of *Vigna mungo* (L.). Hepper. *International Journal of Advanced Research*. 1(8), 89-103.

Proceso de identificación automática de la región de interés en imágenes de larvas de mosquito de cuarto estadio, con fines de clasificación e identificación entre especies de vectores entomológicos

Process of automatic identification of the region of interest in images of fourth stage mosquito larvae, for the purpose of classification and identification among species of entomological vectors

LUGO-RODRÍGUEZ, Pamela†*, MORENO-ALVARADO, Rodolfo, CUATEPOTZO-JIMENEZ, Vanessa, SIMANCAS-ACEVEDO, Eric y ROBLES-CAMARILLO Daniel

Universidad Politécnica de Pachuca, Posgrado UPP, MTIC

ID 1^{er} Autor: *Pamela, Lugo-Rodríguez* / **ORC ID:** 0000-0002-3181-9487, **Researcher ID Thomson:** T-3496-2018, **CVU CONACYT ID:** 783952

ID 1^{er} Coautor: *Rodolfo, Moreno-Alvarado* / **ORC ID:** 0000-0001-8378-3941, **Researcher ID Thomson:** T-3577-2018, **CVU CONACYT ID:** 331535

ID 2^{do} Coautor: *Vanessa, Cuatepotzo-Jiménez* / **ORC ID:** 0000-0003-4769-900X, **Researcher ID Thomson:** U-5616-2018, **CVU CONACYT ID:** 938554

ID 3^{er} Coautor: *Eric, Simancas-Acevedo* / **ORD ID:** 0000-0001-7823-709X, **Researcher ID Thomson:** T-4733-2018, **CVU CONACYT ID:** 38750

ID 4^{to} Coautor: *Daniel, Robles-Camarillo* / **ORC ID:** 0000-0002-7637-5904, **Researcher ID Thomson:** T-4560-2018, **CVU CONACYT ID:** 161666

P. Lugo, R. Moreno, V. Cuatepotzo, E. Simancas y D. Robles

*pamelalugo.23@micorreo.upp.edu.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biologicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

The female of the mosquito of the genus *Aedes*, is considered the main carrier of the dengue virus, chikungunya fever, zika, and others. So, in support to the efforts made by the health authorities of the State of Hidalgo, it is intended to develop an Information Technologies system to identify in an automatic way mosquito larva at the species level. To achieve automation it is necessary to apply image processing techniques to the images of larvae, these techniques have as objective that the region of interest of the body of the larva that specifically is the region where the physiological characteristics are found can be determined automatically and in the same way for each image and thus use it as a training dataset to some classification algorithm that allows identified larvae.

ROI, Larvas, Imágenes, TRD, Identificación, Mosquitos

1 Introducción

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas y provocan cada año más de 700 000 defunciones; los vectores son organismos vivos que pueden transmitir enfermedades infecciosas entre personas, o de animales a personas, los mosquitos son los vectores de enfermedades mejor conocidos (World Health Organization, 2017), siendo identificados en el 2015 como el primer lugar de los animales más letales del mundo con 830 000 de muertes al año (WHO, Crocodile-attack, Kasturiratne, FAO, 2015). El mosquito del género-especie *Aedes aegypti* es considerado el principal vector portador de enfermedades como Zika, chikungunya y dengue, aunque también han sido encontradas en otras especies del género *Aedes albopictus* (Uribarren, 2017).

Estos vectores se distribuyen principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Beltrán-Silva, Chacón-Hernández, Moreno-Palacios, & Pereyra-Molina, 2016), por lo que la ubicación geográfica de México permite un hábitat favorable para el desarrollo y supervivencia de éstos (INEGI, 2017), en el estado de Hidalgo se cuenta con el programa de prevención, promoción y control de enfermedades transmitidas por vectores el cual consiste en brigadas de recolección de muestras en las jurisdicciones sanitarias de los municipios, las cuales después de ser recolectadas son enviadas al laboratorio estatal de salud pública de Hidalgo (LESPH) donde los biólogos expertos en entomología, clasifican cada una de las larvas, identificando las características fisiológicas de los organismos, conocido como peine, el cual puede presentarse como un parche semi triangular de espinas, o una hilera de espinas, dependiendo la especie (Ibañez-Bernal, S Martínez-Campos, 1994), mediante la visualización de éstos en su etapa larvaria de cuarto estadio, dichas características únicamente pueden observarse haciendo uso de un microscopio y para determinar la especie a la que pertenece se comparan estas características con claves de identificación de mosquitos, por ejemplo Zootaxa o claves de identificación del instituto nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicos.

Así en apoyo a los esfuerzos realizados por las autoridades de salud se pretende desarrollar un sistema de Tecnologías de Información que mediante fotos de microscopio identifique a nivel de especie las larvas de mosquito, reduciendo los tiempos de procesamiento y emisión de resultados del área de entomología del LESP.

El primer paso para este sistema, es identificar las características fisiológicas de las larvas, lo que se conoce como región de interés. Para lograr la extracción de esta región de interés (ROI, por sus siglas en inglés), es necesaria la estandarización del método de captura de la imagen, además de la aplicación de algoritmos de procesamiento de imágenes que serán explicados a detalle en este capítulo, los cuales permitirán extraer la ROI con el fin de que ésta sea usada como entrada de algún algoritmo inteligente que permita clasificar a las larvas.

2. Método de Captura de Imagen

La estandarización del método de captura es una de las partes esenciales para la identificación de la ROI, aunque se realizaron pruebas con imágenes de mosquitos obtenidas mediante técnicas de captura diferente, los resultados óptimos se obtuvieron a partir de las imágenes cuyo método de captura fue normalizado, esta normalización incluye la utilización de un dispositivo único de captura, controlar condiciones de iluminación, forma de captura (ángulo, distancia) y algunos otros materiales que permiten obtener una imagen adecuada para el sistema.

2.1 Cámara utilizada

Para el presente desarrollo se utilizó una cámara tipo “microscopio digital USB” de la marca CoolingTech figura 5.1, la cual cuenta con un sensor de imagen CMOS, rango de enfoque óptico de 0 mm a 40 mm y rango de acercamiento óptico manual de 50X a 500X, con conexión USB “B”, compatible con sistema operativo Windows.

Se hizo uso del software distribuido por el fabricante para calibrarla previamente con los siguientes parámetros de captura, mismos que se recomiendan para mejores resultados en la aplicación del proceso: Compensación de brillo neutra, compensación de contraste al 50%, matiz neutro, saturación al 64%, nitidez al 50%, corrección gamma al 50% y sin compensación de la luz de fondo.

Figura 5.1 Microscopio digital USB



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

2.2 Iluminación

Para evitar ruido en la imagen o diferencias provocadas por efecto de la iluminación ambiental, se ha usado una caja abierta plegable de polipropileno color blanco con dimensiones: 0.22 m x 0.23 m x 0.24 m, como estudio fotográfico portátil (sin marca disponible). Sobre las paredes al interior de la caja se instaló un módulo de lámparas LED ultrabrillante blanco marca Mitsu modelo MLM-5050WH, el montaje descrito se aprecia en la figura 5.2.

Figura 5.2 Caja de iluminación



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

2.3 Otros materiales

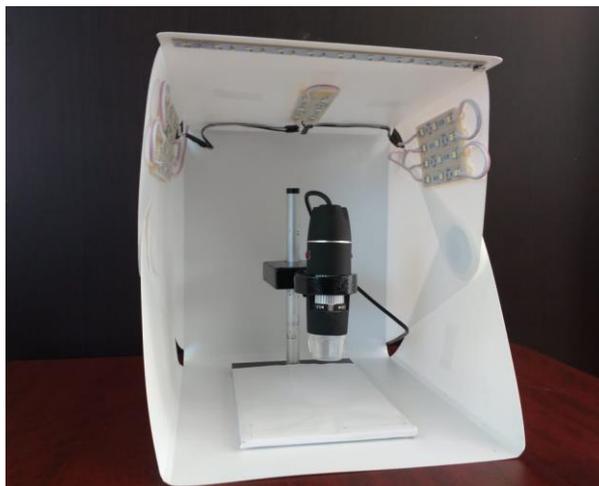
Otros materiales que se utilizaron para la preparación de los especímenes y la correspondiente obtención de las imágenes son:

- Pinzas Kelly curvas: Se utilizan para poder extraer a la larva del recipiente donde están alojadas desde su recolección, para colocarlas bajo el microscopio.
- Portaobjetos: Este se utiliza para ubicar a la larva bajo la cámara.
- Papel couché acabado mate: Por las características de las larvas, es necesario utilizar un fondo blanco para poder minimizar el ruido del ambiente al momento de capturar la foto, además el fondo debe contar con la característica de no ser poroso ni brillante para evitar reflejos de las lámparas LED, por ello las características del papel couché acabado mate, permiten que éste sea ideal para ser utilizado como fondo de la imagen, colocándose sobre la base del soporte de la cámara por debajo del portaobjetos.

2.3 Forma de Captura

Para capturar la foto es necesario que la cámara esté montada en el soporte que distribuye el mismo fabricante de la cámara para mantenerla fija e inmóvil en posición vertical, así mismo ésta debe estar dentro de la caja de iluminación con todos los módulos LED encendidos, la separación entre la cámara y el portaobjetos debe ser la mínima, prácticamente apoyada en el portaobjetos, así mismo es necesario que al colocar la larva en el portaobjetos, se agregue una gota de alcohol, con el fin de que la larva no se deshidrate, en la figura 5.3 se incluye una imagen del equipo de captura descrito.

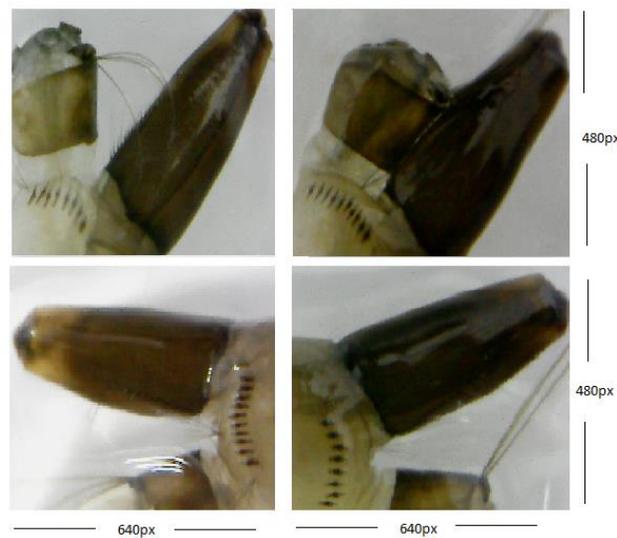
Figura 5.3 Equipo de captura



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

3. Desarrollo de algoritmos

Después de obtener la captura digital, la imagen que se obtiene debe tener el tamaño de 480 pixeles de altura por 640 pixeles de largo, con mapa de color estándar RGB de 8 bits y formato PNG; En dicha imagen se deben observar claramente el octavo segmento del abdomen, el sifón y el segmento anal de la larva de cuarto estadio, como se observa en la figura 5.4. Posterior a la obtención de las imágenes con las características mencionadas se pueden aplicar las técnicas de procesamiento de imágenes para obtener la ROI. Antes de comenzar es necesario almacenar una copia de la imagen, sin ninguna técnica aplicada.

Figura 5.4 Imágenes Capturadas

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

3.1 Binarizado

El primer paso propuesto es el binarizado de la imagen. Es una técnica que consiste en la realización de un barrido en la matriz de la imagen digital recursivamente, con el fin de que el proceso produzca la reducción a dos únicos valores en resolución binaria de 8 bits: negro (0) y blanco (255), dicho en otras palabras, un sistema binario de ausencia y presencia de color 0-1. La comparación de cada píxel de la imagen está determinada por el umbral de sensibilidad (valor $T = \text{Threshold}$), los valores que sean mayores que el umbral tendrán asignado el valor 255 (blanco) y los píxeles con valor numérico debajo del umbral se asignarán con 0 (negro) (Magro, 2013), para este trabajo se considera un umbral de 0.5, la figura 5.5 muestra el resultado del proceso mencionado.

$$G(x, y) = \begin{cases} 0 & \text{si } g(x, y) < T \\ 1 & \text{si } g(x, y) \geq T \end{cases} \quad (1)$$

(Magro, 2013)

Figura 5.5 Imagen original y binarizada

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

3.2 Cerradura morfológica

La morfología matemática se basa en el estudio de la geometría y forma mediante métodos matemáticos, el objetivo esencial es la extracción de estructuras geométricas mediante la utilización de un conjunto conocido como elemento estructura, la forma y tamaño del elemento estructura se elige de acuerdo a la extracción de formas que se desean obtener (Mart, Mej, M, & Mart, 2015).

La dilatación binaria es conocida como de expansión, se usa para rellenar huecos de tamaño igual o menor que el elemento estructura. Por otra parte, también existe la erosión, que es la operación inversa a la dilatación, actúa reduciendo la imagen, se utiliza para eliminar islas de menor tamaño que el elemento estructura.

La operación combinada de dilatación y erosión es llamada cierre o cerradura, y este produce que la dilatación rellene las estructuras que la erosión no puede eliminar. Los contornos de los objetos también serán suavizados, pero habiendo rellanado las fisuras (Mart et al., 2015).

$$A \cdot B = (A \oplus B) \ominus B \quad (2)$$

(Mart et al., 2015)

Una vez que la imagen ha sido binarizada, la siguiente técnica que se necesita es la cerradura morfológica, cuya función ya ha sido explicada. Ésta técnica se aplica con el fin de obtener un objeto de interés con menos imperfecciones originadas en la captura a causa de factores no controlados por la normalización.

Es necesario aclarar que por ahora la ROI será todo el octavo segmento de la larva. Para la cerradura morfológica se hace uso de una estructura de disco de diferente tamaño para ambas operaciones (dilatación y erosión), esta estructura depende del área de la ROI en relación con el área total de la imagen, usando una estructura disco como se indica en la tabla 5.1, al terminar este paso es necesario generar un respaldo de la imagen con los resultados obtenidos hasta este punto. De modo que se cuenta con imágenes almacenadas que corresponden a la imagen original y la cerradura morfológica. Con esta técnica se obtienen imágenes como la que se muestra en la figura 5.6.

Tabla 5.1 Tamaño de disco según área

Tamaño de disco	Valor de area
75	área ≤ 36% de la imagen total
45	36% < área ≤ 47% de la imagen total
5	47% < área ≤ 52% de la imagen total
Sin Cerradura	52% < área

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Figura 5.6 Imagen binarizada e imagen con Cerradura



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

3.3 Transformada rápida de distancia

La transformada rápida de distancia (TRD) es un operador que normalmente solo se aplica a imágenes binarias. El resultado de la transformación es una imagen en escala de grises que parece similar a la imagen de entrada, excepto que las intensidades de grises de los puntos dentro de las regiones de primer plano se cambian para mostrar la distancia hasta el límite más cercano de cada punto (Mart et al., 2015), algunas de las funciones más comunes para obtener medidas de distancia son la euclidiana, City-block y la ChessBoard.

Por su parte la TRD, no necesita las funciones para obtener medidas que se mencionan anteriormente, existe un teorema que explica lo siguiente (Ramírez, 2011):

Teorema: Si d es una de las métricas d_4 , d_8 , d_{6R} , d_{6L} , y $N(c) = \{p_i \in \mathbb{Z}^2 \mid d(c, p_i) = 1\}$, para $c, p_i \in \mathbb{Z}^2$ y $c \neq p_i$ se tiene que:

$$1. d(c, p) = \min\{d(p, p_i) : p_i \in N(c)\} + 1$$

$$2. d(c, p) = \max\{d(p, p_i) : p_i \in N(c)\} - 1$$

Con este teorema se puede definir lo siguiente: Sí se tiene la TRD de los vecinos de c se puede encontrar la transformación de distancia $\delta(c)$, donde (Ramírez, 2011):

$$\delta(c) = \min\{\delta(c) + 1\} \quad (3)$$

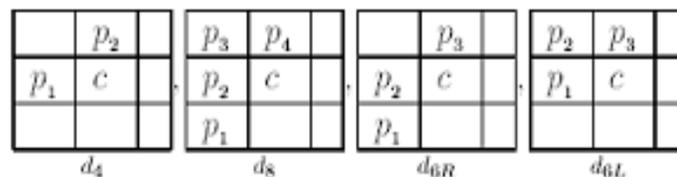
ahora se tiene la una transformada de distancia en 2 pasos:

1. Barrer la imagen binaria de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha. Para cada pixel $c \in R$, donde R es la región de interés, se asigna (Ramírez, 2011):

$$\delta(c) = 1 + \min(\delta(p_j) : p_j \in E) \quad (4)$$

Donde E es alguno de los siguientes conjuntos

Figura 5.7 Conjunto E según la métrica



Fuente de Consulta: Memorias Asociativas en álgebra min y max robustas al ruido mezclado (Ramírez, 2011)

solo los puntos asignados en E son usados en la primera parte de la transformación.

2. Barrer la imagen binaria de abajo hacia arriba y de derecha a izquierda. Para cada pixel $c \in R$, donde R es la región de interés se asigna:

$$\delta(c) = \min\{\delta(c), 1 + \min(\delta(p_i) : p_i \in D)\} \quad (5)$$

D es alguno de los siguientes conjuntos según la métrica a utilizar; solo los puntos asignados en D son usados para la segunda parte de la transformación:

Figura 5.8 Conjunto D según la métrica

	c	p_2		c	p_3		c	p_2		c	p_3		
	p_1			p_1	p_2		p_1			p_1	p_2		
	d_4		d_5		d_{6R}		d_{6L}						

Fuente de Consulta: Memorias Asociativas en álgebra min y max robustas al ruido mezclado (Ramírez, 2011)

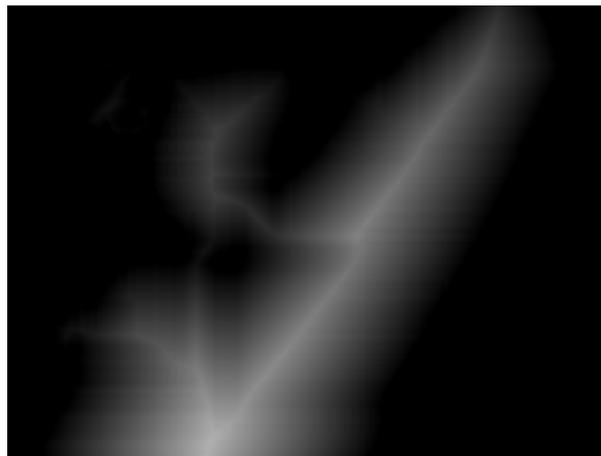
La TRD tiene las siguientes ventajas (Ramírez, 2011):

1. La TRD es mucho más rápida debido a que sólo requiere calcular mínimos en un conjunto de cardinalidad fija.
2. El tiempo de procesamiento es constante para cualquier imagen binaria.

Para esta propuesta se trabaja con la métrica d_4 , para el conjunto E y para el conjunto D , al aplicar esta técnica, como se mencionó anteriormente se obtiene una representación de la imagen en escala de grises en la que cada tono representa la distancia del pixel al borde de la imagen, figura 5.9, una vez obtenida la imagen TRD el siguiente paso es obtener un nuevo contorno del objeto de interés a partir de las distancias calculadas, al seleccionar una distancia menor a la que existe hasta el borde original del objeto nos permite eliminar imperfecciones o detalles que no aportan información sobre el mismo objeto, para obtener el nuevo contorno es necesario encontrar la distancia máxima que existe del centro al contorno y todos los pixeles cuya distancia sea menor o mayor al 17% de la distancia máxima se les asigna un cero, como se muestra en la figura 5.10.

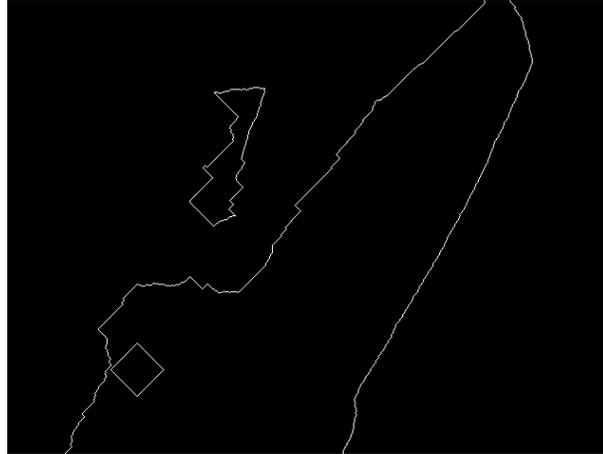
Una vez que se obtiene este contorno, es necesario rellenarlo, esto con el fin de mejorar la binarización, y tener una imagen aún más limpia y con bordes más regulares, como en la figura 5.11; Sí al terminar este proceso el área del objeto de interés disminuye en un 68% se le aplica la cerradura morfológica a la imagen que se guardó como respaldo; al aplicar la cerradura, con un disco de 10 pixeles o sí en la imagen resultante el objeto de interés es menor o igual al 22% del área total de la imagen se le aplica una cerradura morfológica a la imagen binarizada con un disco de 3 pixeles y en ambos casos se vuelve a calcular la TRD de la imagen, el contorno y el relleno, en este punto se puede eliminar la copia de la imagen obtenida al aplicar la cerradura morfológica, y la imagen edición que se ha estado modificando en todos los procesos, y en cambio se trabajará con la imagen obtenida con TRD, la imagen rellenada a partir de TRD y la imagen original.

Figura 5.9 Imagen escala de grises obtenida con TRD



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Figura 5.10 Borde obtenido con TRD



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Figura 5.11 Rellenado de Borde



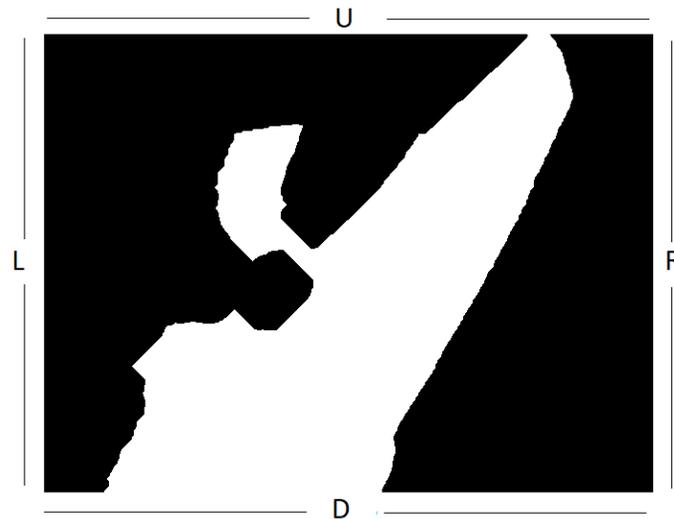
Fuente de Consulta: Elaboración Propia

3.4 Determinar la región de interés

Para determinar la región de interés, es necesario utilizar la imagen en tonos de grises obtenida por TRD a la cual se hará referencia desde ahora como img_{TRD} , la imagen rellena a partir de TRD, a la cual se hará referencia desde ahora como img_{Bin} , y la imagen original que se identificará como img_O , además la región de interés en este punto será la ROI objetivo, que contiene las características fisiológicas de las larvas de mosquitos.

Para el primer paso es necesario identificar donde se encuentra ubicado el cuerpo de la larva dentro de la imagen, para ello se debe identificar los lados de la imagen los cuales se etiquetan como en la figura 5.12.

Figura 5.12 Identificación de lados



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Estas etiquetas permiten ubicar las diferentes combinaciones en las que se puede encontrar el cuerpo de la larva, las combinaciones son:

1. Se encuentra únicamente en L
2. Se encuentra únicamente en R
3. Se encuentra únicamente en U
4. Se encuentra únicamente en D
5. Se encuentra en D y R
6. Se encuentra en D y L
7. Se encuentra en U y R
8. Se encuentra en U y L
9. Se encuentra en U, R y D
10. Se encuentra en U, L, D

Para determinar en qué posición se encuentra el cuerpo de la larva es necesario hacer una suma de los elementos de la imagen `imgBin` únicamente en la columna izquierda, la columna derecha, la fila superior y la fila inferior, dicha suma se almacenará con la etiqueta respectiva de cada posición:

L para la columna izquierda
 R para la columna derecha
 U para la fila superior
 D para la fila inferior

Una vez identificados y obtenida la suma de los extremos, la combinación de donde está situado el octavo segmento se obtiene mediante las siguientes condicionales:

1. Sí la suma de cualquiera de los extremos es superior al 75% de la altura de la imagen a dicho extremo se le asigna por valor un 0. Por ejemplo, las imágenes utilizadas para esta propuesta tienen dimensiones de 480 de altura x 640 de ancho, entonces si L tuviese un valor de 390, al ser 390 mayor a 360 valor que corresponde al 75% de la altura de la imagen, L pasaría a tener un valor de 0, y así con cada uno de los extremos. La razón del 75% es porque al realizar pruebas se observó, que el 87.03% de las imágenes con las que se trabajó que sobrepasan esta medida en cualquiera de los extremos representan que el octavo segmento de la larva se encuentra en una posición donde la parte del sifón o el segmento anal, están localizados en los extremos lo que significa que dicho extremo nos daría coordenadas incorrectas de la ROI.
2. Para asignar valores a las combinaciones DR, DL, UR y UL se deben cumplir las siguientes condiciones:

Para DR:

- a. R debe tener un valor asignado diferente de cero.
- b. Si R es mayor a D, D debe ser mayor o igual al 60% de R, en caso contrario R debe ser mayor o igual al 60% de D, en ambos casos el valor asignado a DR es igual a D+R.
- c. El valor asignado a DR debe cumplir con el punto 1, si DR supera el 75% de la altura de la imagen su valor se convierte en 0.

Para UR:

- a. R debe tener un valor asignado diferente de cero.
- b. Si R es mayor a U, U debe ser mayor o igual al 60% de R, en caso contrario R debe ser mayor o igual al 60% de U, en ambos casos el valor asignado a UR es igual a U+R.
- c. El valor asignado a UR debe cumplir con el punto 1, si UR supera el 75% de la altura de la imagen su valor se convierte en 0.

Para LR:

- a. L debe tener un valor asignado diferente de cero.
- b. Si L es mayor a D, D debe ser mayor o igual al 60% de L, en caso contrario L debe ser mayor o igual al 60% de D, en ambos casos el valor asignado a DL es igual a D+L.
- c. El valor asignado a DL debe cumplir con el punto 1, si DL supera el 75% de la altura de la imagen su valor se convierte en 0.

Para UL

- a. L debe tener un valor asignado diferente de cero.
 - b. Si L es mayor a U, U debe ser mayor o igual al 60% de L, en caso contrario L debe ser mayor o igual al 60% de U, en ambos casos el valor asignado a UL es igual a U+L.
 - c. El valor asignado a UL debe cumplir con el punto 1, si UL supera el 75% de la altura de la imagen su valor se convierte en 0.
3. Para asignar valores a las combinaciones URD, ULD se deben cumplir las siguientes condiciones:
- a. Si el valor absoluto de U-D menor o igual a 30, y R es mayor que L, a URD se le asigna la suma U+D.
 - b. Si el valor absoluto de U-D menor o igual a 30, y L es mayor que R, a ULD se le asigna la suma U+D.

Hasta este punto se ha asignado un valor a cada etiqueta de posiciones, el paso siguiente es determinar cuál de las 10 etiquetas tiene asignado el valor numérico más grande, y una vez determinado se realizan los siguientes pasos, para cada una de las opciones se trabaja con la imagen imgBin e imgTRD:

1. Si L es el más grande:
 - a. En la imagen imgBin en el extremo L, se buscan todos los pixeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
 - b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un pixel en blanco, y también se identifica la coordenada máxima, que representa la última coordenada o coordenada final donde se encuentra un pixel en blanco. Estas coordenadas representan las coordenadas donde inicia y termina el octavo segmento de la larva, por lo que serán las coordenadas de corte.

Para los siguientes pasos se trabaja con imgTRD

- c. Si la coordenada final, excede el tamaño de imgTRD, se asigna como coordenada final, el valor del tamaño de imgTRD,

- d. Se suman todas las filas existentes de `imgTRD` entre las coordenadas de corte, de este proceso se obtiene el mismo número de resultados que el de las filas existentes entre las coordenadas de corte, se selecciona el mayor de estos resultados, y a la fila que obtuvo ese valor, se le suma el valor de la coordenada inicial, esto para tomar en cuenta los píxeles en negro y se convierte en la coordenada de “Fila” de nuestra ROI.
- e. Para obtener la coordenada “Columna” de la ROI se suman todas las columnas existentes de `imgTRD` entre las coordenadas de corte, de este proceso se obtiene el mismo número de resultados que el de las columnas existentes entre las coordenadas de corte, se selecciona el mayor de estos resultados, en caso de que la coordenada seleccionada sobre pasa el tamaño de `imgTRD/2`, se asigna como coordenada la coordenada `imgTRD/2` y se convierte en la coordenada de columna de la ROI.

2. Si R es el más grande:

- a. En la imagen `imgBin` en el extremo R, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un pixel en blanco, y también se identifica la coordenada máxima, que representa la última coordenada o coordenada final donde se encuentra un pixel en blanco. Estas coordenadas representan las coordenadas donde inicia y termina el octavo segmento de la larva, por lo que serán las coordenadas de corte.

Para los siguientes pasos se trabaja con `imgTRD`

- c. Si la coordenada final, excede el tamaño de `imgTRD`, se asigna como coordenada final, el valor del tamaño de `imgTRD`,
- d. Se suman todas las filas existentes de `imgTRD` entre las coordenadas de corte, de este proceso se obtiene el mismo número de resultados que el de las filas existentes entre las coordenadas de corte, se selecciona el mayor de estos resultados, y a la fila que obtuvo ese valor, se le suma el valor de la coordenada inicial, esto para tomar en cuenta los píxeles en negro y se convierte en la coordenada de “Fila” de la ROI.
- e. Para obtener la coordenada “Columna” de la ROI se suman todas las columnas existentes de `imgTRD` entre las coordenadas de corte, de este proceso se obtiene el mismo número de resultados que el de las columnas existentes entre las coordenadas de corte, se selecciona el mayor de estos resultados, en caso de que la coordenada seleccionada sea menor que el tamaño de `imgTRD/2`, se asigna como coordenada el tamaño horizontal de `imgTRD` y se convierte en la coordenada de “Columna” de la ROI.

3. Si D es el más grande:

- a. En la imagen `imgBin` en el extremo D, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un pixel en blanco, y también se identifica la coordenada máxima, que representa la última coordenada o coordenada final donde se encuentra un pixel en blanco. Estas coordenadas representan las coordenadas donde inicia y termina el octavo segmento de la larva, por lo que serán las coordenadas de corte.

Para los siguientes pasos se trabaja con `imgTRD`:

- c. Si $R+10$ o $L+10$ es mayor igual a D, se asigna como ultima coordenada el tamaño horizontal de `imgTRD`, en caso contrario si la coordenada final encontrada en punto “a” es mayor a las dimensiones de `imgTRD`, se le asigna el tamaño horizontal de `imgTRD`.
- d. Si L es mayor a 35 y es mayor a R la coordenda inicial es 2, en otro caso si R es mayor a 35 y es mayor que L la coordenada final es el tamaño horizontal de `imgTRD`.
- e. Se suman todas las filas existentes de `imgTRD` entre las coordenadas de corte, de este proceso se obtiene el mismo número de resultados que el de columnas existentes entre las coordenadas de corte, se selecciona el mayor de estos resultados, y a la columna que obtuvo ese valor, se le suma el valor de la coordenada inicial, esto para tomar en cuenta los píxeles en negro y se convierte en la coordenada “Columna” de la ROI

- f. Si la coordenada inicial es igual o mayor al tamaño horizontal $\text{imgTRD}/2-35$ o el punto final es igual o menor al tamaño horizontal $\text{imgTRD}/2-35$ a la coordenada columna se le asigna el valor medio entre la coordenada inicial y la final.
- g. Para identificar la coordenada "Fila", se buscan puntos de corte como en el paso "a" únicamente dentro de la columna seleccionada como coordenada columna, y la coordenada fila corresponde a la coordenada media entre la coordenada inicial y la final.

4. Si U es el más grande:

- a. En la imagen imgBin en el extremo U, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primera coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco, y también se identifica la coordenada máxima, que representa la última coordenada o coordenada final donde se encuentra un píxel en blanco. Estas coordenadas representan las coordenadas donde inicia y termina el octavo segmento de la larva, por lo que serán las coordenadas de corte.

Para los siguientes pasos se trabaja con imgTRD :

- c. Si $R+10$ o $L+10$ es mayor igual a U, se asigna como última coordenada el tamaño horizontal de imgTRD , en caso contrario si la coordenada final encontrada en punto "a" es mayor a las dimensiones de imgTRD , se le asigna el tamaño horizontal de imgTRD .
- d. Si L es mayor a 35 y es mayor a R la coordenada inicial es 2, en otro caso si R es mayor a 35 y es mayor que L la coordenada final es el tamaño horizontal de imgTRD .
- e. Se suman todas las filas existentes de imgTRD entre las coordenadas de corte, de este proceso se obtiene el mismo número de resultados que el de columnas existentes entre las coordenadas de corte, se selecciona el mayor de estos resultados, y a la columna que obtuvo ese valor, se le suma el valor de la coordenada inicial, esto para tomar en cuenta los píxeles en negro y se convierte en la coordenada "Columna" de la ROI
- f. Si la coordenada inicial es igual o mayor al tamaño horizontal $\text{imgTRD}/2-35$ o el punto final es igual o menor al tamaño horizontal $\text{imgTRD}/2-35$ a la coordenada "Columna" se le asigna el valor medio entre la coordenada inicial y la final.
- g. Para identificar la coordenada "Fila", se buscan puntos de corte como en el paso "a" únicamente dentro de la columna seleccionada como coordenada "Columna", y la coordenada "Fila" corresponde a la coordenada media entre la coordenada inicial y la final.

5. Si DR es el más grande:

- a. En la imagen imgBin en el extremo D, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primera coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- c. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño horizontal de imgTRD). Y se asigna como "Columna" a la coordenada que contiene el máximo valor.
- d. En la imagen imgBin en el extremo R, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- e. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primera coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- f. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño vertical de imgTRD), únicamente en el extremo derecho, la coordenada donde se encuentre se convierte en la coordenada "Fila"

6. Si DL es el más grande:

- a. En la imagen imgBin en el extremo D, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- c. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño horizontal de imgTRD). Y se asigna como “Columna” a la coordenada que contiene el máximo valor.
- d. En la imagen imgBin en el extremo L, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- e. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- f. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño vertical de imgTRD), únicamente en el extremo izquierdo, la coordenada donde se encuentre se convierte en la coordenada “Fila”.

7. Si UR es el más grande:

- a. En la imagen imgBin en el extremo U, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- c. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño horizontal de imgTRD). Y se asigna como “Columna” a la coordenada que contiene el máximo valor.
- d. En la imagen imgBin en el extremo R, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- e. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- f. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño vertical de imgTRD), únicamente en el extremo derecho, la coordenada donde se encuentre se convierte en la coordenada “Fila”.

8. Si UL es el más grande:

- a. En la imagen imgBin en el extremo U, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- c. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño horizontal de imgTRD). Y se asigna como “Columna” a la coordenada que contiene el máximo valor.
- d. En la imagen imgBin en el extremo L, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- e. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- f. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño vertical de imgTRD), únicamente en el extremo izquierdo, la coordenada donde se encuentre se convierte en la coordenada “Fila”.

9. Si URD es el más grande:

- a. En la imagen imgBin en el extremo U, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
- b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un píxel en blanco.
- c. En la imagen imgBin en el extremo D, se buscan todos los píxeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.

- d. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un pixel en blanco.
 - e. Se hace una comparación entre la coordenada inicial del punto “b” y la coordenada inicial del punto “c” y se conserva la menor.
 - f. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño horizontal de imgTRD). Y se asigna como “Columna” a la coordenada que contiene el máximo valor.
 - g. La coordenada “Fila” se obtiene a partir del valor máximo en imgTRD de la columna seleccionada.
- 10.** Si ULD es el más grande:
- a. En la imagen imgBin en el extremo U, se buscan todos los pixeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
 - b. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un pixel en blanco.
 - c. En la imagen imgBin en el extremo D, se buscan todos los pixeles con un valor de 255, que representan los blancos, con esto se obtienen las coordenadas de su ubicación.
 - d. Se identifica la coordenada mínima, que representa la primer coordenada o coordenada inicial donde se encuentra un pixel en blanco.
 - e. Se hace una comparación entre la coordenada inicial del punto “b” y la coordenada inicial del punto “c” y se conserva la menor.
 - f. En la imagen imgTRD se busca el valor máximo entre el punto de corte y el final de la imagen (tamaño horizontal de imgTRD). Y se asigna como “Columna” a la coordenada que contiene el máximo valor.
 - g. La coordenada “Fila” se obtiene a partir del valor máximo en imgTRD de la columna seleccionada.
- 11.** Caso Especial:

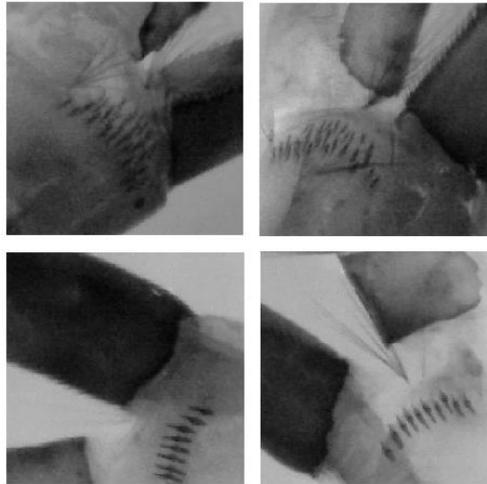
Cuando el octavo segmento de la larva no se encuentre, situado en ninguna de las combinaciones vistas, la forma de encontrar las coordenadas “Fila” y la coordenada “Columna” es la siguiente:

- a. Se hace una suma de todas las columnas, obtenido tantos resultados como columnas tenga la imagen y se encuentra el máximo valor, que se asigna como coordenada “Columna”
- b. Se hace una suma de todas las filas, obtenido tantos resultados como filas tenga la imagen y se encuentra el máximo valor, que se asigna como coordenada “Fila”.
- c. A partir de la coordenada “Fila” se busca en imgTRD, el valor máximo y se compara con la coordenada “Columna” ya asignada, si el valor máximo nuevo es mayor al ya asignado, el valor de coordenada “Columna” se modifica por el nuevo valor, lo mismo ocurre con la coordenada “Fila”.

Una vez identificada la coordenada “Columna” y la coordenada “Fila”, ya se tiene el punto central de nuestra ROI, después de esto se puede asignar una distancia cualquiera, para esta propuesta se asignó una distancia de 180 pixeles, los cuales se restarán y sumarán, horizontal y verticalmente al punto central encontrado, para obtener una región de interés de 360x360, en caso de que al sumar o restar los 180 pixeles a las coordenadas centrales de la ROI, se obtuvieran coordenadas fuera de las dimensiones de la imagen, se toma como coordenada el tamaño de la imagen, y los pixeles sobrantes se asignan del lado contrario para asegurar que la ROI siempre tenga las mismas dimensiones, por ejemplo:

Si el centro de la ROI se encuentra en la coordenada 224,630, con imágenes de dimensión 480x640 se tendría que hacer las siguientes operaciones: $224-180=44$, $224+180=404$ en ninguno de estos casos hay problemas, sin embargo $630-180=450$, $630+180=810$, el 810 es superior al tamaño de la imagen por lo que a $630+180$ se le asigna 640, sobraron por agregar $810-640=170$, así que a los 450 obtenidos al restar $630-180$, se le restan los 170 faltantes $450-170=280$, la ROI resultante es un rectángulo con coordenadas en la esquina inferior izquierda de 404,280 y coordenadas en la esquina superior derecha 44,640.

Después de obtener estas coordenadas se hace el recorte correspondiente a la imagen imgO figura 5.13, obteniendo como resultado la ROI la cual contiene las características fisiológicas de las larvas que sirven para diferenciar entre especies.

Figura 5.13 ROI

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Resultados

Al aplicar los algoritmos propuestos en este trabajo a 413 imágenes de larvas de mosquito, con dimensiones de 480 x 640 se obtuvieron las 413 ROI con dimensiones de 360 x 360, en las que se puede observar las características fisiológicas del octavo segmento, que facilitan la identificación de las larvas de mosquito (peine espicular).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con pruebas de clasificadores, las cuales sirven para comprobar que la región de interés obtenida a partir de los algoritmos propuestos es de utilidad en la identificación de vectores entomológicos.

Las pruebas realizadas se hicieron con 26 imágenes de regiones de interés obtenidas mediante los algoritmos propuestos, de 4 especies diferentes de mosquitos así que se utilizaron:

- 26 imágenes de ROI de *Aedes aegypti*
- 26 imágenes de ROI de *Aedes albopictus*
- 26 imágenes de ROI de *Culex coronator*
- 26 imágenes de ROI de *Ochlerotatus epactius*

Para estas pruebas se hizo uso de los siguientes clasificadores, obtenido el porcentaje de clasificación mostrado:

Tabla 5.2 Clasificadores

Clasificador	Porcentaje de clasificacion
Medium Tree	75.0%
Coarse Tree	51.0%
Linear Discriminant	45.2%
Quadratic Discriminant	46.2%
Linear SVM	45.2%
Quadratic SVM	55.8%
Cubic SVM	58.7%
Fine Gaussian SVM	84.6%
Medium Gaussian SVM	54.8%
Coarse Gaussiam SVM	43.3%

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

El Clasificador Fine Gaussian SVM que obtuvo un 84.6% de porcentaje de clasificacion, arroja las siguientes matrices de confusion:

Figura 5.14 Matriz de confusión

True class	Aegypti	18	2	3	3
	Albopic	1	21	2	2
	CuCoron			25	1
	OchEpac			2	24
		Aegypti	Albopic	CuCoron	OchEpac
		Predicted class			

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Figura 5.15 Matriz de confusión

Model 1.9							
True class	Aegypti	69%	8%	12%	12%	69%	31%
	Albopic	4%	81%	8%	8%	81%	19%
	CuCoron			96%	4%	96%	4%
	OchEpac			8%	92%	92%	8%
		Aegypti	Albopic	CuCoron	OchEpac		
		Predicted class					

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Figura 5.16 Matriz de confusión

True class	Aegypti	95%	9%	9%	10%				
	Albopic	5%	91%	6%	7%				
	CuCoron			78%	3%				
	OchEpac			6%	80%				
		Aegypti	Albopic	CuCoron	OchEpac				
		Positive Predictive Value				95%	91%	78%	80%
		False Discovery Rate				5%	9%	22%	20%
		Predicted class							

Fuente de Consulta: Elaboración Propia

La matriz de confusión de la figura 5.14 muestra el número de imágenes clasificadas correcta e incorrectamente del total de las 26 imágenes utilizadas por especie, en la figura 5.15 se puede apreciar estos mismos datos, pero indicando el porcentaje de clasificación, por último, la figura 5.16 nos muestra una tabla de confusión en la que los porcentajes representan una predicción de clasificación al usar imágenes diferentes al *dataset* de entrenamiento.

Como se puede observar en la tabla de porcentajes y en las matrices de confusión, la máquina de soporte vectorial presenta una mejor clasificación al comparar entre diferentes especies usando la ROI obtenida en este trabajo, alcanzando el porcentaje de clasificación del 84.6%, lo que permite decir que esta región es de utilidad en la clasificación de vectores entomológicos.

Agradecimientos

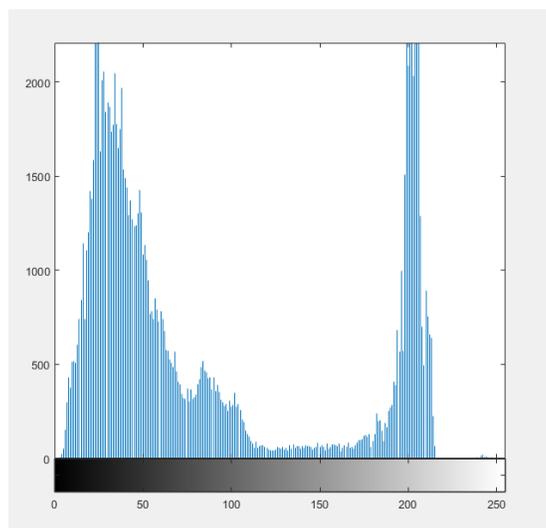
Los autores de este artículo agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo en la realización de esta investigación, a través de la beca nacional número: 451907. A si mismo agradecemos a las autoridades del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Hidalgo (LESPH), especialmente a los biólogos del laboratorio de Entomología por la colaboración que hizo posible esta investigación. Del mismo modo a la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Politécnico Nacional ESIME-Culhuacán, por la asesoría académica para la realización de la investigación.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos y en comparación con el trabajo titulado “Mosquito Larva Classification Method Based on Convolutional Neural Networks” (Sanchez-Ortiz et al., 2017), presentado en el 2017, donde se analiza la clasificación basada en redes neuronales convolucionales y procesamiento de imagen, determinado la región de interés en el octavo segmento, sin hacerlo de manera automática se puede concluir que es posible extraer la región de interés de larvas de mosquito de forma automática y obtener resultados aceptables en la identificación con clasificadores, pero de forma totalmente automática.

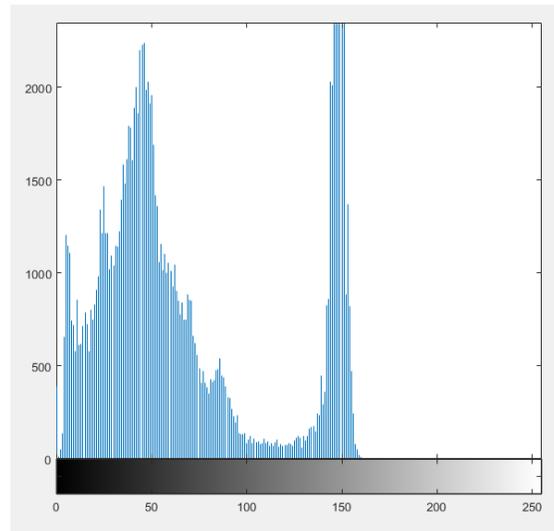
También se puede concluir que, durante las pruebas realizadas para obtener los resultados, se pudo notar que para las imágenes que tienen un histograma como el de la figura 5.17, el método propuesto funciona erráticamente, sin embargo, cuando el histograma de la imagen tiene siguientes características mostradas en la figura 5.18, el método propuesto no tiene ningún problema al extraer la ROI. Se puede observar que en el histograma de la figura 5.17 se tiene una alta concentración de datos, en las zonas más oscuras de la imagen, lo que permite identificar de que se trata de una imagen con una coloración oscura, esta coloración oscura en la larva puede tener diferentes motivos, que pueden originarse incluso desde el momento en que las brigadas de recolección, capturan a las larvas.

Figura 5.17 Histograma donde la ROI no se extrae de forma adecuada



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Figura 5.18 Histograma donde la ROI se extrae de forma adecuada



Fuente de Consulta: Elaboración Propia

Referencias

- Beltrán-Silva, S. L., Chacón-Hernández, S. S., Moreno-Palacios, E., & Pereyra-Molina, J. Á. (2016). Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica Del Hospital General de México*. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.011>
- Ibañez-Bernal, S Martínez-Campos, C. (1994). Clave para la identificación de larvas de mosquitos comunes en las areas urbanas y suburbanas de la republica mexicana. *Folia Entomologia Mexicana*, 92.
- INEGI. (2017). Regiones naturales y biogeografía de México. *Tecnología Educativa*, 38. Retrieved from <http://www.inegi.org.mx/inegi/SPC/doc/internet/regionesnaturalesbiogeografiamexico.pdf>
- Magro, R. (2013). Binarización De Imágenes Digitales Y Su Algoritmia Como Herramienta Aplicada a La Ilustración Entomológica, 3112, 53–443. Retrieved from <http://sea-entomologia.org/PDF/Boletin53/443464BSEA53BinarizacionRMagro.pdf>
- Mart, E., Mej, R. I., M, E. A., & Mart, E. (2015). “Yeztli: Sistema de clasificación de anomalías en eritrocitos para pre diagnóstico de enfermedades mediante análisis de imágenes y reconocimiento de patrones.”
- Ramírez, J. C. S. (2011). Memorias Asociativas en ´ algebra min y max robustas al ruido mezclado.
- Sanchez-Ortiz, A., Fierro-Radilla, A., Arista-Jalife, A., Cedillo-Hernandez, M., Nakano-Miyatake, M., & Robles-Camarrillo, Daniel Cuatepotzo-Jimenez, V. (2017). Mosquito Larva Classification Method Based on Convolutional Neural Networks, 6.
- Uribarren, T. (2017). Dengue, y otras infecciones no hemorrágicas: fiebre chikungunya, zika, fiebre del nilo occidental y otros arbovirus., 23.
- WHO, Crocodile-attack, Kasturiratne, FAO, L. A. de maddalena. (2015). World’s Deadliest Animals. Retrieved from <https://www.gatesnotes.com/Health/Most-Deadly-Animal-Mosquito-Week-2016>
- World Health Organization. (2017). Enfermedades transmitidas por vectores, 1–5. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/>

Detección de Radiación Gamma y Rayos Cósmicos de muy alta energía (>100 GeV)

Detection of Gamma Radiation and Cosmic Rays at Very High Energy (>100 GeV)

DE LA FUENTE, Eduardo*, COTZOMI, Jorge, PÉREZ-PÉREZ, Eucario G., AMBROCIO-CRUZ, Silvia Patricia, GARCÍA-LUNA, José L.

IAM-Departamento de Física, CUCEI, and Information Technologies Ph. D, CUCEA, Universidad de Guadalajara

Facultad de Ciencias Físico Matemáticas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla;

Universidad Politécnica de Pachuca

Escuela Superior de Tlahuelilpan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Departamento de Física, CUCEI, Universidad de Guadalajara

ID 1^{er} Autor: *Eduardo, De La Fuente* / **ORC ID:** 0000-0001-9643-4134, **CVU CONACYT ID:** 36441

ID 1^{er} Coautor: *Jorge, Cotzomi* / **ORC ID:** 0000-0001-9768-1858, **CVU CONACYT ID:** 94883

ID 2^{do} Coautor: *Eucario, Pérez-Pérez* / **ORC ID:** 0000-0001-5998-4938, **CVU CONACYT ID:** 38501

ID 3^{er} Coautor: *Silvia Patricia, Ambrocio-Cruz* / **ORC ID:** 0000-0001-8452-487X, **CVU CONACYT ID:** 253863

ID 4^{to} Coautor: *José, García-Luna* / **ORC ID:** 0000-0002-4901-7773, **CVU CONACYT ID:** 21700

E. De la Fuente, J. Cotzomi, E. Pérez, S. Ambrocio y J.García.

*edfuente@astro.iam.udg.mx

F. Trejo, (Dr.). Ciencias Biológicas y de la Salud, Proceedings-©ECORFAN-México, Pachuca, 2018.

Abstract

In this book chapter, we show a brief overview about Astroparticles and their link with the High Energy Physics. The detection of these Astroparticles, specially at high energies (>100 GeV), requires special techniques and instruments (telescopes or observatories). We focus on Gamma Rays and Cosmic rays as well as on instruments that use water to perform the observation and studies. In addition to this, we show an example of how the Information Technologies (e. g., modeling, and simulations) can be used on this topic to perform maps and produce high impact results. In the latter case is illustrated the fact of summarizing how an unprecedented map of the sky on cosmic rays at 10 TeV was produced, combining data from the Water Cherenkov Detectors (WCDs) HAWC and ICECUBE covering by first time both celestial hemispheres; North and South. Details of these maps are shown in detail on Díaz-Vélez (2018; [1]), and [2]. Herein, we show how the maps were obtained by [1] showing preliminary results. The final results will be presented in [2].

Astropartículas, Detector, Rayos Gamma,

1 Introducción

La Física de Altas Energías (FAE) es la física de partículas que cubre un rango desde millones a trillones de electrones-voltios (eVs): MeVs (Mega eVs = 10^6 eVs), GeVs (Giga eVs = 10^9 eVs), TeVs (Tera eVs = 10^{12} eVs), PeVs (Peta eVs = 10^{15} eVs), y EeVs (Exa eVs = 10^{18} eVs). Para contar con cierta referencia, la luz visible tiene una energía de 2 a 3 eVs. Para el estudio de la FAE se puede dividir en 3 áreas principales: 1.- *Astropartículas*, 2.- *Física de aceleradores*, y 3.- *Física nuclear*. Las Astropartículas, están fuertemente vinculadas y relacionadas entre ellas a través de decaimientos de partículas como los piones (véase sección 2.3) por mencionar: a).- *los rayos cósmicos*, b).- *los rayos gamma*, y c).- *Los neutrinos*. De esta segunda subdivisión, los *rayos cósmicos* son protones o núcleos de Hierro (principalmente) altamente energéticos que se mueven a velocidades relativistas, es decir, cercanas a la velocidad de la luz en el vacío (c de aquí en adelante y equivale a 300,000 km / s); los rayos gamma son la luz de mayor energía que existe en el espectro electromagnético, están asociados a un universo violento, energético-extremo; y *los neutrinos* son partículas subatómicas tipo electrón (fermiones) que no tienen carga y son muy difíciles de detectar.

Relacionado a las *Astropartículas* existen todavía varias preguntas importantes aun sin contestar, entre ellas su *origen* (¿de dónde provienen?), su *identidad* (¿qué son?), su *mecanismo de aceleración* (¿de dónde obtienen su energía?), y su *propagación en el cosmos* (¿qué ocurre en su camino?). Son sobre estas preguntas que actualmente investigadores de todo el mundo están trabajando apoyados de centros de investigación y observatorios, desarrollando teorías para determinar espectro de energía, composición y dirección de llegada y sobre todo su mecanismo de aceleración.

La física de aceleradores se genera en los experimentos científicos de aceleradores de partículas artificiales, es decir; desarrollados por el hombre, tal es el caso del Gran Colisionador de Hadrones (LHC por sus siglas en inglés). Una de las ventajas de estos aceleradores es que los investigadores pueden realizar pruebas controladas, como programarlas en tiempo y ajustar otros parámetros; como el tipo de partículas a colisionar. Dentro de las desventajas, se puede mencionar que solo llegan a energías limitadas a algunos TeVs. He aquí una importancia de estudiar las Astropartículas, los objetos astronómicos de donde provienen, y que están asociados a agujeros negros y eventos explosivos como la muerte de estrellas masivas (supernovas), se pueden considerar aceleradores naturales de partículas llegando a energías que van de TeVs hasta EeVs. La diferencia y la sinergia entre estas áreas esta en la energía. Cabe mencionar que a grosso modo, llamamos “muy alta energía” (VHE por si siglas en inglés) a energías mayores a 100 GeV aproximadamente, donde en rayos gamma hablamos de GeV/TeV, mientras que los rayos cósmicos llegan a EeVs y los neutrinos a PeVs.

Las Astropartículas, junto con el reciente descubrimiento de las ondas gravitacionales, forman la llamada *astronomía de multi-mensajeros*, la cual se proyecta como una de las áreas de la astronomía moderna más impactante en el siglo XXI. Una de las razones principales de lo anterior, es que solo el desarrollo tecnológico del siglo XXI ha llevado y llevará a la construcción de los instrumentos necesarios para acotar los modelos físicos y matemáticos para sí poder entender de una manera sin precedentes, la física involucrada.

Otro aspecto notable es que esta nueva astronomía está evolucionando muy rápidamente, por ejemplo; debido a las aportaciones de otros instrumentos como telescopios tradicionales y radiotelescopios a los últimos trabajos de astronomía de *multi-mensajeros*, ahora se incluye como “mensajeros” a otras longitudes de onda como el Radio, los Rayos X, el óptico, etc. Si bien esto es cierto, podemos concluir que son los rayos gamma los que vinculan esta astronomía “multi-longitud de onda” con los Rayos cósmicos y neutrinos, ya que ellos además, son “rastreadores” de aceleradores naturales de partículas; la joven astrofísica de rayos gamma nacida a finales de la década de los 1980’s, está por madurar.

Las Astropartículas, en particular el de los rayos cósmicos y los rayos gamma, estos NO pueden ser detectados de manera directa, debido a que son absorbidos por la atmósfera terrestre. Es por esta razón que deben usarse y desarrollarse técnicas, instrumentos, y estrategias para detectar estas partículas, especialmente las de más altas energías (TeV, PeV), para esto requieren áreas de detección gigantes de al menos decenas de miles de metros cuadrados: a mayor energía, es necesario mayor área de detección. Es decir, si bien una opción es usar satélites como NASA-Fermi [3], debido a su *pequeña* área de detección (80 m²), este es útil únicamente para detectar a energías de MeV hasta GeV.

Construir satélites de mayor área efectiva es muy complicado por la limitante tecnológica y económica; pero la superficie de la tierra sí permite conseguir estas áreas, entonces, ¿cómo detectar a altas energías si la atmósfera terrestre es un impedimento?. La solución más común consiste de 4 *componentes* principales: 1.- considerar a la atmósfera terrestre como un aliada y un **detector superior**, 2.- construir a nivel de suelo y con la área efectiva deseada, un instrumento *ad-hoc* y considerarlo como un **detector inferior**, 3.- aplicar una **técnica** que permita vincular ambos detectores, por ejemplo, la radiación Vavilov-Cherenkov en aire (Imaging Air Cherenkov Telescopes: IACT's) o en *agua* (Water Cherenkov Detectors: WCD's de aquí en adelante), y como a diferencia de otras áreas de la astronomía no tenemos “espejos secundarios”, para poder entender y diseñar los detectores, así como para poder analizar los datos, se deben aplicar las 4.- **tecnologías de la información (TIs)**, por ejemplo: el modelado y la simulación.

En este capítulo describimos y clarificamos estas 4 *componentes*, haciendo énfasis en cómo se usa el agua, como herramienta dentro de la técnica, para la detección de rayos Gamma y rayos cósmicos en un rango determinado de energía, ejemplificándolo con el funcionamiento y algunos resultados de dos de los observatorios más importantes y poderosos del momento; HAWC (acrónimo de *High Altitude Water Cherenkov*), instalado en México, y ICECUBE, instalado en el polo sur.

2 Las 4 componentes de detección.

2.1 El Detector Superior (Atmósfera Terrestre): Cuando un rayo Gamma o Cósmico galáctico o extragaláctico impacta la atmósfera terrestre, son absorbidos por ella debido a su opacidad y por lo tanto NO alcanzan la superficie de la tierra. Esta es la razón de porque la luz de muy alta energía no se puede detectar directamente a nivel de suelo, caso contrario cuando se trata de luz en el rango de las ondas de radio, visible, y cercano infrarrojo. Sin embargo, a cambio de esta absorción, que en realidad es la interacción del rayo gamma y/o cósmico con alguna molécula atmosférica, se genera una serie de partículas atómicas y subatómicas provenientes de la interacción de esta molécula y la partícula externa, estas partículas generadas contienen cargas y algunas pueden ser neutras, que posteriormente pueden decaer en otro tipo de partículas, todas propagándose a través de la atmósfera terrestre hasta llegar al suelo.

Esta cascada de partículas recibe el nombre de *cascada atmosférica de partículas* (EAS de aquí en adelante por sus siglas en inglés; Extensive Air Shower). El proceso anterior se ilustra en la Figura 2.1. Así pues, si podemos *detectar* estas partículas de la cascada, podemos obtener información de la estructura de la EAS usando simulaciones de tipo Montecarlo (tecnologías de la información), y de aquí, determinar la energía y dirección de arribo del rayo gamma o el rayo cósmico incidente en la atmósfera. Si instalamos nuestro detector en coordenadas geo-referenciadas, podemos determinar la dirección del objeto astronómico fuente de la astropartícula, y con ayuda de la llamada distribución espectral de energía (SED por sus siglas en inglés), podemos acotar con las observaciones, los distintos modelos que existen para explicar el proceso físico con el fin de determinar cuál es el más acertado. La SED es un gráfico de la intensidad de la energía de luz (eje Y), como función de la frecuencia o longitud de onda (eje X); equivalente al espectro electromagnético de la luz para un objeto astronómico determinado.

La forma de una EAS depende mucho de si proviene de un rayo cósmico o de un rayo gamma. En el caso del rayo gamma (primario), cuando se da una interacción *coulombiana* con el núcleo atmosférico (principalmente oxígeno y nitrógeno), debido al proceso de *producción de pares*, el rayo decae inmediatamente (del orden de nanosegundos) en un par de partículas; el electrón (leptón), y su antipartícula, el electrón con carga positiva llamado positrón. Cuando estas partículas interactúan con un núcleo cargado en la atmósfera terrestre, producen a través de un proceso físico llamado *Bremmstrahlung* o *radiación de frenado*, otro rayo gamma de menor energía llamado *secundario*. Este inmediatamente vuelve a decaer en un par positrón-electrón, y estos a su vez por *Bremmstrahlung* producen otro fotón gamma terciario, que vuelve a decaer en otro par positrón-electrón y así sucesivamente hasta alcanzar el suelo.

En el caso que el primario sea un rayo cósmico, éste colisiona fuertemente con el núcleo atmosférico produciendo principalmente unas partículas llamadas piones (hadrones cargados positiva, negativa, y neutramente) y Kaones (hadrones cargados positiva y negativamente), que forman parte de los llamados mesones.

Los piones neutros, decaen en dos rayos gamma de muy baja energía (en un tiempo de quintillonesimo de segundos; 10^{-18} s) que inmediatamente decaen en un par positrón-electrón, llevándose a cabo el mismo proceso descrito en el párrafo anterior, esta componente de la EAS se le llama *componente electromagnética*.

Figura 6.1 Un objeto astronómico como la Nebulosa del Cangrejo (derecha) emite un rayo gamma o cósmico que es absorbido en la atmósfera terrestre al interactuar con un núcleo en ella, y a cambio, produce una cascada extendida de partículas atómicas y subatómicas como electrones y muones que se propagan por la atmósfera hasta alcanzar la superficie terrestre. Fuente: Adaptado de The Quanta Newsletter (Natalie Wolchober) [4] y de la imagen de la Nebulosa del Cangrejo de NASA / ESA (G. Dubner) [5]



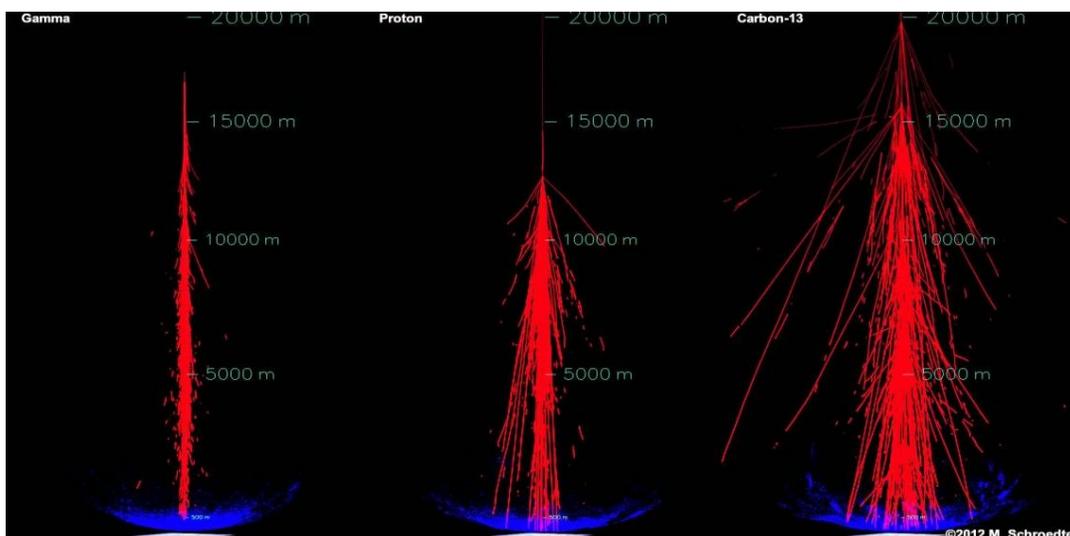
Por otro lado, en décimas de nanosegundos (10^{-8} s), los kaones decaen en piones principalmente, y los piones a su vez, con tiempos de vida igual de 10^{-8} s, decaerán en otras partículas llamadas muones (leptones cargados positiva y negativamente) que tienen vida media del orden de microsegundos y alcanzan la superficie de la tierra viajando a velocidades cercanas a c . En estas reacciones que involucran muones, también se producen neutrinos (electrónicos y muónicos) que son muy difíciles de detectar, y es un tema cuyo tratado se escapa a este capítulo. Esta componente de la EAS se llama *componente fuerte* (*hadrones, muones, y mesones*).

La estructura de una EAS y la propagación de las partículas secundarias a la superficie terrestre se ejemplifican en la Figura 6.2. Aquí se puede ver como la EAS de un rayo gamma (panel izquierdo) es menos intenso y más angosto que la proveniente de un rayo cósmico (protón y núcleo de carbono; paneles centro y derecha respectivamente).

También se puede ver que la incidencia del rayo C3smico o Gamma primario se da a una altura aproximada de 15 kil3metros sobre el nivel del mar. Tambi3n comparando los 3 paneles, se puede ver porqu3 es importante poner el detector inferior (ver secci3n 2.3) a gran altura; para poder captar part3culas de la EAS m3s energ3ticas, debido al tiempo m3s peque1o de la primera interacci3n.

A la superficie de la tierra llegan EAS generados por ambas astropart3culas y en todas direcciones, as3 que el estudio de los rayos gamma del universo se basan analizando la componente electromagn3tica (discrimin3ndola adecuadamente de la componente fuerte; que ser3a como un tipo de *ruido*), y el estudio los de rayos c3smicos se realizan analizando la componente fuerte (discriminando la componente electromagn3tica).

Figura 6.2 Simulaciones que muestran la estructura de una Cascada Atmosf3rica de Part3culas o EAS en ingl3s producidas por un rayo gamma (izquierda), rayo c3smico (prot3n; centro), y rayo c3smico (Carbono-13; derecha) incidente. Comp3rese con la Figura 2.1. Fuente: Martin Schroedeter; VERITAS and Harvard Smithsonian Center for Astrophysics (2012) [6]



De todo lo anterior concluimos que la atm3sfera terrestre se puede considerar como un detector de part3culas subsecuentes de un rayo gamma o rayo c3smico incidente en ella (a 15 km de altura), donde las part3culas dominantes que llegan a nivel de suelo viajando a velocidad c son electrones (proveniente del rayo gamma: mapa de rayos gamma), o muones (proveniente del rayo c3smico: mapa de rayos c3smicos).

2.2 La t3cnica y la herramienta (Efecto Vavilov-Cherenkov)

Cuando una part3cula viaja con una velocidad superior a la de la luz en un medio cualquiera, por ejemplo, agua o aire, y cuyas propiedades est3n descritas por el 3ndice de refracci3n del mismo, se puede producir un destello de luz de color azulosa-violeta entre los 300 y 400 nan3metros (nm) aproximadamente y centrada por ah3 de los 350 nm. Esta luz azulosa se llama luz Cherenkov por ser el producto del efecto Vavilov-Cherenkov descubierto por Pavel Cherenkov y su asesor de tesis doctoral Sergey I. Vavilov. Mientras que el descubrimiento fue experimental entre 1934 y 1937, la teor3a fue desarrollada en detalle a partir de las ecuaciones de Maxwell por Igor Tamm e Iya Frank en 1937, ganando junto con Cherenkov, el premio nobel de F3sica en 1958. Todos ellos pertenecieron al Lebedev Physical Research Institute en Mosc3.

En el agua la luz viaja a $3/4 c$, y en el aire a $299,700 \text{ km/s}$. De este modo, si el electr3n o mu3n de la EAS (secci3n 2.1), viajando a velocidad c atraviesa aire o agua (medio polarizable), puede producir luz Cherenkov. Tomando en cuenta esto, se puede construir un instrumento terrestre (ver secci3n 2.3) que detecte esta luz Cherenkov, permitiendo acumular y guardar toda la informaci3n del (los) detector(es) Cherenkov en un centro de electr3nica y computo especializado.

En este contexto se pueden construir telescopios IACTs u observatorios WCDs. La diferencia entre los telescopios y observatorios, es que los IACT's se pueden mover y apuntar al cielo en cualquier dirección permitida, y los WCDs se mantienen fijos en su lugar y solo observan la región del cielo que cruza a través de ellos. Los WCD ofrecen muy alta sensibilidad (capacidad de detectar), y los IACTs una mejor resolución (capacidad de resolver), por eso lo mejor es combinar ambos sistemas, telescopios y observatorios.

2.3 El Detector Inferior (El instrumento)

Son los IACTs o los WCDs, aunque también hay otros que usan otra técnica, la del plástico centellador, que no serán tratados en este capítulo (un ejemplo de ellos es el Observatorio Grapes-3 [7] y el Telescope Array Project [8]). Algunos ejemplos de IACTs son los telescopios MAGIC[9], VERITAS[10], HESS[11], y los ejemplos de WCD más importantes en la actualidad son AUGER (rayos cósmicos [12]), HAWC (rayos Gamma [13]), y ICECUBE (neutrinos [14]). En esta sección ejemplificaremos el detector inferior a través de HAWC, por estar instalado en las faldas del volcán Sierra Negra, Puebla, México a 4100 metros sobre el nivel del mar (msnm), y que ha permitido una estrecha colaboración de alto impacto y trascendencia internacional entre una treintena de instituciones de México, Estados Unidos, y Europa. De manera particular la colaboración dentro de la instrumentación, la Universidad de Guadalajara (U de G), la Universidad Politécnica de Pachuca (UPP), la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) y la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

HAWC consiste de 300 WCDs que cubren una superficie de 22,000 m² que observan 2/3 partes del cielo de manera continua. Cada WCD está compuesto de una estructura cilíndrica de 5 metros de alto por 7.3 metros de diámetro, que sostiene una bolsa especial en su interior con 180,000 litros de agua ultra-purificada, y 4 tubos fotomultiplicadores (PMTs de aquí en adelante por sus siglas en inglés) anclados en su base, los cuales son los sensores de la Luz Cherenkov. HAWC fue inaugurado con sus 300 WCDs en Marzo de 2015, funcionando en su totalidad, y se espera opere sin interrupción durante 10 años. Actualmente, iniciando en 2017, se está trabajando en la instalación de unos detectores de soporte denominados *outriggers* alrededor del instrumento principal, que al cubrir 4 veces el área de éste, convertirían a HAWC en un instrumento 4 veces más poderoso. Los resultados y detalles de HAWC están compilados en [15] y [16].

Las partículas cargadas de la EAS cruzan los detectores con agua, generando un fogonazo de luz Cherenkov en el interior que es sentido por los PMTs. Luego, a través de una red de cables, la información recopilada por los PMTs se trasladan al centro de operaciones que contiene la electrónica y equipo especializado para almacenar los datos que posteriormente serán procesados y analizados.

2.3.1. El agua en los detectores de HAWC

La luz Cherenkov viaja formando un cono de 41° relacionado con el índice de refracción del agua, lo que permite que casi todas las partículas de la EAS que entran en el tanque sean registradas por uno de los cuatro PMTs ubicados en un área sensitiva de 177 m² en el fondo del detector. Típicamente llegan a entrar $\sim 10^9$ partículas a cada WCD que generarán luz Cherenkov, por lo que la resolución de un WCD dependerá de la calidad del agua cuantificado en términos del coeficiente de absorción o de la longitud de transmisión. Un valor de longitud de transmisión alto o un coeficiente de absorción bajo, permite que los fotones Cherenkov generados en el WCD alcancen a registrarse en los PMTs.

En HAWC se exigió una longitud de transmisión por arriba del 90 % en la calidad del agua. Para ello, se superaron diferentes obstáculos, desde el reto del abastecimiento de 55500 m³ de agua para los 300 WCDs en un lapso de tiempo de aproximadamente 36 meses, hasta el de obtener la calidad del agua exigida. La fuente natural de abastecimiento de agua era el Citlaltépetl, teniendo corrientes subterráneas y superficiales, sin embargo, dada la ubicación montañosa y las precipitaciones en la región (100 cm / año, con una marcada dependencia estacional), se optó por adquirir el agua a nivel local, desde los pozos profundos de riego de Esperanza, una ciudad al lado de la Autopista Puebla-Orizaba y a 25 km del sitio HAWC (diferencia de altura de 1800 m). Simultáneamente, se llevó una segunda opción de adquisición de agua que consistió en una boquilla natural de agua yendo hacia abajo del Citlaltépetl, que fue identificado a unos 7 kilómetros al Oeste-Noroeste del sitio de HAWC, el cual fue particularmente eficaz durante la temporada de lluvia (mayo-octubre), mientras que el pozo suministraría agua de forma más continua en toda la época del año.

Los primeros resultados de la calidad del agua del pozo profundo en Esperanza fueron que poseía una dureza de entre 9-10 granos (*grains*). Los requerimientos establecidos para el proyecto eran que la dureza del agua no debería sobrepasar 1 o máximo 2 granos. Esto era para que, con un filtrado adecuado, se alcance la meta de obtener una longitud de transmisión mayor a 9 m en el rango ultravioleta de la luz (teniendo en cuenta que la altura de un WCD es de 4.5m). Por lo anterior, era necesario suavizar el agua que provenía de los pozos profundos de Esperanza, y si se requería evitar la degradación biológica del agua y aumentar su longitud de transmisión en el ultravioleta, se requería un tratamiento al agua.

La solución a esto fue instalar una planta de suavizado en un lugar cercano al pozo de abastecimiento en Esperanza y colocar una planta de filtrado en el sitio de HAWC. La planta de suavizado se configuró con un filtro inicial de 5 micras (prefiltrado), con el fin de eliminar basura que pudiera traer el agua. De ahí se pasa por una planta de intercambio iónico, que elimina los iones del agua y la suaviza. Este sistema requiere de 150 kg de sal por cada 450 toneladas de agua suavizada con las características del agua usada, descritas con anterioridad. Finalmente, el agua suavizada se coloca en dos contenedores de 38 mil litros cada uno, que permite una reserva de 5 cargas de agua de 15 toneladas cada una, para ser transportada.

El traslado al sitio se hizo a través de pipas de agua de 15 toneladas, que hacían un recorrido de 25 km, y subir de 2300 msnm a una altura de 4100 msnm en 2 horas. Esta agua se recibía en un sistema de 5 contenedores de 180 toneladas cada uno, para su posterior filtrado. El agua era pasada por un sistema de prefiltros de 10 micras en paralelo, para después ser pasados por una Lámpara Ultravioleta, con el fin de eliminar cualquier bacteria, el tratamiento continúa pasando por un sistema paralelo de filtros de carbón activado y finalmente a través de un sistema doble en serie de filtros de 1 micra.

El agua ultrapurificada es almacenada en dos contenedores de 180 toneladas cada uno y de ahí es bombeada mediante tubería a cada uno de los detectores del observatorio. Los sistemas de filtros de 10 micras y de 1 micra respectivamente, se debían cambiar después de cada 2700 toneladas de agua filtrada, mientras que la carga del filtro de carbón activado, se debía cambiar cada 22 500 toneladas de agua. Aproximadamente el 20% del agua utilizada en los 300 WCD, se colectó de los nacimientos naturales de las faldas del Citlaltépetl, a una altura de 4200 msnm.

2.4 Tecnologías de la información (Simulación y Modelado)

Mientras que la simulación puede verse como *imitar* el comportamiento de una situación o proceso por medio de un aparato adecuado, modelar sería *simplificar o idealizar* la descripción o concepto de un sistema, situación o proceso en particular, en base de un entendimiento teórico o empírico, o usando predicciones y cálculos, es decir, una *representación* conceptual o mental de algo. Con la simulación se busca que los problemas grandes y complejos puedan separarse en subproblemas más pequeños y simples pero interdependientes, es decir, hacer en una computadora lo que la naturaleza nos muestra es, todo a través de una convolución numérica de muchas partes. Si todos los subprocesos se conocen en todos los detalles, la simulación produce un resultado correcto, como en la realidad eso no puede ocurrir, debemos tener modelos de realidad, es decir, simplificaciones, suposiciones, y aproximaciones debido a que no podemos tener la simulación con parámetros completos.

Lo anterior conlleva a confundir muchas veces entre simulación y modelación en las TIs, porque la *complejidad de un problema se puede ver reflejado en la complejidad de las simulaciones*. Por eso es muy importante considerar cuando un modelo es suficientemente bueno para un propósito específico, y cuando las simplificaciones empiezan a afectar los resultados.

En el caso de análisis de las EAS, es un proceso largo y complejo, existen varios subprocesos interdependientes que si bien se conocen de manera individual, es muy difícil hacer la combinación de todos, sobre todo porque puede haber correlaciones entre observables y dependencias, así como fluctuaciones estadísticas. Para resolver el problema, se pueden usar métodos (erg. el método de Montecarlo) en simulaciones para conocer el desarrollo de la EAS, la respuesta del detector, los procedimientos de mediciones y la reconstrucción de datos.

En el contexto de este capítulo, las TIs son muy importantes porque con las simulaciones se pueden hacer dos cosas principales: 1.- determinar la estructura de la EAS para determinar si viene de un rayo cósmico o un rayo gamma (primario, ver Figura 6.2), y de ahí poder determinar la energía así como la dirección de arribo, y 2.- diseñar, entender y definir la forma/estructura adecuada que debe tener el detector inferior, para estar sintonizado con la distribución y formas de las EAS y poder captar las partículas secundarias de manera adecuada.

En este capítulo vamos a omitir sobre las simulaciones para construir el detector inferior, pero sí diremos que el software que más se utiliza en el área se llama GEANT4 [17], y nos enfocaremos a ejemplificar en la siguiente sección, cómo se obtienen los mapas a partir de datos de los detectores inferiores previamente procesados, una vez aplicando las TIs para obtener la información y entendiendo la diferencia entre simular y modelar.

3 La obtención de un mapa inédito del cielo visto en rayos cósmicos

3.1 Introducción

En esta sección vamos a mostrar ejemplos de cómo se puede hacer ciencia de punta usando WCD's, combinando datos de los observatorios IceCube y HAWC para generar un mapa inédito del cielo visto en rayos cósmicos a energías medias de 10 TeV que es presentado a detalle en [1] y [2]. Por primera vez se combinan datos de ambos detectores y se obtiene un mapa que cubre los dos hemisferios: el norte y el sur. Los resultados son los mapas del cielo, y la metodología involucraría las tecnologías de la información aplicadas al análisis de datos; *las simulaciones*, considerando un método más novedoso y mejor para determinar los mapas aquí presentados, el cual no había sido usado anteriormente en este tipo de análisis: *El método iterativo de Máxima Verosimilitud* [18], y construyendo un mapa *modelo* del mapa observado de la emisión a gran escala, que al hacerles una resta, obtenemos el mapa observado de la emisión a pequeña escala.

Antes de pasar a la metodología y resultados, mencionaremos un poco de información del detector IceCube y de los datos utilizados, para después presentar una síntesis de como se hicieron estos mapas [1], [19]. IceCube es un detector de neutrinos de 1 km³ localizado en el Polo Sur geográfico compuesto de 5160 módulos ópticos a profundidades entre 1450 m y 2450 m debajo de la superficie de la capa de hielo. Este detecta la radiación Cherenkov emitida por partículas cargadas relativistas a medida que se propagan a través del hielo. Más información sobre IceCube se puede ver en [14] y [20].

Hay que tomar en cuenta que aunque HAWC y IceCube son detectores Cherenkov para rayos gamma y neutrinos respectivamente, también pueden ser detectores de rayos cósmicos, si solo se enfocan a detectar la componente de los muones (excluir la de electrones y la detección indirecta de neutrinos) tal como fue descrito en la sección 2.1.

3.2 Sobre los datos

Los datos seleccionados para los mapas aquí presentados (ver detalles en [21]) provienen de 5 años de datos de IceCube recolectados entre mayo de 2011 y mayo de 2016, en su configuración final de 86 cables (IC86), así como 1 año de datos de HAWC recolectados entre abril de 2015 y abril de 2016, en su configuración final de 300 detectores (HAWC-300). Los cortes energéticos fueron a 10 TeV para ambos detectores, y se usaron resoluciones angulares de 2° a 6° y 0.3° a 1.5°, así como tasas de disparo de 2.5 kHz y 25 kHz para IceCube y HAWC respectivamente.

3.3 Metodología

Para hacer los mapas de anisotropía de rayos cósmicos a gran escala y a menor escala, se necesitan usar técnicas y métodos diferentes relacionados a la astronomía convencional. En particular se debe empezar creando 2 tipos de mapas: 1.- El mapa de *datos*, que se hace combinando los datos de HAWC y IceCube y 2. - El mapa de *referencia*, que tiene que ver con la sensibilidad (capacidad de detectar) del detector considerando un flujo isotrópico de rayos cósmicos.

El mapa de datos se construye por medio de las coordenadas locales de cada rayo cósmico que impacta al detector y el tiempo de dicha detección, a base de las cuales se hace una transformación a coordenadas celestes (Ascensión recta, α = dirección Este-Oeste, y declinación, δ = dirección Norte-Sur).

El mapa de referencia, típicamente se produce a base de los mismos datos, pero el tiempo t de detección se aleatoriza dentro de una ventana Δt para borrar la contribución de la anisotropía y a la vez, conservar la sensibilidad angular del detector y las variaciones en aceptación relacionadas a cambios atmosféricos. Por ejemplo, en el caso de HAWC, el campo de visión cubre aproximadamente un 15% del cielo instantáneamente, pero durante un periodo de 24 horas el detector cubre 64% del cielo.

Durante este periodo de 24 horas puede haber variaciones en la sensibilidad del detector debido a efectos atmosféricos, por lo cual, se puede producir una subestimación o sobreestimación del nivel de referencia isotrópico. Por esta razón, estos métodos de integración de tiempo pueden atenuar las estructuras a gran escala y deben de tomarse en cuenta. Una vez que los mapas de datos y de referencia han sido construidos, éstos se comparan para determinar si existe alguna anisotropía en coordenadas siderales. Esta comparación se lleva a cabo mediante la construcción de otros dos tipos de mapas: un mapa de *intensidad relativa*, y un mapa de *significancia estadística*.

La intensidad relativa en función de las coordenadas ecuatoriales (α, δ) se calcula dividiendo el cielo en una cuadrícula de igual área con un tamaño de compartimento de 0.9 utilizando el software de HEALPix (Hierarchical Equal Area iso-Latitude pixellation of the sphere) [22]. La intensidad relativa mide la amplitud de las desviaciones sobre la expectativa de isotropía en cada pixel i .

Los valores de cada pixel, i en el mapa de intensidad relativa se calculan mediante la ecuación:

$$\delta I_i = \frac{\Delta N_i}{\langle N \rangle_i} = \frac{(N_i - \langle N_i \rangle)}{\langle N_i \rangle} \quad (1)$$

donde N_i y $\langle N_i \rangle$ son el número de sucesos en i del mapa de datos y el mapa de referencia respectivamente, obtenidos de aplicar el método de máxima verosimilitud (ver ecuación 3). La incertidumbre estadística sobre I sería :

$$\sigma_{\delta I} = \frac{N_i}{\langle N \rangle_i} \sqrt{\frac{1}{N_i} + \frac{\alpha}{\langle N \rangle_i}} \quad (2)$$

donde $\alpha = 1 / n$, para n muestras de los datos durante el proceso de integración.

Los mapas de significancia son muy importantes en este tipo de estudios porque nos permiten estimar la importancia del exceso y déficit de rayos cósmicos en diferentes regiones del cielo y distinguir entre efectos reales y variaciones que pueden surgir a base de fluctuaciones estadísticas del fondo.

La significancia estadística en este caso se puede calcular utilizando el método de Li & Ma [23], el cual es ampliamente utilizado en la astronomía de rayos gamma, y toma en cuenta las fluctuaciones estadísticas de los datos y las cuentas de referencia. Es decir, la significancia s por pixel i se da por medio de la expresión:

$$s_i = \sqrt{2} \left\{ N_i \log \left[\frac{1+\alpha}{\alpha} \left(\frac{N_i}{N_i+N_0} \right) \right] + N_0 \log \left[(1+\alpha) \frac{N_0}{N_i+N_0} \right] \right\}^{0.5} \quad (3)$$

con $N_0 = \langle N_i \rangle / \alpha$

En el análisis conjunto de IceCube y HAWC el método de verosimilitud más sofisticado permite además recuperar la amplitud total de las anisotropías a gran escala proyectadas sobre el plano ecuatorial. El máximo de la verosimilitud como función de intensidad relativa I , fondo isotrópico N y aceptación del detector A_i es

$$L(n|I, N, A) = \prod_{\tau i} \frac{(\mu_{\tau i})^{n_{\tau i}} e^{-\mu_{\tau i}}}{n_{\tau i}!} \quad (4)$$

donde el número anticipado de rayos cósmicos (n) en el píxel i durante el período Δt_{τ} es $\mu_{\tau i} = I_{\tau} A_i N_{\tau}$. Esto nos permite resolver la ecuación iterativamente para encontrar los valores de I , N y A . Los mapas resultantes de intensidad relativa y significancia estadística obtenidos a base de este método se muestra en la Figura 6.3.

Ahora bien, como tenemos que estudiar anisotropías a gran y pequeña escala, un análisis armónico en coordenadas esféricas nos permite detectar la presencia de estructuras a diferentes escalas angulares. El espectro de potencia angular indica la existencia de estructuras de pequeña escala, pero con menor amplitud que no son necesariamente visibles en la Figura 6.3.

El espectro de potencia indica qué momentos multipolares $l = (0, 1, 2, \dots)$ en la expansión armónica de coordenadas esféricas contribuyen significativamente a la distribución de direcciones de llegada. Para observar las correlaciones entre los píxeles en varias escalas angulares, se calcula el espectro de potencia angular del mapa de intensidad relativa. La intensidad relativa puede ser tratada como un campo escalar expandido en términos de una base armónica esférica:

$$\delta I(u_i) = \sum_{l=1}^{\infty} \sum_{m=-l}^l a_{lm} Y_{lm}(u_i) \quad (5)$$

$$a_{lm} \sim \Omega_p \sum_{i=0}^{N_{pix}} \delta I(u_i) Y_{lm}^{asterix}(u_i) \quad (6)$$

donde Y_{lm} son las armónicas esféricas Laplace, y “asterix” indica complejo conjugado, los a_{lm} son los coeficientes multipolares de la expansión, Ω_p es el ángulo sólido observado por cada píxel (de tamaño constante a través de la esfera), $u_i = (\alpha_i, \delta_i)$ es el vector direccional asociado al píxel con índice i , y N_{pix} es el número total de píxeles en el mapa del cielo.

Como el espectro de potencia angular del campo de intensidad relativa se define como la varianza multipolar de los coeficientes a_{lm} , tenemos que:

$$c_l = \frac{1}{2l+1} \sum_{m=-l}^l |a_{lm}|^2 \quad (7)$$

La Figura 3.2 muestra el espectro de potencia angular resultado de los datos combinados de HAWC y IceCube.

Finalmente, para revelar estas estructuras en un mapa, podemos hacer un ajuste multipolar del dipolo, cuadrupolo y octopolo (correspondientes a escalas de 180, 90 y 45 respectivamente) sobre el mapa de anisotropía a gran escala y restarlo al mismo mapa. Es decir, extraemos el dipolo, cuadrupolo y octopolo haciendo un ajuste del mapa de intensidad relativa por medio de un desarrollo multipolar de la distribución relativa de cuentas en términos de funciones armónicas esféricas con valores reales y que siguen una convención de normalización de uso general en el campo del fondo cósmico de microondas (Cosmic Microwave Background [24]):

$$\begin{aligned} \delta I(\alpha, \delta) = & m_0 + p_x \cos(\delta) \cos(\alpha) + p_y \cos(\delta) \sin(\alpha) + p_z \sin(\delta) \\ & + 0.5 Q_1 (3 \cos^2 \delta - 1) + Q_2 \sin 2\delta \cos \alpha + Q_3 \sin 2\delta \sin \alpha + Q_4 \cos^2 \delta \cos 2\alpha \\ & + Q_5 \cos^2 \delta \sin 2\alpha \end{aligned} \quad (8)$$

donde m_0 es el momento del monopolio de la distribución, y corresponde a un desplazamiento de los datos arriba de cero. Los valores de (p_x, p_y, p_z) son los componentes del momento dipolar y las cantidades (Q_1, \dots, Q_5) son los cinco componentes independientes del momento cuadrupolar.

Generando este ajuste mutipolar junto con la correspondiente intensidad relativa, obtenemos el mapa modelo mostrado en la Figura 6.3a. Luego de restar este mapa al mapa en la Figura 6.3 (anisotropía a gran escala), obtenemos el mapa de intensidad relativa a pequeña y mediana escala, el cual es presentado en la Figura 6.3b, con su respectivo mapa de significancia mostrado en la Figura 6.3c. Este último mapa se obtuvo al aproximar la intensidad relativa a primer orden como:

$$I = \frac{N_{on}}{\alpha N_{off}} \quad (9)$$

donde N_{on} es el número de sucesos en la región de interés y N_{off} el número de sucesos en la región referencia en el mapa de estimación de fondo. El factor α corresponde a la exposición relativa $\alpha = E_{on}/E_{off}$, donde E_{on} y E_{off} corresponderían a las respectivas las exposiciones. Si la anisotropía δI , es pequeña como en nuestro caso, la significancia estadística correspondiente se puede aproximar por medio de la ecuación 10:

$$s = \sqrt{\frac{N_{on}}{1+\alpha}} \delta I \quad (10)$$

3.4 Resultados

El mapa del cielo en rayos cósmicos a gran escala y con una energía promedio de 10 TeV derivado de las ecuaciones (1), (3), y (4) para la intensidad relativa y la significancia se muestra en la Figura 6.3. Aquí se puede ver que la distribución de los rayos cósmicos es anisotrópica y se junta la emisión en regiones bien definidas. Es decir, el cielo en rayos cósmicos no es isotrópico.

El espectro de potencia obtenido de las ecuaciones (5), (6), y (7) se muestra en la Figura 6.4. La estructura de gran escala corresponde al pico en los valores más bajos de la izquierda, mientras que las estructuras más pequeñas se puede observar con menor potencia por encima de la banda gris a escalas angulares entre 15° y 35° . Los puntos rojos corresponden al espectro de potencia que resulta después de sustraer un ajuste a las características de gran escala ($l = \{1,2,3\}$). El espectro de potencia angular indica la existencia estructuras de pequeña escala, pero con menor amplitud que no son necesariamente visibles en la Figura 6.3. Esto nos conlleva a modelar los datos para hacer una sustracción de estas estructuras a gran escala y realzar las estructuras a menor escalas embebidas.

Figura 6.3 Mapa actual e inédito del cielo en rayos cósmicos a energías medias de 10 TeV combinando datos de IceCube (IC86) y HAWC (HAWC 300). Mapa de intensidad relativa a la izquierda, y de significancia a la derecha. Fuente: Juan Carlos Díaz-Vélez [19]

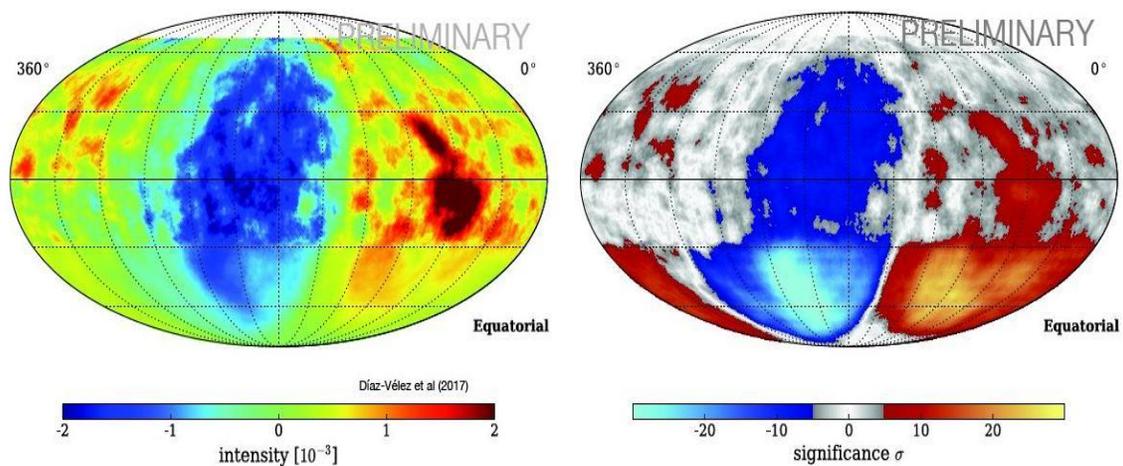
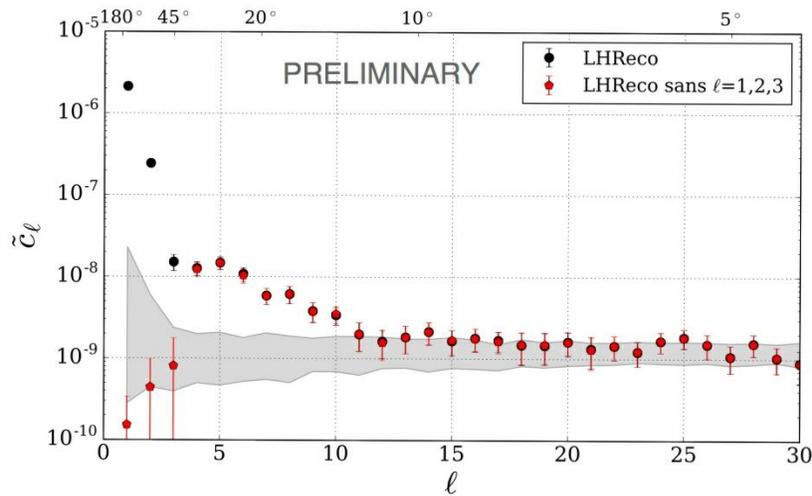
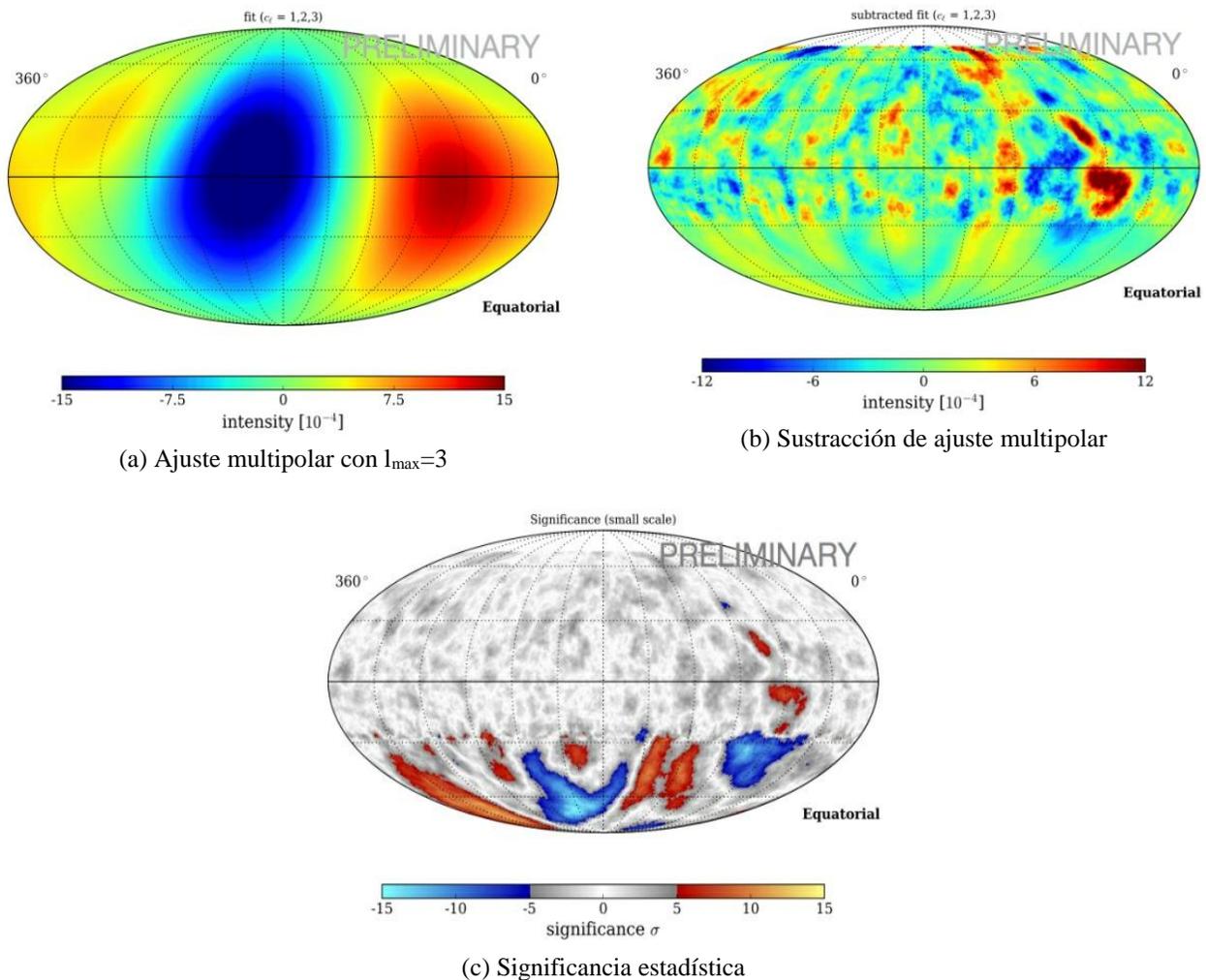


Figura 6.4 Espectro de potencia angular de la anisotropía de rayos cósmicos. Los puntos rojos corresponden al espectro de potencia angular después de restar la anisotropía de gran escala. La banda gris corresponde a la incertidumbre correspondiente a un mapa isotrópico. Fuente: Juan Carlos Díaz-Vélez [19]



El mapa modelo de la emisión a gran escala obtenido de la ecuación (8) se muestra en la Figura 6.5a. Al sustraer este mapa al de intensidad relativa de la Figura 6.5, se obtienen los mapas de intensidad relativa y significancia que muestran las anisotropías a menor escala. Ambos mapas se muestran en la Figura 6.5b y 6.5c respectivamente. La significancia de la Figura 6.5c se obtuvo de las ecuaciones (9) y (10).

Figura 6.5 a) Mapa modelo de la emisión a gran escala presentada en la Figura 6.3 (izquierda). Mapa que muestra la anisotropía de rayos cósmicos a menor escala en unidades de intensidad relativa b) y en significancias c). El mapa en b) se obtiene de sustraer el mapa en a) a la Figura 6.3 (izquierda). Fuente: Juan Carlos Díaz-Vélez [19]



3.5 Discusión

Desde inicios del siglo XXI, varios experimentos en el hemisferio norte, y IceCube en el hemisferio sur han medido y mostrado la existencia de una anisotropía de la emisión de rayos cósmicos a gran escala a un nivel de 10^{-3} y estructuras a pequeña escala con una amplitud de 10^{-4} y tamaño angular de 10° a 30° . Aunque nuestro análisis está de acuerdo con estos trabajos, y hemos mostrado que la anisotropía observada a gran escala es parte de una sola estructura gigante que cubre ambos hemisferios celestes, no es claro aún cual es el mecanismo que produce estas anisotropías. Aunque la propagación difusa de la distribución de fuentes de rayos cósmicos [25], efectos de propagación en el campo magnético del medio interestelar [26], y efectos hemisféricos [27] han sido sugeridos como razones de este comportamiento, el escenario que produce esta anisotropía aún no está claro. Aunque [1] no favorece ningún modelo (ver también [19]) y un estudio más asertivo se sale del propósito de este trabajo, mencionaremos, como estado del arte actual, qué es lo que creemos produce estas anisotropías como una combinación de estos efectos, que posiblemente formen parte de una secuencia de procesos.

La distribución de fuentes de rayos cósmicos en la Galaxia y su propagación difusa producen un gradiente dipolar en rayos cósmicos. Sobre esta distribución dipolar se suma otra contribución dipolar independiente de energía producida por el efecto Compton-Getting, es decir, un dipolo aparente debido al movimiento del sistema solar dentro de la Galaxia y el entorno local, que afecta sobre la intensidad de rayos cósmicos [28]. A menores distancias, la turbulencia en el campo magnético produce variaciones de menor escala angular debido a efectos de dispersión estocástica. El campo magnético interestelar local y la interacción de éste con la heliosfera pueden afectar las direcciones de los rayos cósmicos y actuar como un *lente magnético*. La estructura magnética de la heliosfera en la frontera con el medio interestelar donde hay posiblemente un grado alto de turbulencia magnética puede producir variaciones de pequeña escala adicionales.

3.6 Conclusiones

El análisis de cinco años de datos tomados con el detector de IceCube y 2 años de HAWC revela una anisotropía en la distribución de la dirección de llegada de rayos cósmicos de 10 TeV que se extiende a través de ambos hemisferios. El análisis aquí usado, es más robusto que los anteriores, porque se ha utilizado un método iterativo de reconstrucción de máxima verosimilitud, con el cual, se ajustan simultáneamente la anisotropía de rayos cósmicos y la aceptación de los detectores. El método no se basa en simulaciones de detector y proporciona una reconstrucción de la anisotropía óptima y la recuperación de la anisotropía dipolar para los observatorios situados en las latitudes medias tales como HAWC. En particular, la anisotropía dipolar sólo puede observarse como una proyección sobre el ecuador celeste.

Los detectores Cherenkov de Agua son excelentes instrumentos para hacer estudios de monitoreo del cielo, así como de detección de estructuras a gran escala. Además de tener alta sensibilidad, no hay duda que seguirán siendo usados para realizar estudios de Astropartículas, siendo mejorados con el tiempo, y con ellos se impactara en la astronomía de Multi-mensajeros probando la Física fundamental y seguramente generándole una revolución (e.g., [29], [30], [31]).

4 Agradecimientos

E de la Fuente agradece el apoyo recibido por diferentes instancias de la Universidad de Guadalajara como el CUCEI, el doctorado en tecnologías de la información del CUCEA, y a la Coordinación General de Cooperación e Internacionalización. J.C. Díaz-Vélez agradece al CUValles y varias autoridades, así como al WIPAC-UW por diferentes apoyos durante sus estudios de doctorado. Ambos autores agradecen el apoyo y enseñanzas de Stefan Westerhoff (QEPD), cuyas aportaciones han contribuido a fortalecer a los grupo de Astropartículas en Jalisco. El respectivo grupo de colaboración de HAWC, agradece a este Laboratorio Nacional por los apoyos recibidos a través de los proyectos de Laboratorios Nacionales de CONACyT, el cual ha fortalecimiento la colaboración entre las instituciones como la BUAP (Puebla), U de G (Jalisco), UAEH, y UPP (Hidalgo), así como entre la U de G y UW (Madison).

5 Referencias

- [1] J. C. Díaz-Vélez, (2018). Anisotropía de Rayos Cósmicos a Energías de 10 TeV con los Detectores IceCube y HAWC, *Tesis Doctoral (PhD thesis), Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara*.
- [2] The Icecube Collaboration, The HAWC Collaboration, (2018). All-Sky Measurement of the Anisotropy of Cosmic Rays at 10 TeV and Mapping of the Local Interstellar Magnetic Field, *Astrophysical Journal, to be submitted*.
- [3] Mayers, J. D., Newman, P., & McEnery, J., (2017). *NASA-Fermi Gamma-ray Space Telescope*. Retrieved from <https://fermi.gsfc.nasa.gov/>
- [4] Wolchover, N. (2015). The Particle That Broke a Cosmic Speed Limit. *Quanta Magazine*, (<https://www.quantamagazine.org/ultrahigh-energy-cosmic-rays-traced-to-hotspot-20150514/>).
- [5] Dubner, G., (2017). *New View of the Crab Nebula*. Retrieved from <https://www.nasa.gov/sites/default/files/thumbnails/image/stscihp1721af5290x5290.png>
- [6] Schroedter, M., (2012). Particle showers produced in Earth's atmosphere by gamma-ray, proton, and carbon-13. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=j-BBzWIOai0>
- [7] Gupta, S. K., et al., (2017). GRAPES-3 Experiment. Retrieved from <http://grapes-3.tifr.res.in/index.html>
- [8] Callahan, J., Thomson, G., & Vasiloff, G., (2017). *The Telescope Array Project*. Retrieved from <http://www.telescopearray.org/>
- [9] The MAGIC Collaboration, (2017). *The MAGIC Telescopes*. Retrieved from <https://magic.mpp.mpg.de/maintenance/>
- [10] The VERITAS Collaboration, (2017). *VERITAS: Very Energetic Radiation Imaging Telescope Array System*. Retrieved from <https://veritas.sao.arizona.edu/>
- [11] de Naurois, M., Panter, M., & van Eldik, C., (2017). *H.E.S.S. High Energy Stereoscopic System*. Retrieved from <https://www.mpi-hd.mpg.de/hfm/HESS/>
- [12] The AUGER Collaboration, (2017). *Pierre Auger Observatory*. Retrieved from <https://www.auger.org/>
- [13] The HAWC Collaboration, (2017). *HAWC: The High-Altitude Water Cherenkov Gamma-Ray Observatory*. Retrieved from <https://www.hawc-observatory.org/>
- [14] The ICECUBE Collaboration, (2017). *ICECUBE: South Pole Neutrino Observatory*. Retrieved from <http://icecube.wisc.edu/>
- [15] The HAWC Collaboration (2015, August). HAWC Contributions to the 34th International Cosmic Ray Conference (ICRC 2015). *Proceedings of Science, I* (1), arxiv: 1508.03327v2 (<https://arxiv.org/abs/1508.03327v2>)
- [16] The HAWC Collaboration (2017, August). HAWC Contributions to the 35th International Cosmic Ray Conference (ICRC 2015). *Proceedings of Science, I* (1), arxiv: 1708.02572v2 (<https://arxiv.org/abs/1708.02572v2>)
- [17] Allison, J. et al., (2016, November). Recent developments in GEANT4. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 835(1), 186-225. doi: 10.1016/j.nima.2016.06.125

- [18] M. Ahlers, S. Y. BenZvi, P. Desiati, J. C. Díaz-Vélez, D.W. Fiorino, and S. Westerhoff., (2016, May). A new maximum-likelihood technique for reconstructing cosmic-ray anisotropy at all angular scales. *The Astrophysical Journal*, 823(1), 1-10. doi:10.3847/0004-637X/823/1/10
- [19] J. C. Díaz-Vélez, M. Ahlers. P. Desiati, & D. Fiorino (2017). Combined Analysis of Cosmic-Ray Anisotropy with IceCube and HAWC, *Proceedings of Science, 35th International Cosmic Ray Conference, Busan, Korea*, 539. [\[SEP\]](#)
- [20] The IceCube Collaboration, (2010, May). Calibration and Characterization of the IceCube Photomultiplier Tube, *Nucl. Instrum. Meth. A*, 618 (1-3) 139–152. doi:10.1016/j.nima.2010.03.102
- [21] IceCube, HAWC Collaboration, J. C. Díaz-Vélez, et al., (2017, August). Combined Analysis of Cosmic-Ray Anisotropy with IceCube and HAWC, in Proceedings, 35th International Cosmic Ray Conference (ICRC 2017), *Proceedings of Science*, 1(1), arXiv:1708.03005. [\[SEP\]](#)
- [22] K. M. Górski, E. Hivon, A. J. Banday, B. D. Wandelt, F. K. Hansen, M. Reinecke, and M. Bartelmann, (2005, Apr). HEALPix: A Framework for High-Resolution Discretization and Fast Analysis of Data Distributed on the Sphere. *Astrophysical Journal*, 622 (1) 759–771. doi:[\[SEP\]](#)10.1086/427976
- [23] T.-P. Li and Y.-Q. Ma. (1983, September). Analysis methods for results in gamma-ray astronomy. *Astrophysical. Journal.*, 272(1), 317–324. doi:10.1086/161295
- [24] G. F. Smoot and P. M. Lubin, (1979, December). Southern Hemisphere Measurements of the Anisotropy in the Cosmic Microwave Background Radiation, *Astrophysical Journal*. 234 (1), L83–L86. [\[SEP\]](#)doi: 10.1086/183114
- [25] P. Mertsch and S. Funk, (2015, November). Solution to the Cosmic Ray Anisotropy Problem, *ASTRA Proceedings*. 2(1), 51-55. doi: 10.5194/ap-2-51-2015
- [26] López-Barquero, R. Farber, S. Xu, P. Desiati, and A. Lazarian, (2016, October). Cosmic Ray Small Scale Anisotropies and Local Turbulent Magnetic Fields. *The Astrophysical Journal*, 830(1), 1-19. (arXiv:1509.00892).
- [27] A. Lazarian and P. Desiati, Magnetic reconnection as the cause of cosmic ray excess from the heliospheric tail. *The Astrophysical Journal*, 722 (1) 188–196. doi:10.1088/0004-637X/722/1/188
- [28] A. H. Compton and I. A. Getting, (June, 1935). An Apparent Effect of Galactic Rotation on the Intensity of Cosmic Rays, *Physical Review* 47(1), 817–821. doi: 10.1103/PhysRev.47.817
- [29] B. P. Abbott et al. (2016). Observation of Gravitational Waves from a Binary Black Hole Merger, *Physical Review Letters*, 116, 061102-1–061102-16. doi: 10.1103/PhysRevLett.116.061102 (*Descubrimiento formal de las Ondas Gravitacionales; el nacimiento*).
- [30] B. P. Abbott et al. (2017). Multi-messenger Observations of a Binary Neutron Star Merger, *Astrophysical Journal Letters*, 848(2), 1–59. doi: 10.3847/2041-8213/aa91c9 (*primer trabajo observacional de Astronomía de Multimensajeros; el inicio*).
- [31] The IceCube Collaboration, Fermi-LAT, MAGIC, AGILE, ASAS-SN, HAWC, H.E.S.S., INTEGRAL, Kanata, Kiso, Kapteyn, Liverpool Telescope, Subaru, Swift/NuSTAR, VERITAS, VLA/17B-403 teams (2018). Multimessenger observations of a flaring blazar coincident with high-energy neutrino IceCube-170922A, *Science*, 361, 146–155. doi: 10.1126/science.aat1378 (*detección formal de la primera fuente extragaláctica de neutrinos y rayos cósmicos; un blazar, el parteaguas*).

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

[Título en Times New Roman y Negritas No. 14 en Español e Inglés]

Apellidos (EN MAYUSCULAS), Nombre del 1^{er} Autor†*, Apellidos (EN MAYUSCULAS), Nombre del 1^{er} Coautor, Apellidos (EN MAYUSCULAS), Nombre del 2^{do} Coautor y Apellidos (EN MAYUSCULAS), Nombre del 3^{er} Coautor

International Identification of Science - Technology and Innovation

ID 1^{er} Autor: (ORC ID - Researcher ID Thomson, arXiv Author ID - PubMed Autor ID - Open ID) y CVU 1^{er} Autor: (Becario-PNPC o SNI-CONACYT) (No.10 Times New Roman)

ID 1^{er} Coautor: (ORC ID - Researcher ID Thomson, arXiv Author ID - PubMed Autor ID - Open ID) y CVU 1^{er} Coautor: (Becario-PNPC o SNI-CONACYT) (No.10 Times New Roman)

ID 2^{do} Coautor: (ORC ID - Researcher ID Thomson, arXiv Author ID - PubMed Autor ID - Open ID) y CVU 2^{do} Coautor: (Becario-PNPC o SNI-CONACYT) (No.10 Times New Roman)

ID 3^{er} Coautor: (ORC ID - Researcher ID Thomson, arXiv Author ID - PubMed Autor ID - Open ID) y CVU 3^{er} Coautor: (Becario-PNPC o SNI-CONACYT) (No.10 Times New Roman)

(Indicar Fecha de Envío: Mes, Día, Año); Aceptado (Indicar Fecha de Aceptación: Uso Exclusivo de ECORFAN)

Citación: Primer letra (EN MAYUSCULAS) del Nombre del 1^{er} Autor. Apellido, Primer letra (EN MAYUSCULAS) del Nombre del 1^{er} Coautor. Apellido, Primer letra (EN MAYUSCULAS) del Nombre del 2^{do} Coautor. Apellido, Primer letra (EN MAYUSCULAS) del Nombre del 3^{er} Coautor. Apellido

Institución de Afiliación del Autor incluyendo dependencia (en Times New Roman No.10 y Cursiva)

Correo institucional [Times New Roman No.10]

Primera letra (EN MAYUSCULAS) del Nombre Directores. Apellidos (eds.) *Título del Proceedings [Times New Roman No.10]*, Temas Selectos del área que corresponde ©ECORFAN- Filial, Año.

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

Abstract

Texto redactado en Times New Roman No.12, espacio sencillo, en inglés.

Indicar (3-5) palabras clave en Times New Roman y Negritas No.12

1 Introducción

Texto redactado en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

Explicación del tema en general y explicar porque es importante.

¿Cuál es su valor agregado respecto de las demás técnicas?

Enfocar claramente cada una de sus características.

Explicar con claridad el problema a solucionar y la hipótesis central.

Explicación de las secciones del Capítulo.

Desarrollo de Secciones y Apartados del Capítulo con numeración subsecuente

[Título en Times New Roman No.12, espacio sencillo y Negrita]

Desarrollo de Capítulos en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

Inclusión de Gráficos, Figuras y Tablas-Editables

En el *contenido del Capítulo* todo gráfico, tabla y figura debe ser editable en formatos que permitan modificar tamaño, tipo y número de letra, a efectos de edición, estas deberán estar en alta calidad, no pixeladas y deben ser notables aun reduciendo la imagen a escala.

[Indicando el título en la parte Superior con Times New Roman No.12 y Negrita, señalando la fuente en la parte Inferior centrada con Times New Roman No. 10]

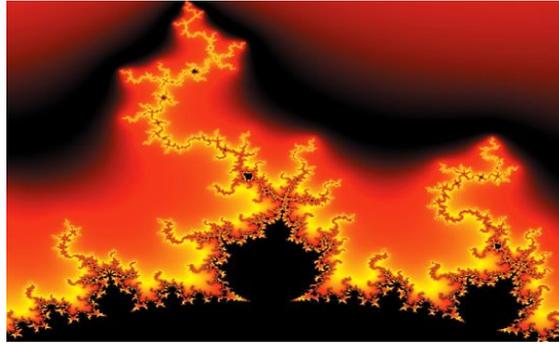
Tabla 1.1 Título

Variable	Descripción	Valor
P ₁	Partición 1	481.00
P ₂	Partición 2	487.00
P ₃	Partición 3	484.00
P ₄	Partición 4	483.50
P ₅	Partición 5	484.00
P ₆	Partición 6	490.79
P ₇	Partición 7	491.61

Fuente de Consulta:

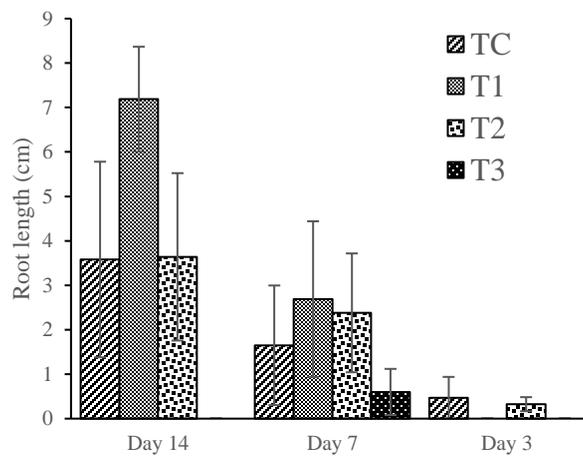
(No deberán ser imágenes, todo debe ser editable)

Figura 1.1 Título



Fuente de Consulta:
(No deberán ser imágenes, todo debe ser editable)

Gráfico 1.1 Título



Fuente de Consulta:
(No deberán ser imágenes, todo debe ser editable)

Cada Capítulo deberá presentar de manera separada en **3 Carpetas**: a) Figuras, b) Gráficos y c) Tablas en formato .JPG, indicando el número en Negrita y el Título secuencial.

Para el uso de Ecuaciones, señalar de la siguiente forma:

$$\int_{lim^{-1}}^{lim^1} = \int \frac{lim^1}{lim^{-1}} = \left[\frac{1(-1)}{lim} \right]^2 = \frac{(0)^2}{lim} = \sqrt{lim} = 0 = 0 \rightarrow \infty \quad (1)$$

Deberán ser editables y con numeración alineada en el extremo derecho.

Metodología a desarrollar

Dar el significado de las variables en redacción lineal y es importante la comparación de los criterios usados.

Resultados

Los resultados deberán ser por sección del Capítulo.

Instructions for Scientific, Technological and Innovation Publication

Anexos

Tablas y fuentes adecuadas.

Agradecimiento

Indicar si fueron financiados por alguna Institución, Universidad o Empresa.

Conclusiones

Explicar con claridad los resultados obtenidos y las posibilidades de mejora.

Referencias

Utilizar sistema APA. **No** deben estar numerados, tampoco con viñetas, sin embargo en caso necesario de numerar será porque se hace referencia o mención en alguna parte del Capítulo.

Ficha Técnica

Cada Capítulo deberá presentar en un documento Word (.docx):

Nombre del Proceedings

Título del Capítulo

Abstract

Keywords

Secciones del Capítulo, por ejemplo:

1. *Introducción*
2. *Descripción del método*
3. *Análisis a partir de la regresión por curva de demanda*
4. *Resultados*
5. *Agradecimiento*
6. *Conclusiones*
7. *Referencias*

Nombre de Autor (es)

Correo Electrónico de Correspondencia al Autor

Referencias

Requerimientos de Propiedad Intelectual para su edición:

-Firma Autógrafa en Color Azul del Formato de Originalidad del Autor y Coautores

-Firma Autógrafa en Color Azul del Formato de Aceptación del Autor y Coautores

Reserva a la Política Editorial

ECORFAN Proceedings se reserva el derecho de hacer los cambios editoriales requeridos para adecuar la Obra Científica a la Política Editorial del ECORFAN Proceedings. Una vez aceptada la Obra Científica en su versión final, el ECORFAN Proceedings enviará al autor las pruebas para su revisión. ECORFAN® únicamente aceptará la corrección de erratas y errores u omisiones provenientes del proceso de edición de la revista reservándose en su totalidad los derechos de autor y difusión de contenido. No se aceptarán supresiones, sustituciones o añadidos que alteren la formación de la Obra Científica.

Código de Ética – Buenas Prácticas y Declaratoria de Solución a Conflictos Editoriales

Declaración de Originalidad y carácter inédito de la Obra Científica, de Autoría, sobre la obtención de datos e interpretación de resultados, Agradecimientos, Conflicto de intereses, Cesión de derechos y distribución.

La Dirección de ECORFAN-México, S.C reivindica a los Autores de la Obra Científica que su contenido debe ser original, inédito y de contenido Científico, Tecnológico y de Innovación para someterlo a evaluación.

Los Autores firmantes de la Obra Científica deben ser los mismos que han contribuido a su concepción, realización y desarrollo, así como a la obtención de los datos, la interpretación de los resultados, su redacción y revisión. El Autor de correspondencia de la Obra Científica propuesto requisitara el formulario que sigue a continuación.

Título de la Obra Científica:

- El envío de una Obra Científica a ECORFAN Proceedings emana el compromiso del autor de no someterlo de manera simultánea a la consideración de otras publicaciones seriadas para ello deberá complementar el Formato de Originalidad para su Obra Científica, salvo que sea rechazado por el Comité de Arbitraje, podrá ser retirado.
- Ninguno de los datos presentados en esta Obra Científica ha sido plagiado ó inventado. Los datos originales se distinguen claramente de los ya publicados. Y se tiene conocimiento del testeo en PLAGSCAN si se detecta un nivel de plagio Positivo no se procederá a arbitrar.
- Se citan las referencias en las que se basa la información contenida en la Obra Científica, así como las teorías y los datos procedentes de otras Obras Científicas previamente publicados.
- Los autores firman el Formato de Autorización para que su Obra Científica se difunda por los medios que ECORFAN-México, S.C. en su Holding México considere pertinentes para divulgación y difusión de su Obra Científica cediendo sus Derechos de Obra Científica.
- Se ha obtenido el consentimiento de quienes han aportado datos no publicados obtenidos mediante comunicación verbal o escrita, y se identifican adecuadamente dicha comunicación y autoría.
- El Autor y Co-Autores que firman este trabajo han participado en su planificación, diseño y ejecución, así como en la interpretación de los resultados. Asimismo, revisaron críticamente el trabajo, aprobaron su versión final y están de acuerdo con su publicación.
- No se ha omitido ninguna firma responsable del trabajo y se satisfacen los criterios de Autoría Científica.
- -Los resultados de esta Obra Científica se han interpretado objetivamente. Cualquier resultado contrario al punto de vista de quienes firman se expone y discute en la Obra Científica.

Copyright y Acceso

La publicación de esta Obra Científica supone la cesión del copyright a ECORFAN-Mexico, S.C en su Holding México para su ECORFAN Proceedings, que se reserva el derecho a distribuir en la Web la versión publicada de la Obra Científica y la puesta a disposición de la Obra Científica en este formato supone para sus Autores el cumplimiento de lo establecido en la Ley de Ciencia y Tecnología de los Estados Unidos Mexicanos, en lo relativo a la obligatoriedad de permitir el acceso a los resultados de Investigaciones Científicas.

Título de la Obra Científica:

Nombre y apellidos del Autor de contacto y de los Coautores	Firma
1.	
2.	
3.	
4.	

Principios de Ética y Declaratoria de Solución a Conflictos Editoriales

Responsabilidades del Editor

El Editor se compromete a garantizar la confidencialidad del proceso de evaluación, no podrá revelar a los Árbitros la identidad de los Autores, tampoco podrá revelar la identidad de los Árbitros en ningún momento.

El Editor asume la responsabilidad de informar debidamente al Autor la fase del proceso editorial en que se encuentra el texto enviado, así como de las resoluciones del arbitraje a Doble Ciego.

El Editor debe evaluar los manuscritos y su contenido intelectual sin distinción de raza, género, orientación sexual, creencias religiosas, origen étnico, nacionalidad, o la filosofía política de los Autores.

El Editor y su equipo de edición de los Holdings de ECORFAN® no divulgarán ninguna información sobre la Obra Científica enviado a cualquier persona que no sea el Autor correspondiente.

El Editor debe tomar decisiones justas e imparciales y garantizar un proceso de arbitraje por pares justa.

Responsabilidades del Consejo Editorial

La descripción de los procesos de revisión por pares es dada a conocer por el Consejo Editorial con el fin de que los Autores conozcan cuáles son los criterios de evaluación y estará siempre dispuesto a justificar cualquier controversia en el proceso de evaluación. En caso de Detección de Plagio a la Obra Científica el Comité notifica a los Autores por Violación al Derecho de Autoría Científica, Tecnológica y de Innovación.

Responsabilidades del Comité Arbitral

Los Árbitros se comprometen a notificar sobre cualquier conducta no ética por parte de los Autores y señalar toda la información que pueda ser motivo para rechazar la publicación de la Obra Científica. Además, deben comprometerse a mantener de manera confidencial la información relacionada con la Obra Científica que evalúan.

Cualquier manuscrito recibido para su arbitraje debe ser tratado como documento confidencial, no se debe mostrar o discutir con otros expertos, excepto con autorización del Editor.

Los Árbitros se deben conducir de manera objetiva, toda crítica personal al Autor es inapropiada.

Los Árbitros deben expresar sus puntos de vista con claridad y con argumentos válidos que contribuyan al que hacer Científico, Tecnológica y de Innovación del Autor.

Los Árbitros no deben evaluar los manuscritos en los que tienen conflictos de intereses y que se hayan notificado al Editor antes de someter la Obra Científica a evaluación.

Responsabilidades de los Autores

Los Autores deben garantizar que sus Obras Científicas son producto de su trabajo original y que los datos han sido obtenidos de manera ética.

Los Autores deben garantizar no han sido previamente publicados o que no estén siendo considerados en otra publicación seriada.

Los Autores deben seguir estrictamente las normas para la publicación de Obra Científica definidas por el Consejo Editorial.

Los Autores deben considerar que el plagio en todas sus formas constituye una conducta no ética editorial y es inaceptable, en consecuencia, cualquier manuscrito que incurra en plagio será eliminado y no considerado para su publicación.

Los Autores deben citar las publicaciones que han sido influyentes en la naturaleza de la Obra Científica presentado a arbitraje.

Servicios de Información

Indización - Bases y Repositorios

RESEARCH GATE	For international bibliographer's manager
MENDELEY	For basification of data from scientific journals
GOOGLE SCHOLAR	For your international search specialized in retrieving scientific documents
REDIB	Ibero-American Network of Innovation and scientific knowledge-CSIC

Servicios Editoriales:

Identificación de Citación e Índice H.
Administración del Formato de Originalidad y Autorización.
Testeo de Chapter con PLAGSCAN.
Evaluación de Obra Científica.
Emisión de Certificado de Arbitraje.
Edición de Obra Científica.
Maquetación Web.
Indización y Repositorio
Publicación de Obra Científica.
Certificado de Obra Científica.
Facturación por Servicio de Edición.

Política Editorial y Administración

244 - 2 Itzopan Calle. La Florida, Ecatepec Municipio México Estado, 55120 Código postal, MX. Tel: +52 1 55 2024 3918, +52 1 55 6159 2296, +52 1 55 4640 1298; Correo electrónico: contact@ecorfan.org
www.ecorfan.org

ECORFAN®

Editora en Jefe

RAMOS-ESCAMILLA, María. PhD

Redactor Principal

SERRUDO-GONZALES, Javier. BsC

Asistente Editorial

ROSALES-BORBOR, Eleana. BsC

SORIANO-VELASCO, Jesus. BsC

Director Editorial

PERALTA-CASTRO, Enrique. MsC

Editor Ejecutivo

VARGAS-DELGADO, Oscar. PhD

Editores de Producción

ESCAMILLA-BOUCHAN, Imelda. PhD

LUNA-SOTO, Vladimir. PhD

Administración Empresarial

REYES-VILLAO, Angélica. BsC

Control de Producción

RAMOS-ARANCIBIA Alejandra. BsC

DÍAZ-OCAMPO Javier. BsC

Editores Asociados

OLIVES-MALDONADO, Carlos. MsC

MIRANDA-GARCIA, Marta. PhD

CHIATCHOUA, Cesaire. PhD

SUYO-CRUZ, Gabriel. PhD

CENTENO-ROA, Ramona. MsC

ZAPATA-MONTES, Nery Javier. PhD

ALAS-SOLA, Gilberto Américo. PhD

MARTÍNEZ-HERRERA, Erick Obed. MsC

ILUNGA-MBUYAMBA, Elisée. MsC

IGLESIAS-SUAREZ, Fernando. MsC

VARGAS-DELGADO, Oscar. PhD

Publicidad y Patrocinio

(ECORFAN®- Mexico- Bolivia- Spain- Ecuador- Cameroon- Colombia- El Salvador- Guatemala- Nicaragua- Peru- Paraguay- Democratic Republic of The Congo- Taiwan), sponsorships@ecorfan.org

Licencias del Sitio

03-2010-032610094200-01-Para material impreso, 03-2010-031613323600-01-Para material electrónico, 03-2010-032610105200-01-Para material fotográfico, 03-2010-032610115700-14-Para Compilación de Datos, 04 -2010-031613323600-01-Para su página Web, 19502-Para la Indización Iberoamericana y del Caribe, 20-281 HB9-Para la Indización en América Latina en Ciencias Sociales y Humanidades, 671-Para la Indización en Revistas Científicas Electrónicas España y América Latina, 7045008-Para su divulgación y edición en el Ministerio de Educación y Cultura-España, 25409-Para su repositorio en la Biblioteca Universitaria-Madrid, 16258-Para su indexación en Dialnet, 20589-Para Indización en el Directorio en los países de Iberoamérica y el Caribe, 15048-Para el registro internacional de Congresos y Coloquios. financingprograms@ecorfan.org

Oficinas de Gestión

244 Itzopan, Ecatepec de Morelos–México.

21 Santa Lucía, CP-5220. Libertadores -Sucre–Bolivia.

38 Matacerquillas, CP-28411. Morazarzal –Madrid-España.

18 Marcial Romero, CP-241550. Avenue, Salinas I - Santa Elena-Ecuador.

1047 La Raza Avenue -Santa Ana, Cusco-Peru.

Boulevard de la Liberté, Immeuble Kassap, CP-5963.Akwa- Douala-Cameroon.

Southwest Avenue, San Sebastian – León-Nicaragua.

6593 Kinshasa 31 – Republique Démocratique du Congo.

San Quentin Avenue, R 1-17 Miralvalle - San Salvador-El Salvador.

16 Kilometro, American Highway, House Terra Alta, D7 Mixco Zona 1-Guatemala.

105 Alberdi Rivarola Captain, CP-2060. Luque City- Paraguay.

Distrito YongHe, Zhongxin, calle 69. Taipei-Taiwán.

