

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**“Estudio de los factores de daño celular presentes
durante el secado y almacenamiento de esporas de
Trichoderma harzianum”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

p r e s e n t a

IBQ Marco Tulio Fernández Sandoval

Cuernavaca, Mor. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del **Dr. Enrique Galindo Fentanes**, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la asesoría del **Dr. Leobardo Serrano Carreón**, Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos al Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN 203905-2 y de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Reconocimientos:

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes y Dr. Leobardo Serrano Carreón por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por apoyarme en todo lo necesario durante la realización de este proyecto y por todos sus comentarios y sugerencias que condujeron a entender mejor las cosas.

A los miembros del jurado, por sus revisiones y correcciones a la tesis, que sin lugar a dudas hicieron de ésta un mejor trabajo:

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera
Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López
Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Dr. Leobardo Serrano Carreón

Al Dr. Edmundo Castillo y al Dr. Jorge Nieto por sus comentarios y sugerencias al formar parte del Comité Tutorial. A la M.C. Celia Flores por su gran amistad, consejos y conocimientos compartidos. Al Dr. Carlos Peña por sus comentarios y ayuda brindados. A la Dra. Maria Soledad Córdoba por su apoyo académico y técnico y al Dr. José Antonio Rocha por su amistad y compañerismo.

Al personal de Planta Piloto, a la Quím. Miriam Ortiz, a la Ing. Verónica Albiter, al Tec. Mario Caro, al Sr. Arturo Escobar, al M.C. Juan Canul y al M.C. Martín Patiño por toda su ayuda técnica en la realización de este proyecto, además de instrucciones y amistad.

A todos mis amigos y compañeros de los grupos EG, OTR y del Instituto, gracias por permitirme conocerlos y convivir con cada uno de ustedes, realmente las cosas fueron más sencillas y divertidas con todos ustedes.

Índice General

	Página
Índice General	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	v
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1 Control biológico	4
2.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i> como agente de control biológico	4
2.2 Formulaciones	7
2.2.1 Preservación de microorganismos	8
2.3 Daño celular durante el proceso de secado	10
2.3.1 Deshidratación	10
2.3.1.1 Métodos de deshidratación	12
2.3.1.2 Humedad de monocapa	12
2.3.1.3 Daño por deshidratación	14
2.3.2 Efecto de la temperatura en la viabilidad de microorganismos	16
2.3.2.1 Ecuación de Arrhenius	16
2.3.3 Efecto de la oxidación	20
2.3.3.1 Especies reactivas de oxígeno	20
2.3.3.2 Daño por especies reactivas de oxígeno a macromoléculas biológicas	21
2.3.3.3 Productos de la oxidación de lípidos y daños causados	23
2.4 Sobrevivencia en condiciones de desecación	25
2.4.1 Efecto protector de algunos azúcares	25
2.4.2 El estado vítreo	27
3. Justificación	30
4. Objetivos	31
5. Materiales y métodos	32
5.1 Producción de esporas	32
5.1.1 Microorganismo	32
5.1.2 Recuperación y conteo de esporas para inocular el medio de cultivo	32
5.1.3 Medio de cultivo	32
5.1.4 Cultivo en fermentador para la producción de esporas	33
5.1.5 Recuperación de esporas	33
5.2 Estudio de la muerte térmica de las esporas	34
5.3 Estudio del efecto de la deshidratación sobre la viabilidad de las esporas	34
5.3.1 Efecto de la deshidratación en sistemas cerrados	34
5.3.2 Efecto de la velocidad de deshidratación a vacío	35
5.4 Secado por aspersión de esporas de <i>T. harzianum</i>	36
5.5 Efecto de la A_w de deshidratación y de la A_w y temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad y vida de anaquel de las esporas	36
5.6 Isotermas de desorción de esporas de <i>T. harzianum</i>	37
5.6.1 Estimación del valor de humedad de monocapa de esporas de <i>T. harzianum</i>	37
5.7 Métodos analíticos	37
5.7.1 Cuantificación de biomasa total y esporas	37
5.7.2 Determinación de glucosa residual	38
5.7.3 Estudio de la oxidación de lípidos	38
5.7.3.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno intracelulares	38
5.7.3.2 Curva estándar de oxidación de 2',7' diclorofluorescina (DCFH)	39
5.7.3.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno en esporas almacenadas por el método de DCFH	40

5.7.3.4 Cuantificación de malondialdehído como producto de la oxidación de macromoléculas	41
5.7.3.5 Curva estándar de malondialdehído	41
5.7.3.6 Determinación de malondialdehído en esporas almacenadas	42
5.7.4 Determinación de actividad de agua en muestras deshidratadas	43
5.7.5 Determinación del contenido de agua en muestras deshidratadas	43
6. Resultados y discusión	44
6.1 Cinéticas de producción de biomasa y consumo de sustrato	44
6.2 Estudio de muerte térmica en esporas de <i>T. harzianum</i>	44
6.3 Estudio del efecto de la deshidratación y de su velocidad sobre la viabilidad de esporas de <i>T. harzianum</i>	49
6.3.1 Efecto de la deshidratación sobre la viabilidad de las esporas	49
6.3.2 Efecto de la velocidad de deshidratación sobre la viabilidad de las esporas	50
6.4 Secado por aspersión de esporas de <i>T. harzianum</i>	53
6.5 Isotermas de desorción de esporas de <i>T. harzianum</i> a diferentes temperaturas	57
6.5.1 Determinación del valor de humedad de monocapa de esporas de <i>T. harzianum</i>	57
6.6 Efecto de la A_w y temperatura de almacenamiento sobre la vida de anaquel de las esporas	60
6.7 Oxidación de lípidos durante el almacenamiento de esporas de <i>T. harzianum</i>	66
6.7.1 Determinación de oxidación de lípidos en muestras almacenadas a distintas A_w a 4°C	66
6.7.2 Determinación de oxidación de lípidos en muestras almacenadas a distintas A_w a 25°C	68
6.8 Vida de anaquel de las esporas en función de las concentraciones de ERO y MDA a diferentes temperaturas	71
6.9 Efecto de la A_w de deshidratación y A_w y temperatura de almacenamiento sobre la vida de anaquel de las esporas	73
6.10 Efecto de la A_w de deshidratación y A_w y temperatura de almacenamiento en la generación de MDA en las esporas	76
7. Conclusiones	78
8. Perspectivas	79
9. Bibliografía	80
Apéndice	87

Índice de Figuras		Página
Figura 2.1.	Mecanismo por el cual la trehalosa estabiliza capas de fosfolípidos deshidratadas.	15
Figura 2.2.	Datos de velocidad de muerte para esporas bacterianas (<i>Bacillus stearothermophilus</i>).	17
Figura 2.3.	Log UFC vs tiempo para <i>Bacillus cereus</i> CNRZ 110 a 95°C en pH 7 con una A_w de 1 ó 0.9 ajustada con sacarosa.	19
Figura 2.4.	Mecanismo de peroxidación de lípidos.	21
Figura 2.5.	Sobrevivencia y relación lípidos insaturados/saturados durante el almacenamiento de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .	22
Figura 2.6.	Diagrama de fase que presenta las temperaturas de transición vítrea en función del contenido de agua para trehalosa y sacarosa.	28
Figura 5.1.	Mecanismo propuesto de la entrada de DCFH-DA a las células, su desacetilación a DCFH y su oxidación a DCF.	39
Figura 5.2.	Curva estándar de oxidación de DCFH en función de la concentración de H_2O_2 .	40
Figura 5.3.	Curva estándar de concentración de MDA a 586 nm.	42
Figura 6.1.	Cinética de la producción de biomasa, esporas y concentración de glucosa residual durante la producción de esporas como material biológico de estudio.	44
Figura 6.2.	Gráfico de índice de sobrevivencia en función del tiempo a diferentes temperaturas, indicando las constantes de velocidad de muerte térmica para esporas de <i>T. harzianum</i> .	45
Figura 6.3.	Gráfico del logaritmo natural de los valores de k versus el inverso de la temperatura (K^{-1}) para obtener E_{ia} y k_o .	46
Figura 6.4.	Sobrevivencia en función de la deshidratación en sistemas cerrados con sales expresada como A_w a 4°C.	49
Figura 6.5.	Sobrevivencia en función de la deshidratación a vacío expresada como A_w a 4°C.	50
Figura 6.6.	Micrografías electrónicas de esporas deshidratadas a vacío a distintas A_w a 4°C.	51
Figura 6.7.	Sobrevivencia de muestras secadas por aspersión a una temperatura de entrada de 120°C, 100°C y 80°C en función de la temperatura de salida.	54
Figura 6.8.	Micrografías electrónicas de esporas de <i>T. harzianum</i> secadas por aspersión con fécula de maíz como soporte.	55
Figura 6.9.	Isotermas de desorción de esporas de <i>T. harzianum</i> a 4°C y 25°C	57
Figura 6.10.	Gráfico de $A_w/(1-A_w)X$ en función de A_w que representa la ecuación de BET linealizada para el cálculo de la humedad de monocapa (X_o) y la constante C.	58
Figura 6.11.	Gráfico de A_w/X en función de A_w que representa la ecuación de GAB para el cálculo del valor de la monocapa (X_o) y las constantes C y K.	59
Figura 6.12.	Gráfico del $\ln 1/X$ en función de A_w que representa la ecuación de Caurie para el cálculo del valor de la humedad de seguridad (X_s) y la constante r.	60
Figura 6.13.	Efecto de la A_w sobre la vida de anaquel de muestras almacenadas a 4°C.	61
Figura 6.14.	Efecto de la A_w sobre la vida de anaquel de muestras almacenadas a 25°C.	62
Figura 6.15.	Pérdida de sobrevivencia por día en función de la A_w de almacenamiento a 4°C y 25°C.	62
Figura 6.16.	Concentraciones específicas de ERO en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 4°C.	66

Figura 6.17.	Concentraciones específicas de MDA en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 4°C.	67
Figura 6.18.	Concentraciones específicas de ERO en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 25°C.	69
Figura 6.19.	Concentraciones específicas de MDA en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 25°C.	69
Figura 6.20.	Sobrevivencia en función de la concentración específica de ERO a 4°C y 25°C después de 75 días de almacenamiento.	71
Figura 6.21.	Sobrevivencia en función de la concentración específica de MDA a 4°C y 25°C después de 75 días de almacenamiento.	72
Figura 6.22.	Sobrevivencia en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 4°C después de 60 días de almacenamiento.	73
Figura 6.23.	Sobrevivencia en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 25°C después de 60 días de almacenamiento.	74
Figura 6.24.	Micrografías electrónicas de esporas almacenadas por 60 días a diferentes A_w a 25°C.	75
Figura 6.25.	Concentración específica de MDA en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 4°C después de 60 días de almacenamiento.	76
Figura 6.26.	Concentración específica de MDA en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 25°C después de 60 días de almacenamiento.	77

Índice de Tablas

		Página
Tabla 2.1	Valores mínimos inhibitorios de A_w para el crecimiento y desarrollo de microorganismos.	11
Tabla 5.1	Composición del medio de cultivo para la producción de conidios de <i>T. harzianum</i> .	33
Tabla 6.1	Constantes específicas de muerte térmica (k) para esporas de <i>T. harzianum</i> a distintas temperaturas suspendidas en buffer de fosfatos pH 5.6.	45
Tabla 6.2	Energías de inactivación térmica de algunos compuestos y microorganismos.	47
Tabla 6.3	Comparación entre los principales métodos de secado utilizados para preservar esporas de hongos.	56
Tabla 6.4	Valores calculados de monocapa (X_0) y la constante C utilizando la ecuación de BET a 4°C y 25°C.	58
Tabla 6.5	Valores calculados de monocapa (X_0) y las constantes C y K utilizando la ecuación de GAB a 4°C y 25 °C.	59
Tabla 6.6	Valores calculados de humedad de seguridad (X_s) y constante r utilizando la ecuación de Caurie a 4°C y 25°C.	60
Tabla A.1	Medición de actividad de agua de soluciones saturadas de sales a 4°C y 25°C.	87
Tabla A.2	Ajuste de datos experimentales obtenidos por diferentes modelos de isoterms de desorción a 4°C y 25°C de esporas de <i>T. harzianum</i> .	90

Resumen

Trichoderma harzianum es un hongo con un gran potencial industrial en la obtención de aromas para alimentos y diversas enzimas, además de que favorece el crecimiento de plantas y actúa como agente de control biológico. Se ha determinado que el mejor propágulo para que este agente de control biológico pueda formularse e implantarse en campos de cultivo son las esporas, debido a su mayor resistencia a procesos de formulación como es el secado y a condiciones ambientales adversas.

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio para evaluar los daños que sufren las esporas de *T. harzianum* durante el secado. Se estudió la contribución del daño térmico, deshidratación y de las condiciones que favorecen la oxidación de lípidos celulares, además de establecer las condiciones de temperatura y humedad relativa durante el almacenamiento que permitan mantener una elevada vida de anaquel de las esporas.

Se determinó que las esporas de *T. harzianum* producidas en medio líquido presentan una gran sensibilidad a la temperatura y que la energía de inactivación (39 kcal/mol), estimada ajustando los datos a la ecuación de Arrhenius, fue baja en comparación con las obtenidas para microorganismos termorresistentes (70 kcal/mol).

Por otra parte, la deshidratación, no mostró efecto significativo sobre la viabilidad de las esporas. Sin embargo, fue durante el almacenamiento que el grado de deshidratación tuvo un efecto considerable sobre la viabilidad, disminuyéndola cuando las esporas fueron almacenadas a valores extremos de actividad de agua (0.1 y 0.7).

Para determinar las mejores condiciones de almacenamiento, las esporas fueron conservadas en contenedores cerrados a una actividad de agua constante en el rango de 0.1 a 0.7 y a temperaturas de 4°C ó 25°C. Los resultados mostraron que la actividad de agua para un almacenamiento óptimo está en función inversa de la temperatura.

Al relacionar la sobrevivencia con la oxidación de lípidos durante el almacenamiento, se observó que la sobrevivencia de las esporas disminuye cuando las concentraciones de especies reactivas de oxígeno y de malondialdehído aumentan y que éste aumento está relacionado inversamente con la actividad de agua del almacenamiento. Se observó que el mayor incremento de estas moléculas fue cuando las células se almacenaron a contenidos de humedad inferiores a la humedad de monocapa de las células, lo que indica la importancia de este valor de humedad en la preservación de microorganismos.

Por último, se realizaron pruebas en un secador por aspersión con suspensiones de esporas en buffer de fosfatos a tres temperaturas de aire de entrada (120°C, 100°C y 80°C) y diferentes flujos de alimentación. Se observó que la disminución de la viabilidad de las muestras fue inversamente proporcional a las temperaturas de entrada y salida del secador y, aparentemente, independiente de su actividad de agua.

El presente trabajo nos permitió evaluar el efecto que tiene cada uno de los factores involucrados en el secado: temperatura y deshidratación, sobre la viabilidad de las esporas de *T. harzianum*. Además, se determinaron las mejores condiciones de almacenamiento donde se puede obtener una elevada vida de anaquel de esporas sin formular y su relación con la generación de moléculas que promueven la oxidación.

I. Introducción

La agricultura a nivel mundial sufre de grandes pérdidas debido al ataque de plagas y enfermedades de diversos cultivos comerciales. Tradicionalmente la prevención de plagas y enfermedades se ha logrado a través del uso de pesticidas químicos que tienen un amplio efecto sobre diversos fitopatógenos. Sin embargo, el uso indiscriminado de los pesticidas químicos conlleva graves impactos al medio ambiente, en la salud de los consumidores y al desarrollo de resistencia de las especies patógenas a los productos químicos (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

El reemplazo o reducción del uso de agentes químicos se ha logrado por el uso de antagonistas de origen biológico, los que se conocen como agentes de control biológico. Dentro del gran repertorio de microorganismos con actividad antagonista, diversas especies de hongos del género *Trichoderma* son efectivas para el control de un amplio rango de fitopatógenos en una gran variedad de hábitats. Aislados de *Trichoderma* han sido utilizados contra diferentes enfermedades en muchos cultivos como son: algodón, vid, maíz, lechuga, cebolla, frijol, ciruela, manzana y zanahoria; causadas por hongos fitopatógenos tales como *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* y *Fusarium*, entre otros (Chet, 1987; Wang *et al.*, 2005).

El alto grado de adaptabilidad ecológica mostrado por cepas del género *Trichoderma* es reflejada en el hecho de que estos hongos son comunes en suelos de todo el mundo, resisten diferentes condiciones ambientales y tienen la capacidad de crecer sobre sustratos no costosos. Lo anterior hace de los aislados de *Trichoderma*, candidatos atractivos para una variedad de aplicaciones de control biológico (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Los mecanismos de acción antagonista de las cepas de *Trichoderma* que se han descrito a la fecha incluyen la producción de antibióticos volátiles y no volátiles, el micoparasitismo (Chet, 1987) y la competencia de espacio y nutrientes frente a los fitopatógenos (Cook y Baker, 1983; Chet, 1987). De los antes mencionados, el micoparasitismo es el principal mecanismo de acción antagónica de *Trichoderma sp.*, que incluye: 1) crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma*, mediado por sustancias químicas excretadas por los fitopatógenos; 2) reconocimiento del organismo huésped por *Trichoderma*; 3) excreción de enzimas hidrolíticas por *Trichoderma* y 4) lisis de la pared celular del huésped por las enzimas excretadas lo que conduce a la muerte del fitopatógeno (Chet *et al.*, 1987).

Para que *Trichoderma sp.* pueda ser utilizado como agente de control biológico, es necesario contar con un tipo de propágulo que le permita desarrollarse y resistir de la mejor manera los

cambios ambientales a los que son expuestos. *Trichoderma sp.* produce tres tipos de propágulos: micelio, clamidiosporas y conidios (Papavizas, 1985). De estos propágulos, los conidios o esporas son la forma natural de resistencia a condiciones ambientales adversas y, de acondicionamiento para su mantenimiento (secado) (Jin *et al.*, 1991).

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un proceso para la obtención de una alta concentración de conidios de *Trichoderma harzianum*, que permite alcanzar hasta concentraciones de 5.4×10^8 conidios mL^{-1} en cultivo sumergido, con viabilidades por arriba del 60% después de la fermentación y recuperación (Gamboa, 2004). Sin embargo, para la preservación de este material biológico es necesario llevar a cabo operaciones de acondicionamiento, además de formulados, que proporcionen al producto una larga vida de anaquel y efectividad a largo plazo.

La formulación, sin duda, es una parte importante para que un agente de control biológico pueda tener una larga vida de anaquel y estabilidad biológica (Rodham *et al.*, 1999). Los formulados más usados son los deshidratados por su mayor estabilidad, mejor manejo y capacidad de almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo muchos de los formulados son producidos por secado, el cual genera diversos daños cuando los microorganismos son sometidos a este proceso.

A la fecha la obtención de propágulos de *T. harzianum* de alta calidad aún esta limitada por las condiciones de operación de secado y almacenamiento de esporas, obteniendo una baja viabilidad y vida de anaquel de las mismas. Adicionalmente, la falta de conocimiento de los factores que causan daño a las esporas de *T. harzianum* durante el secado (daño térmico y por deshidratación), y durante el almacenamiento (daño por oxidación), también han resultado ser una limitante para lograr una larga vida de anaquel.

Hasta ahora se han registrado estudios de los daños que presentan diversos microorganismos, incluidos agentes de control biológico, cuando se secan y almacenan. No obstante, dichos estudios se han enfocado principalmente en mejorar las variables de proceso durante el secado, sin profundizar realmente en los factores que causan el daño celular. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue, además de establecer las mejores condiciones de secado y almacenamiento, llevar a cabo un estudio de los factores que dañan a las células durante el secado y almacenamiento; así como, determinar el impacto de cada uno de ellos sobre este agente de control biológico y tratar de explicar los posibles mecanismos de daño y defensa celular.

II. Antecedentes

2.1 Control biológico

El control biológico se ha definido como la actividad en la cual son utilizados organismos, enemigos naturales, o metabolitos producidos por éstos, con el objetivo de reducir o eliminar el desarrollo de plagas y enfermedades agrícolas (Thomas y Willis, 1998; Viterbo *et al.*, 2002).

Aunque el número de productos de control biológico está en incremento, en la actualidad estos productos todavía representan alrededor del 1% de las ventas de plaguicidas agrícolas (Fravel, 2005). A pesar de esto, los agentes de control biológico han despertado un gran interés debido a que ofrecen distintas alternativas de manejo de plagas con diferentes mecanismos de acción con respecto a pesticidas químicos.

Actualmente, el control biológico puede ser usado en situaciones donde el control químico no es posible, debido a los residuos que se presentan en los alimentos o donde se desea que el producto sea certificado como orgánico. Así mismo, los agentes de control biológico pueden ser usados en combinación con dosis disminuidas de pesticidas, reduciendo la resistencia que se pudiera generar entre los fitopatógenos (Fravel, 2005).

Entre los factores que han limitado el interés comercial en control biológico se encuentran el desconocimiento por los agricultores de estos productos y de sus mecanismos de control, la subestimación de la capacidad que tienen los agentes de control biológico de eliminar los fitopatógenos y su alto costo de producción (Fravel, 2005).

Entre los microorganismos utilizados con gran eficacia como agentes de control biológico se encuentran bacterias, hongos, nemátodos y virus los cuales tienen un amplio rango de acción sobre fitopatógenos de interés. Además, continuamente se aíslan nuevas cepas con actividad antagonista y se generan otras, por medio de recombinación genética, con una mayor actividad antagonista (Charnley, 1991).

2.1.1 *Trichoderma harzianum* como agente de control biológico

Productos de control biológico con base en hongos cubren un amplio rango de aplicaciones, incluyendo el uso como antagonistas de otros hongos, inductores de crecimiento en plantas y agentes de control de insectos (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Las especies de *Trichoderma* han sido utilizadas efectivamente en contra de muchos otros hongos fitopatógenos, incluyendo los géneros *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, sobre muchos cultivos (Fravel, 2005; Batta, 2004). Estos hongos (*Trichoderma sp.*) actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular encontrados en sus hospederos, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular (Ezziyyani *et al.* 2004).

Trichoderma sp. son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aislados y cultivados, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a su inocuidad a plantas superiores (Papavizas *et al.*, 1982). Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan a un fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos: competición directa por el espacio o nutrientes (Chet y Ibar, 1994; Belanger *et al.*, 1995); producción de antibióticos de naturaleza volátil o no volátil (Chet *et al.*, 1997; Sid Ahmed *et al.*, 2000) y parasitismo directo sobre los hongos fitopatógenos (Yedida *et al.*, 1999; Ezziyyani *et al.*, 2004).

T. harzianum produce antibióticos como lactonas, isonitrilos, poliquétidos, peptaiboles, etc. (Hjeljord y Tronsmo, 1998), y enzimas (β -1,3-glucanasa, quitinasa, proteasa y celulasa) las cuales degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos y juegan un importante papel en el micoparasitismo (Herrera-López *et al.*, 1999; Sid Ahmed *et al.*, 2000).

En estudios del efecto antagonista de *Trichoderma* sobre *Phytophthora capsici*, *Trichoderma* demostró un claro efecto antagónico en cultivos duales realizados *in vitro*, aunque la intensidad de inhibición varió según el medio de cultivo, la temperatura y el pH. También se presentó una reducción de la podredumbre causada por *P. capsici* en plantas sembradas en macetas e invernaderos con respecto a un control no tratado con *T. harzianum*. En semillas de *Capsicum annuum* tratadas por sumergimiento en una solución de *T. harzianum* filtrada previamente, el porcentaje de germinación y la longitud de las plántulas fueron superiores a los de las no tratadas (Ezziyyani *et al.*, 2004).

Conidios de *T. harzianum*, formulados en una emulsión, redujeron significativamente el diámetro de lesión causado por *Penicillium expansum* en manzanas, además, el tiempo medio necesario para la esporulación de *P. expansum* se incrementó significativamente cuando se aplicaron tratamientos con los mismos formulados de conidios de *T. harzianum* en manzanas post-cosecha almacenadas a 20°C (Batta, 2004).

Harman *et al.* (1996) reportaron que la combinación de agentes de control biológico como *T. harzianum* y fungicidas químicos ofrecieron buen control sobre *Botrytis cinerea* en la pudrición de racimos de uvas y, así redujeron el uso de pesticida.

De los tres propágulos que produce *Trichoderma* (micelio, clamidiosporas y esporas), el micelio es la forma por medio de la cual *Trichoderma* realiza su mecanismo antogónico sobre el fitopatógeno; sin embargo, es muy poco resistente a operaciones de secado, filtrado y molido, lo que lo hace impráctico para formular (Papavizas *et al.*, 1984). Las clamidiosporas, que son estructuras producidas asexualmente y que surgen de la modificación de segmentos de hifas (Lewis y Papavizas, 1983), requieren un mayor tiempo de producción y maduración, y solamente el 8% son viables después del proceso de secado (Agosin y Aguilera, 1998), aunque son capaces de sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo. Por último, los conidios (esporas) son la forma natural de resistencia a condiciones ambientales adversas, requiriendo un menor tiempo para su producción y son obtenidos en mayor cantidad que las clamidiosporas, además de que son los más resistentes a condiciones ambientales adversas y al proceso de secado (Jin *et al.*, 1991).

De lo anterior se deduce que los propágulos en forma de conidios presentan una enorme ventaja con respecto a los otros (micelio y clamidiosporas) durante la formulación y aplicación, debido al manejo que se les puede dar, su gran producción y la resistencia que presentan a cambios ambientales en el lugar de aplicación, además de presentar una mayor vida de anaquel.

Las características indispensables para que un agente de control biológico con base en esporas de *Trichoderma* sea económicamente viable son (Agosin y Aguilera, 1998):

- 1) Un sistema de producción eficiente ($>1 \times 10^7$ esporas mL^{-1}).
- 2) Relación final de producción esporas / micelio elevada.
- 3) Resistencia a las operaciones de acondicionamiento, en particular al secado.
- 4) Presentar una alta estabilidad y vida de anaquel del producto final, sin requerir refrigeración.
- 5) Capacidad de soportar cambios en el medio ambiente de temperatura, radiación solar y humedad relativa que le permitan establecerse en el suelo y germinar.
- 6) Eficacia consistente de lote a lote de producción.

2.2 Formulaciones

Los agentes de control biológico han demostrado tener un gran potencial en contra de fitopatógenos protegiendo diversos cultivos agrícolas; sin embargo, para facilitar su comercialización deben ser formulados para la obtención de productos capaces de ser almacenados, distribuidos y aplicados dentro del mercado agrícola. La formulación puede afectar muchos aspectos de la función del agente de control biológico, como su vida de anaquel y virulencia (Jenkins y Grzywacz, 2000).

Se han empleado varios métodos para formular y liberar agentes de control biológico. Estos incluyen medios líquidos, sin embargo, los formulados líquidos son voluminosos, difíciles de transportar y de baja estabilidad biológica, por lo que se han descartado para uso comercial. Las formulaciones sólidas deshidratadas no presentan dichas desventajas y son, por mucho, las más utilizadas para la formulación de esporas de hongos antagonistas (Fravel, 2005).

La vida de anaquel es un factor crítico limitante en el uso y aceptación de productos microbianos de control biológico. La vida de anaquel de un agente de control biológico se refiere al periodo de tiempo durante el cual los propágulos del agente microbiano son capaces de mantenerse viables e infectivos. Si los productos biológicos quieren competir con los productos de control químico, la vida de anaquel debería ser tan larga como sea posible y, preferiblemente, no deberían requerir refrigeración o tratamientos especiales. Se ha sugerido que el producto deberá tener una vida de anaquel de por lo menos 1 a 2 años, a temperatura ambiente, para ser comercialmente aceptable (Pedreschi y Aguilera, 1997; Abadías *et al.*, 2000). Actualmente, los productos biológicos disponibles necesitan ser refrigerados, congelados, secados o liofilizados para lograr vidas de anaquel comparables con productos químicos (Jones y Burgues, 1998).

Varios factores afectan la vida de anaquel del producto fúngico, como son las condiciones de cultivo y nutrición durante la fermentación, los métodos de recuperación y cosecha empleados, el contenido de humedad del producto, la formulación, el empaque, etc. (Jenkins y Grzywacz, 2000); además de las condiciones de operación para deshidratar el producto y de las de almacenamiento. Rodhman *et al.* (1999) mencionan que algunos de los factores más importantes que determinan la vida de anaquel de una formulación son la fase de crecimiento al cosechar las células, la composición iónica de la solución usada para resuspender las células antes de secar, los agentes protectores elegidos, la concentración intracelular de moléculas protectoras como trehalosa y sorbitol, además de las condiciones de secado y almacenamiento como son temperatura y humedad relativa.

La inactividad de los conidios no es una propiedad constitutiva, por lo que la clave para prolongar su sobrevivencia es detener la germinación y reducir el metabolismo tanto como sea posible para mantenerlos, sin pérdida de viabilidad. Las formulaciones que permiten a un agente de control biológico encontrarse en un estado de baja actividad metabólica hacen al agente más tolerante a diferentes tipos de estrés ambiental, tales como fluctuaciones de temperatura y humedad, lo que consecuentemente aumenta su vida de anaquel (Elzein *et al.*, 2004). Así, la conservación a largo plazo del agente de control biológico depende, en parte, del éxito con que se logre una reducción de su actividad metabólica mediante operaciones como el secado, sin causar daños debidos a la temperatura y a una gran remoción de agua, en conjunto con optimizar las condiciones de almacenamiento (Horaczek y Viernstein, 2004).

2.2.1 Preservación de microorganismos

La preservación de microorganismos para aplicaciones comerciales y de laboratorio por medio de secado ha sido practicada desde comienzos del siglo pasado (Aguilera y Karel, 1997). El secado por aspersión de microorganismos comenzó con el estudio de Rogers (1914) utilizando bacterias. Desde entonces se han evaluado diferentes formas de secar microorganismos pero son difíciles de comparar debido a los muchos factores que deben ser controlados. Entre otros factores está la naturaleza del microorganismo, el medio y las condiciones de crecimiento y la fase del cultivo en que son recuperadas; así como, los métodos de secado, contenido de humedad residual y condiciones de almacenamiento.

Una gran variedad de microorganismos son deshidratados para concentrarlos y preservar sus propiedades biológicas, como por ejemplo, algunos cultivos iniciadores de bacterias probióticas, levadura para panificación y agentes de control biológico (Teixeira, *et al.*, 1995; Bayrock y Ingledew, 1997; Horaczek y Viernstein, 2004). Sin embargo, en pruebas realizadas con diversos microorganismos, como hongos y bacterias, los problemas a los que siempre se enfrentan los investigadores es que los productos secos presentan una baja viabilidad que depende de las condiciones de operación, como temperatura de secado y deshidratación producida. Al respecto, diversos investigadores han desarrollado varios procesos tecnológicos para optimizar el proceso de secado y controlar las variables de proceso que más repercuten sobre la viabilidad del microorganismo.

Por ejemplo, Gardiner *et al.* (2000), trabajando con dos cepas de *Lactobacillus sp.*, demostraron que uno de los principales factores que gobiernan la sobrevivencia microbiana durante el secado por aspersión es la habilidad de resistir altas temperaturas de proceso. A temperatura de 55°C,

ambas cepas sobrevivieron mientras que a temperaturas mayores de 58°C, hubo diferencias en la tolerancia térmica de ambas cepas.

Fu y Etzel (1995) estudiaron los efectos de la temperatura y concentración bacteriana en la solución de alimentación, sobre la viabilidad y estabilidad *Lactococcus lactis* sp., secado por aspersión. Los autores probaron diferentes flujos de alimentación, los cuales, inversamente determinan las temperaturas a la salida del secador. Con una temperatura del aire de entrada de 220°C, encontraron que al aumentar la concentración celular en el flujo de alimentación, la pérdida de viabilidad disminuía; así mismo, al aumentar la temperatura del aire de salida (debido a una disminución del flujo de alimentación) decrecía el porcentaje de células vivas.

Sandoval-Coronado *et al.* (2001) evaluaron agentes protectores orgánicos e inertes con esporas de *Paecilomyces fumosoroseus* deshidratadas con aire a 28°C, observando que la viabilidad de las esporas formuladas decreció entre 7-18% después de 21 días de almacenamiento a 28°C, dependiendo de la concentración del soporte; mientras que a 4°C decreció entre 9-18% durante 63 días de almacenamiento.

Stephan y Zimmermann (1998), trabajando con esporas de hongos *Metarhizium anisopliae* y *M. flavovi* en un secador por aspersión, determinaron temperaturas óptimas de entrada y salida del secador de 64°C y 48°C. Utilizando agentes protectores como leche descremada en polvo y jarabe de remolacha, obtuvieron viabilidades después del secado del 95.2%, muy cercanas a la viabilidad de esporas frescas del 95.5%. Ellos observaron que la viabilidad de esporas secadas por aspersión está influenciada de forma importante por la temperatura; de tal manera que al aumentar las temperaturas de entrada (90°C) y salida del secador (66°C), ésta última temperatura dependiendo del flujo y concentración de alimentación al secador, la viabilidad de las mismas muestras disminuyó hasta el 61.3%.

Larena *et al.* (2003) estudiaron los efectos de la liofilización, secado por aspersión y lecho fluidizado sobre la sobrevivencia de esporas de *Epicoccum nigrum*. A partir de esporas con una viabilidad inicial del 93.5%, observaron una reducción de la viabilidad a menos del 10% después del secado por aspersión a temperaturas de entrada y salida de 150°C y 80°C, respectivamente, con y sin agentes protectores. En contraste, esporas liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente, por 150 días, mantuvieron la viabilidad inicial utilizando agentes protectores. Las esporas secadas por lecho fluidizado en un rango de temperatura de 30-40°C, mantuvieron el 100% de viabilidad por 90 días, almacenadas a temperatura ambiente, después de lo cual la viabilidad decreció. También Horaczek y Viernstein (2004) reportaron efectos

semejantes de los mismos métodos de deshidratación en esporas de *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae*.

Todos estos trabajos se enfocaron a la optimización del proceso de secado y almacenamiento (temperaturas de aire de entrada y salida, flujos y concentraciones de alimentación, temperaturas de almacenamiento, etc.) para diversos microorganismos y al uso de agentes protectores. En general, han demostrado el daño por altas temperaturas en el proceso, principalmente a la salida del secador y, el daño producido también por altos niveles de deshidratación; además, del efecto de la temperatura durante el almacenamiento. Sin embargo, estos estudios no han profundizado en cada uno de los factores que causan daño celular y aunque han permitido desarrollos tecnológicos no han aclarado la relevancia que tienen tanto los efectos térmicos como de deshidratación, así como las condiciones de almacenamiento, sobre la viabilidad de las células.

2.3 Daño celular durante el proceso de secado

Tres son los factores principales que provocan daño celular durante el secado: la deshidratación, la temperatura y la oxidación de macromoléculas (Bayrock y Ingledew, 1997).

2.3.1 Deshidratación

La deshidratación está definida como la eliminación de agua de un material por diferentes mecanismos, como la evaporación en el proceso de secado, la sublimación en la liofilización, la adsorción de agua por algunos solutos y la ósmosis, entre otros. El parámetro más adecuado para expresar el grado de deshidratación de un producto es la actividad de agua (Fennema, 1996).

Desde hace mucho tiempo, se ha demostrado que la actividad de agua (A_w), definida como la relación entre la presión de vapor de agua en un material y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura, es un parámetro mucho más determinante de la calidad y estabilidad de un producto biológico que la cantidad total de agua presente (Fennema, 1996). La actividad de agua es simplemente el agua disponible, desde el punto de vista termodinámico, para efectuar reacciones biológicas (Grant, 2004). La actividad de agua también es numéricamente igual a la humedad relativa del aire en equilibrio con una muestra (Martínez Navarrete *et al.*, 1999).

La elección de actividad de agua, más que el contenido de humedad, como parámetro de referencia en muchas aplicaciones de procesamiento y almacenamiento de productos biológicos está basada en que (Maltini *et al.*, 2003):

- Aw es un parámetro crítico para el crecimiento de microorganismos.
- Aw está relacionada con muchas reacciones de degradación de naturaleza química y enzimática.
- La medición de Aw no es destructiva y, por lo tanto, se puede efectuar en sistemas biológicos sin dañarlos.

Para todos los microorganismos la actividad de agua en el medio de crecimiento es un factor limitante para su desarrollo y sobrevivencia. La Aw mínima para el desarrollo de muchas bacterias es 0.9, con excepción de *Staphylococcus aureus*, el cual es extremadamente xerotolerante y puede sobrevivir a valores de Aw de 0.82, en tanto que las haloarqueas pueden sobrevivir en ambientes con Aw de 0.75-0.80 (**Tabla 2.1**). La mayoría de hongos y levaduras son inhibidos a valores de Aw entre 0.75 y 0.8, pero el hongo *Xeromyces bisporus* es una excepción y es capaz de crecer a una actividad de agua más baja (Aw 0.61) que ningún otro organismo descrito a la fecha (Grant, 2004).

Tabla 2.1. Valores mínimos inhibitorios de Aw para el crecimiento y desarrollo de microorganismos (Grant, 2004).

Aw	Procariotes	Levaduras	Mohos
0.97-0.95	<i>Clostridium spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Escherichia spp.</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Pediococcus spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i> <i>Vibrio spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i>		
0.95-0.90	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>	<i>Rhodotorula spp.</i> <i>Pichia spp.</i> <i>Candida spp.</i> <i>Trichosporon spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i> <i>Mucor spp.</i>
0.90-0.85	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Saccharomyces spp.</i> <i>Hansenula spp.</i> <i>Torulopsis spp.</i>	<i>Cladosporium spp.</i>
0.85-0.80		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Aspergillus patulum</i>
0.80-0.75	Haloarchaea		<i>Aspergillus glaucus</i> <i>Aspergillus conicus</i> <i>Aspergillus flavus</i>
<0.70		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Xeromyces bisporus</i>

2.3.1.1. Métodos de deshidratación

Entre las diferentes metodologías de deshidratación, la liofilización, el secado por aspersión o por lecho fluidizado están entre las más utilizadas para preservar alimentos, productos agrícolas y farmacéuticos, entre otros (Teixeira *et al.*, 1995; Leslie *et al.*, 1995; Knorr, 1998, Morgan, *et al.*, 2006).

La liofilización, en la cual el producto se deseca congelándolo primero y sublimando después el hielo, ha sido usada para preservar microorganismos por décadas y es el método preferido para mantener colecciones de cultivos, sin embargo, no se utiliza ampliamente para acondicionar agentes de control biológico debido al elevado costo de producción y al tiempo requerido para deshidratar el producto, lo cual impide una producción a gran escala (Morgan *et al.*, 2006). En comparación, el secado puede ser usado para producir grandes cantidades de material deshidratado a menor costo que la liofilización y en menor tiempo. Se ha estimado que el costo de eliminación por kilogramo de agua es 6 veces menor utilizando secado por aspersión que liofilización (Knorr, 1998). De los dos métodos de secado descritos anteriormente, el secado por lecho fluidizado usa un flujo ascendente de aire caliente que es forzado a través de un lecho de sólidos de forma tal que los sólidos quedan suspendidos en el aire y así son deshidratados (Morgan *et al.*, 2006); mientras que en el secado por aspersión, una suspensión es asperjada en forma fina en una cámara de desecación entrando en contacto con una corriente de aire caliente, lo que permite una desecación muy rápida (Perry y Green, 1997).

Pese a las grandes ventajas que presenta el secado, como ya se mencionó antes, existen problemas asociados con la operación para la producción de formulados diversos, que incluyen una baja viabilidad de los microorganismos por las altas temperaturas de proceso y/o a los niveles de deshidratación que alcanzan los productos, además de las diferentes condiciones que se utilizan durante su almacenamiento (Morgan *et al.*, 2006).

2.3.1.2. Humedad de monocapa

El concepto de la humedad de monocapa, ampliamente utilizado en alimentos, representa la cantidad de agua que recubre los puntos polares primarios de diversas moléculas de un producto con una capa monomolecular por interacciones físicas del tipo ión-agua o dipolo-agua (Fennema, 1996). El valor de monocapa es considerado como un indicador de sitios polares de un producto o molécula para la unión de moléculas de agua (Mihoubi y Bellagi, 2006). El concepto de monocapa es útil debido a su relación con varios aspectos del deterioramiento físico

y químico de productos deshidratados (Mihoubi y Bellagi, 2006). Este valor se ha definido como un contenido en humedad crítico arriba del cual pueden ocurrir cambios deteriorativos y, para el cual muchos productos biológicos presentan su mayor estabilidad en relación con reacciones químicas, por lo que el conocimiento de este valor es de considerable importancia para el almacenamiento de productos biológicos secos (Martínez Navarrete *et al.*, 1999).

La humedad de monocapa forma parte del agua ligada presente en un producto, la cual comprende sólo una parte diminuta adyacente a grupos hidrofílicos del total de agua presente en un sistema (Fennema, 1996). Entre las propiedades usuales del agua ligada se incluyen: la no congelabilidad a bajas temperaturas (-50°C), la no disponibilidad como disolvente, la mucho menor presión de vapor que el agua pura a la misma temperatura, el mayor calor de adsorción en el sustrato interactivo, la diferente respuesta a la radiación electromagnética infrarroja y eléctrica y el movimiento conjunto con macromoléculas en experimentos que envuelven sedimentación, viscosidad o difusión, entre otras (Martínez Navarrete *et al.*, 1999; Fennema, 1996).

El valor de humedad de monocapa es a menudo estimado utilizando valores experimentales de isotermas de sorción de un sistema de estudio. Las isotermas de sorción son gráficos que relacionan el contenido de humedad de equilibrio con la A_w de un sistema a una temperatura constante, estas isotermas son útiles para predecir la estabilidad química, física y microbiológica de un producto en función de su contenido de humedad (Jayaraj Rao *et al.*, 2006); también para procesos de deshidratación y concentración, donde la eliminación de agua está relacionada a A_w ; así como, en la determinación del contenido de humedad, en el cual microorganismos de interés crecen de una manera más rápida (Fennema, 1996).

Muchas ecuaciones han sido propuestas para modelar isotermas de sorción en sistemas biológicos, entre ellas se encuentran la ecuaciones de BET (Brunauer, Emmet y Teller, 1938), de Henderson (Henderson, 1952), de Caurie (Caurie, 1981), de Oswin (Oswin, 1946), de GAB, desarrollada por Guggenheim, Anderson y DeBoer (Van den Berg y Bruin, 1981), la cual es una modificación a la ecuación de BET que introduce una constante más (Timmermann, 2003), entre otras. Las ecuaciones anteriores se encuentran entre las más utilizadas para determinar el valor de humedad de monocapa, el cual es de mucha importancia, porque, como se mencionó antes, representa una buena estimación del contenido de humedad que un producto deshidratado puede contener en el cual todavía exhibe una máxima estabilidad durante el almacenamiento (Fennema, 1996).

Actualmente existe información abundante sobre los valores de humedad de monocapa para muchos productos alimenticios, farmacéuticos, proteínas, etc. (Timmermann *et al.*, 2001; Constantino *et al.*, 1997; Fennema, 1996), los cuales se utilizan como marco de referencia para obtener una buena estabilidad biológica durante el almacenamiento de productos deshidratados.

2.3.1.3 Daño por deshidratación

La deshidratación se reporta como el factor de mayor peso en el daño celular durante el proceso de secado (Jin *et al.*, 1996; Bayrock y Ingledew, 1997). Generalmente se acepta que el daño por deshidratación ocurre primero en la membrana, lo cual constituye la principal causa de inactivación de microorganismos debido a la remoción de moléculas de agua de las moléculas de fosfolípidos y proteínas de membrana (Lieveense y van't Riet, 1993).

Durante la deshidratación, la integridad funcional y estructural de las membranas biológicas se daña irreversiblemente, al provocar la fusión entre vesículas y redistribución de partículas intermembranales, como proteínas y lípidos, al rehidratar (Jin *et al.*, 1991). Además existe una pérdida de viabilidad inherente, la cual se ha atribuido a alteraciones en proteínas intracelulares, debido a que la deshidratación induce interacciones proteína-proteína que pueden provocar cambios irreversibles en su conformación; en tanto que, en enzimas provoca una pérdida de su actividad (Crowe *et al.*, 1996).

La desestabilización de membranas durante la deshidratación se debe principalmente a la fusión y transición de fase de los lípidos (Crowe *et al.*, 2002). La fusión de membranas puede ser observada con microscopía electrónica cuando éstas son deshidratadas sin azúcares; también es posible apreciar la prevención de este proceso cuando se deshidratan en presencia de sacarosa o trehalosa (Crowe y Crowe, 1982; Crowe *et al.*, 1998). La transición de fase de lípidos es promovida por la remoción del agua ligada por puentes de hidrógeno a las regiones hidrofílicas de los fosfolípidos de membrana, lo que incrementa las interacciones de van der Waal's entre las cadenas hidrocarbonadas adyacentes; ya que, la distancia entre ellos se reduce. Esto causa un incremento en la temperatura de transición de fase (T_m) de los lípidos de membrana y, por tanto, su transición a la fase de gel a temperatura ambiente. Después de la rehidratación, las membranas deshidratadas, que están en fase de gel, experimentan una transición a líquido cristalino. Como la membrana cambia de fase hay regiones con defectos de empacamiento, resultando en la pérdida de la integridad de la membrana (Leslie *et al.*, 1995; Billi y Potts, 2002)

Figura 2.1.

La adición de un disacárido como la trehalosa antes de secar, ocasiona que la T_m de los lípidos de membrana disminuya al reemplazar el agua entre las cabezas de los fosfolípidos, previniendo la transición de fase y su desarreglo después de la rehidratación (Chen *et al.*, 2000) (**Figura 2.1**). Así, las membranas estarán en fase de líquido cristalino a temperatura ambiente, incluso las deshidratadas, y no pasarán por la transición de fase durante la rehidratación (Crowe *et al.*, 2002).

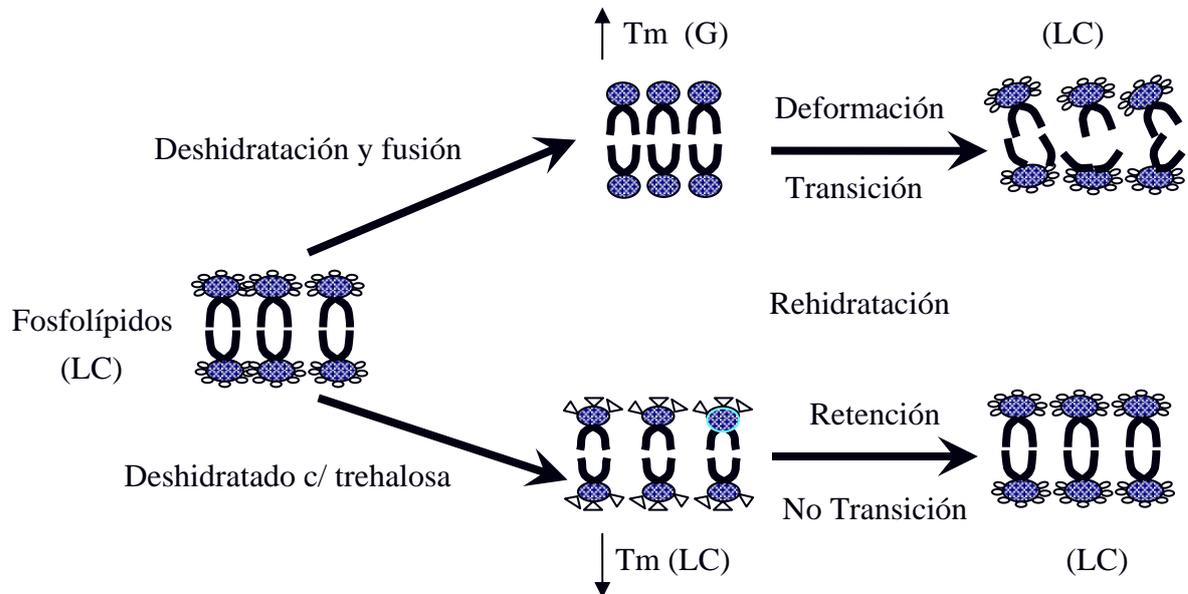


Figura 2.1. Mecanismo por el cual la trehalosa (triángulos) estabiliza capas de fosfolípidos deshidratadas propuesta por Crowe *et al.*, (1992). Agua (óvalos pequeños), T_m : temperatura de transición líquido-gel en fosfolípidos; LC: fase de líquido cristalino; G: fase de gel.

De manera general las células conservadas a A_w entre 0.4 a 0.7 tienen mayor vida de anaquel, que aquellas almacenadas a A_w más bajas o más elevadas que éstas (Potts, 1994). En este rango de A_w , las células presentan muy baja actividad metabólica y se incrementa la estabilidad de proteínas y lípidos de membrana o pared celular debido a la interacción que presentan estas moléculas con algunos compuestos como la trehalosa u otros azúcares, los cuales estabilizan las membranas (Crowe *et al.*, 1992).

Bayrock y Ingledew (1997) determinaron cuáles eran los mecanismos implicados en la reducción de la viabilidad en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) secadas por lecho fluidizado o por exposición a efecto térmico en baño maría. A temperaturas inferiores a 50°C, los valores del tiempo de reducción decimal térmico, definido como el tiempo necesario para reducir una población de microorganismos a una décima parte expuesta a una temperatura dada, fueron mayores que los tiempos de reducción decimal causados por deshidratación en lecho fluidizado a 40°C. Previamente habían demostrado que a esta temperatura (40°C) no era afectada la viabilidad en baño térmico. Lo anterior indicó que a 40°C, la muerte celular debido al efecto

térmico era menor que la debida a la deshidratación. Cuando las temperaturas fueron mayores a 50°C, el efecto térmico tuvo un mayor impacto que la deshidratación en la muerte celular.

Horaczek y Viernstein (2004) determinaron la viabilidad de esporas de *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae* durante el proceso de liofilización. Estos autores dividieron dicho proceso en sus dos componentes, congelamiento y deshidratación, estudiando los efectos de ambos sobre la viabilidad celular. Las esporas sobrevivieron al congelamiento a -80°C sin pérdida de viabilidad, pero al liofilizar las muestras se detectó un decremento significativo de viabilidad, indicando que la deshidratación por liofilización es responsable de matar el 30% de conidios de *Beauveria brongniartii* y el 91% de los conidios de *Metarhizium anisopliae*.

2.3.2 Efecto de la temperatura en la viabilidad de microorganismos

2.3.2.1 Ecuación de Arrhenius

La temperatura tiene un impacto importante sobre la viabilidad de los microorganismos siguiendo la destrucción de microorganismos, por calor a una temperatura fija, una reacción de primer orden (Jackson, 1991). Altas temperaturas y largos tiempos de exposición son extremadamente perjudiciales para las enzimas no termoestables, cambiando su configuración espacial, haciéndolas inactivas y deteniendo múltiples vías metabólicas indispensables para la célula (Hutter *et al.*, 1995). Asimismo, se presenta una desnaturalización de proteínas citosólicas y de membrana, rompiendo el equilibrio osmótico y ocasionando finalmente la muerte celular.

La velocidad de muerte celular (relacionada al estrés térmico) depende de la resistencia intrínseca del microorganismo (relacionada con su energía de inactivación), de la temperatura y del tiempo que es sometido a dicha temperatura. Para la mayoría de las reacciones químicas, incluyendo reacciones enzimáticas, de crecimiento y muerte celular, se ha encontrado que la constante de velocidad (k) depende de la temperatura (T) y se ajusta a la ecuación de Arrhenius (Ec. 2.1).

$$k = k_o e^{\frac{-Ea}{RT}} \quad (2.1)$$

Donde k_o es el factor de frecuencia o constante de Arrhenius y Ea es la energía de activación de la reacción, que se define como la energía requerida para que se lleve a cabo una reacción (Jackson, 1991; Perry y Green, 1997).

Esta expresión se ajusta bien a los resultados experimentales en un amplio rango de temperaturas y se considera como una primera aproximación adecuada para el estudio del efecto de la temperatura sobre la cinética de diversas reacciones.

A través de esta ecuación se puede calcular la energía de inactivación de un microorganismo (E_{ia}) conociendo las constantes de velocidad de muerte térmica a diferentes temperaturas y tomando el logaritmo natural de la expresión de Arrhenius (Ec. 2.2).

$$lnk = lnk_o - \frac{E_{ia}}{R} \frac{1}{T} \quad (2.2)$$

El efecto de la temperatura y el tiempo de exposición sobre la sobrevivencia de microorganismos se puede apreciar en la **Figura 2.2**, en el caso de *Bacillus stearothermophilus*, uno de los microorganismos más resistentes térmicamente con una E_{ia} de 67,480 cal mol⁻¹ (Jackson, 1991).

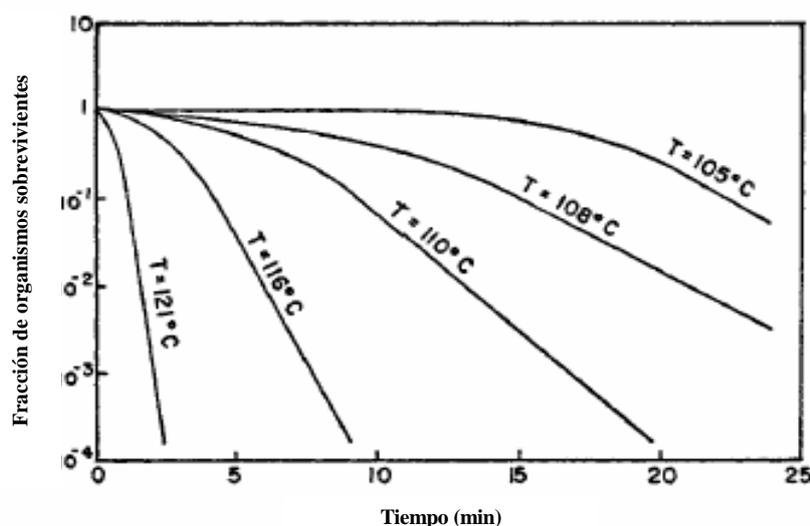


Figura 2.2. Datos de velocidad de muerte para esporas de bacterias (*Bacillus stearothermophilus*). (Perry y Green, 1997).

Experimentos realizados para evaluar el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de esporas del agente de control biológico *Epicoccum nigrum* demostraron que este hongo presenta una reducción drástica de su viabilidad a temperaturas mayores a los 40°C (Larena *et al.*, 2003).

Horaczek y Viernstein (2004) sometieron esporas de *Beauveria brongniartii* y *Metarhizium anisopliae* a pruebas de resistencia térmica en baño maría. Los resultados mostraron que esporas de ambos hongos sufrieron una reducción en su viabilidad arriba de los 50°C, siendo más sensible *B. brongniartii*.

En los casos expuestos anteriormente, las esporas, aunque sean el propágulo de mayor resistencia para los hongos, presentaron poca resistencia a temperaturas mayores de 50°C cuando fueron expuestas por periodos prolongados de tiempo. Tal es el caso de esporas de los hongos entomopatógenicos *Metarhizium anisopliae* y *M. flavoviride*, que no resistieron temperaturas mayores a 48°C a la salida en el secador por aspersión, con una temperatura de aire de entrada de 64°C, utilizando como soportes extracto de levadura o almidón soluble. Este tratamiento disminuyó su viabilidad hasta un valor del 18% (Stephan y Zimmermann, 1998).

En el caso de esporas de *Epicoccum nigrum* Larena *et al.* (2003) reportaron que las esporas secadas por aspersión redujeron su viabilidad hasta menos del 10%, utilizando una temperatura de aire de entrada de 150°C y de salida de 80°C; mientras que la viabilidad de las esporas secadas en lecho fluidizado se mantuvo en el 100%, con temperaturas de proceso máxima de 40°C.

Pedreshi *et al.* (1997) estudiaron la calidad de las esporas de *T. harzianum* producidas en medio líquido en cultivo por lote, en fase exponencial y estacionaria, observando que las esporas cosechadas en la fase estacionaria presentan más termorresistencia que las cosechadas en fase exponencial. Esta resistencia fue asociada con la presencia intracelular de trehalosa.

Muñoz *et al.* (1995) concluyeron que el medio de cultivo en el cual se desarrollan esporas de *T. harzianum* tiene un gran impacto en la resistencia de las esporas a diferentes tipos de estrés, incluyendo el térmico. Ellos encontraron que esporas producidas en medio sólido presentaron una pared celular gruesa además de pocos organelos celulares. Por el contrario, esporas producidas en medio sumergido en cultivo por lote presentaron más organelos y una delgada pared celular, siendo menos resistentes a la desecación, radiación y a otras condiciones ambientales, debido probablemente al grosor de su pared celular que es la primera estructura en contacto con el ambiente. Por lo que, dependiendo la forma en que se produzcan estas esporas, ya sea en estado sólido o líquido, se presentará una morfología, la cual permitirá una mayor resistencia a distintas condiciones ambientales, incluida la temperatura. Además, las esporas producidas en medio sólido presentaron mayor resistencia al daño por radiación UV.

La actividad de agua también juega un papel muy importante en la termorresistencia de las células. Se ha reportado que la actividad de agua del medio de producción, del medio de calentamiento (donde se lleva a cabo el tratamiento térmico) y del medio de recuperación tiene un considerable efecto en la resistencia de las esporas al tratamiento térmico, presentando varias relaciones que se comentan a continuación.

En los típicos rangos de actividades de agua que presentan los productos comestibles ($A_w > 0.8$), la resistencia al calor de los microorganismos generalmente se incrementa al decrecer las actividades de agua del medio en el que son calentados. Coroller *et al.* (2001) estudiaron el efecto de la actividad de agua (A_w) de medios de calentamiento y recuperación, sobre la resistencia térmica de las esporas de *Bacillus cereus*, ajustando las A_w del medio de calentamiento de 0.9 a 1 y dejando la A_w del medio de crecimiento igual a 1 y viceversa (Figura 2.3).

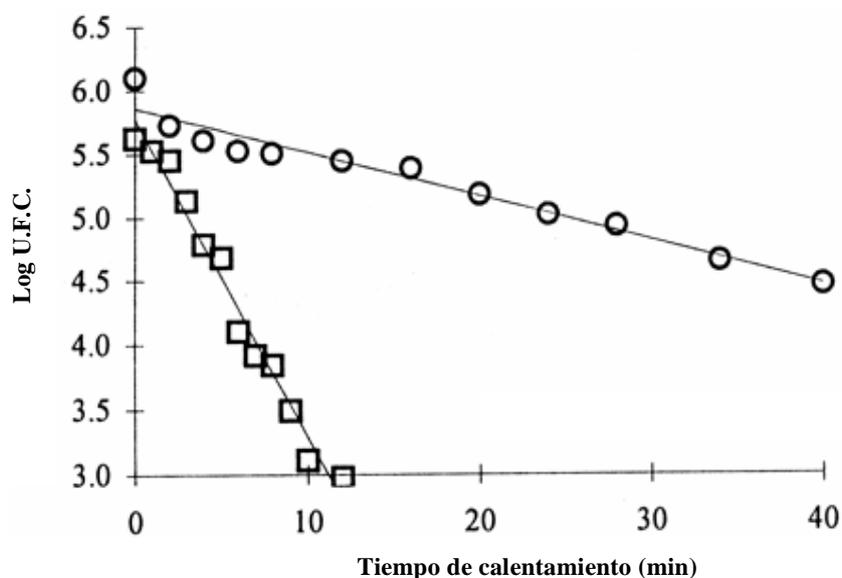


Figura 2.3. Log UFC vs tiempo para *Bacillus cereus* CNRZ 110 a 95°C en pH 7 con una A_w de 1 (□) o 0.9 (○) ajustada con sacarosa (Coroller *et al.*, 2001).

Estos autores mostraron que las esporas de *B. cereus* son más termorresistentes cuando el medio de calentamiento tiene una A_w menor a 1 (Figura 2.3) y el medio de recuperación (crecimiento) tiene una A_w cercana a 1. Este trabajo sugirió que es probable mejorar la termorresistencia de un microorganismo al variar la A_w del medio de calentamiento, como en este caso.

Con base en lo anterior, diversos estudios demuestran que la termoestabilidad de las células depende de varios factores, como son la resistencia intrínseca del microorganismo, la actividad de agua del medio de cultivo en la que son producidas, las condiciones de estrés a las que son sometidas durante el cultivo e incluso, como se verá más adelante, a la concentración intracelular de trehalosa, como carbohidrato de reserva y que se ha relacionado con la termorresistencia (Pedreshi *et al.*, 1997; Coroller *et al.*, 2001; Blaszyk *et al.*, 1998).

2.3.3 Efecto de la oxidación

2.3.3.1 Especies reactivas de oxígeno

El oxígeno es una molécula importante para llevar a cabo diversos procesos biológicos, actúa principalmente durante el proceso de respiración celular aceptando 4 electrones y reduciéndose hasta formar agua, sin embargo, durante este proceso también se producen especies químicas por la reducción incompleta del oxígeno (O_2) que son potentes oxidantes. Estas moléculas de oxígeno altamente reactivas son el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el óxido nítrico (NO), entre otros, que en conjunto son llamados especies reactivas de oxígeno (ERO). En células eucariotas con respiración activa, la principal fuente de producción de ERO es la cadena transportadora de electrones en mitocondria por el complejo citocromo c oxidasa. En la mitocondria hay dos sitios principales involucrados en la generación de O_2^- , la NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) y ubiquinol:citocromo oxidoreductasa (complejo III). El complejo I, en hongos, está fuertemente implicado en la generación de éste radical dentro de la célula (Kohen y Nyska, 2002), las ERO, como peróxido de hidrógeno y superóxido, pueden ser formadas en el citosol por citocromos P450 y dioxigenasas, o también durante el metabolismo fermentativo glucolítico (Moraitis y Curran, 2004).

El ión superóxido aunque es un radical libre, no es una especie particularmente perjudicial debido a que su reactividad es más selectiva comparada con OH^\cdot . Su importancia principal es probablemente como una fuente de H_2O_2 y OH^\cdot . Bajo condiciones ácidas, el O_2^- puede ser protonado para formar el radical hidroperoxilo (HOO^\cdot), que es aún más reactivo (Zhonghu *et al.*, 2003).

El radical hidroxilo es una especie extremadamente reactiva, ataca cualquier biomolécula localizada a menos de unos pocos nanómetros de su sitio de generación. Por lo tanto, es primariamente responsable por los efectos citotóxicos del O_2 en microorganismos aerobios. Generalmente se acepta que en sistemas biológicos el OH^\cdot es generado en la reacción directa de H_2O_2 y O_2^- . En la presencia de cantidades traza de hierro, en su forma Fe^{2+} , la reacción de superóxido y H_2O_2 forma niveles significativos de OH^\cdot e inicia la oxidación de moléculas orgánicas (Hansberg, 2002).

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante, pero no un radical. Este agente oxidante puro tiene una reactividad limitada, su principal importancia reside en ser una fuente de radicales

hidroxilo en presencia de iones de metales de transición, por medio de la siguiente reacción (reacción de Fenton).



Así, dentro de la célula existen una amplia variedad de especies reactivas de oxígeno, que se forman continuamente en la cadena respiratoria principalmente, difundiendo o transformándose en otras por reducciones subsecuentes y atacando moléculas biológicas como lípidos de membrana, a una velocidad mucho mayor que el ataque a otras moléculas como proteínas o DNA (Hansberg, 2002).

2.3.3.2 Daño por especies reactivas de oxígeno a macromoléculas biológicas

Casi todas las clases de biomoléculas incluyendo DNA, proteínas y lípidos, pueden ser atacadas por radicales libres, pero los lípidos son probablemente los más susceptibles. La membrana celular es rica en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son fácilmente atacados por radicales de oxígeno (Kohen y Nyska, 2002; Zhonghu *et al.*, 2003). El proceso de oxidación de lípidos (**Figura 2.4**), denominado peroxidación de lípidos, es iniciado por el ataque de algunas de las especies reactivas, las cuales sustraen un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-) generando un radical de carbono (**1**), el cual podría, por una reacción de entrecruzamiento, combinarse con otro radical de carbono en la membrana (**2**). Sin embargo, la reacción más probable bajo condiciones aerobias es que el radical de carbono reaccione con una molécula de O₂ para formar el nuevo radical peroxilo (ROO[•]) (**3**), que es capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otra molécula de lípido, comenzando así un ciclo de reacciones en cadena (**4**) (**Figura 2.4**).

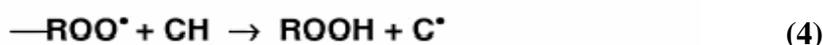
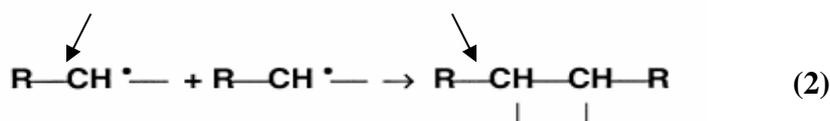


Figura 2.4. Mecanismo de peroxidación de lípidos (Zhonghu *et al.*, 2003).

El mecanismo de la oxidación ocurre principalmente posterior al secado y determina la vida de anaquel del material biológico que se ha secado. Becker y Rapoport (1987) sugirieron la adición

de antioxidantes y algunos otros aditivos a células de *S. cerevisiae* antes de ser secadas para incrementar la estabilidad de las células deshidratadas durante el almacenamiento, especialmente a temperatura ambiente.

Dado que los lípidos de membrana juegan un importante papel en la permeabilidad de la membrana celular y son las moléculas atacadas a mayor velocidad, parecería probable que el daño en la membrana en células deshidratadas sea reflejado en, o causado por, cambios en el perfil de lípidos. Slater (1984) reportó que, en células eucariotas, una extensa peroxidación de ácidos grasos condujo a cambios en la proporción de éstos en la membrana, afectando la fluidez de la misma haciéndola más rígida e impidiendo el movimiento libre de moléculas.

Experimentos llevados a cabo para determinar los cambios del perfil de lípidos durante el almacenamiento de *Lactobacillus bulgaricus*, mostraron que la relación de ácidos grasos insaturados/saturados decreció durante el almacenamiento, lo que se correlacionó directamente con las UFC. Este cambio fue significativo después de 49 días de almacenamiento a 20°C y a A_w de 0.11 (Figura 2.5) (Texeira *et al.*, 1996).

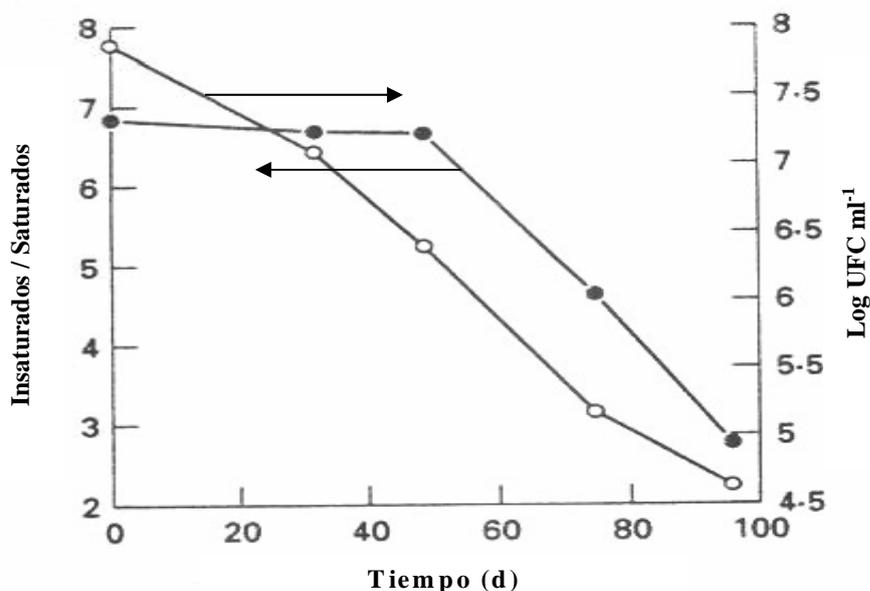


Figura 2.5. Supervivencia y relación lípidos insaturados/saturados durante el almacenamiento de *Lactobacillus bulgaricus* (Texeira *et al.*, 1996).

El agua puede actuar como antioxidante a baja A_w por hidratación de trazas de iones metálicos, unión por enlaces de hidrógeno a hidroperóxidos y promoviendo recombinaciones de radicales libres. También puede actuar como pro-oxidante a altos valores de A_w debido a que promueve la movilidad de moléculas que pueden promover la oxidación dentro de la célula, la disolución de precipitados catalíticos y al aumento de nuevas superficies catalíticas (Maltini *et al.*, 2003).

Se sugiere que la oxidación de macromoléculas además de ser una función del tiempo, depende del nivel de deshidratación o la disponibilidad del agua en las células o material almacenado. Como es reportado por Champagne *et al.* (1991) la remoción de agua a altos niveles en las estructuras celulares puede exponer superficies, o espacios entre éstas, al oxígeno causando degradación oxidativa de proteínas y compuestos celulares.

Crowe *et al.* (1992), al deshidratar vesículas transportadoras de calcio en presencia de trehalosa y almacenadas por varios periodos de tiempo antes que fueran rehidratadas, observaron que la habilidad de acumular calcio de las vesículas decreció rápidamente a niveles despreciables al cabo de un mes de almacenamiento. Lo anterior coincidió con la oxidación de lípidos. En contraste, cuando las mismas membranas fueron almacenadas en condiciones de vacío durante 100 días, sólo se detectó un ligero cambio en la actividad biológica de las vesículas, lo que muestra la reactividad del oxígeno en sistemas biológicos y su impacto en la función de éstos.

2.3.3.3 Productos de la oxidación de lípidos y daños causados

En sistemas biológicos los aldehídos son siempre producidos cuando los hidroperóxidos de lípidos se rompen, por lo que es de interés identificar y medir estos compuestos como un índice del grado de oxidación de lípidos (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Al contrario de las especies reactivas de oxígeno, los aldehídos son de una vida media más larga y pueden por lo tanto difundir de su sitio de origen y reaccionar y atacar sitios o blancos intracelulares, actuando como “segundos mensajeros tóxicos” de la compleja cadena de reacciones que son iniciadas, si los ácidos grasos poli-insaturados de la bicapa membranal son convertidos a hidroperóxidos de lípidos. Entre los muchos diferentes aldehídos que se pueden formar durante la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados por sus efectos dañinos dentro de las células y tejidos, son malondialdehído y los 4-hidroxiálquenos, en particular 4-hidroxi-nonenal y 4-hidroxi-hexenal (Esterbauer *et al.*, 1991).

El malondialdehído (MDA) es un aldehído altamente reactivo, generalmente formado como una consecuencia de la peroxidación de lípidos. Es en muchos casos el aldehído más abundante resultante de la peroxidación de lípidos (Shimizu *et al.*, 2006) y por lo tanto, su concentración se determina en uno de los ensayos más comunes en estudios de peroxidación de lípidos, aunque se ha reportado que el MDA puede también ser generado por ataque de radicales libres a desoxiribosa y aminoácidos. Por lo que los niveles de MDA pueden ser indicativos de un daño oxidativo total en la célula, no precisamente de la peroxidación de lípidos, aunque ésta puede ser la fuente predominante (Turton *et al.*, 1997).

En muestras frescas o peroxidadas, el MDA resulta principalmente de la degradación oxidativa de los ácidos grasos insaturados con más de dos grupos metileno interrumpidos por dobles cadenas (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Cuando las especies reactivas de oxígeno atacan los lípidos de membrana, MDA es formado en las membranas y difunde en forma libre dentro de los espacios extracelulares (Shimizu *et al.*, 2006).

Los principales precursores de MDA son hidroperóxidos de lípidos poli-insaturados, particularmente aquéllos de los ácidos linolénico y araquidónico (Turton *et al.*, 1997). Es generalmente aceptado que los ácidos oléico y linoléico son débiles precursores de MDA (Esterbauer *et al.*, 1991). Se han propuesto algunos mecanismos para la formación de MDA, entre los más aceptados se encuentra el que envuelve la formación de bicicloendoperóxidos como intermediarios, los cuales subsecuentemente se rompen a MDA por reacciones térmicas o catalizadas por ácido (Esterbauer *et al.*, 1991).

En solución acuosa el MDA puede existir en varias formas dependiendo del pH. En condiciones neutras y alcalinas la forma predominante es el anión enolato, mientras que a pH ácido (pH<4.5) el MDA puede existir como β -hidroxiacroleína y en equilibrio con la forma dicarbonilo, siendo la β -hidroxiacroleína la forma más reactiva del MDA con otras moléculas.

El MDA puede producir varios efectos citotóxicos e inhibir una cierta variedad de enzimas. En particular, se ha mostrado que causa daño a membranas, incrementando la fluidez, reacciona con dGMP y daña al DNA (Turton *et al.*, 1997). *In vitro*, el MDA puede alterar proteínas, DNA, RNA y muchas otras biomoléculas (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Las proteínas, en comparación con aminoácidos libres, son modificadas más rápidamente por el MDA bajo condiciones fisiológicas (Chio y Tappel, 1969). Se sugiere que los residuos de aminoácidos en una proteína proveen un ambiente más favorable para reacciones con el MDA que otras moléculas, y las modificaciones que las proteínas puedan sufrir podrían deberse a algunos productos de condensación. El análisis de los aminoácidos de proteínas modificadas por el MDA indica que además de lisina, los residuos de histidina, tirosina, arginina y metionina se pueden también alterar en cierto grado (Nair *et al.*, 1981).

Las reacciones del MDA con nucleósidos también se presentan en sistemas biológicos y se ha puesto atención en estas reacciones por su mutagenicidad en bacterias y células animales. Desoxi-guanosina es la base más reactiva que reacciona con el MDA; adenosina y citosina también reaccionan con el MDA aunque en menor grado, en tanto que con timidina no se ha observado ninguna reacción. La reacción de MDA con nucleósidos es fuertemente acelerada a menor pH (Nair *et al.*, 1984). También ha sido propuesto que el MDA puede modificar la doble

cadena de DNA por la formación de entrecruzamientos entre grupos NH₂ de guanosina y grupos NH₂ de su citosina complementaria, aunque no existe una clara evidencia (Esterbauer *et al.*, 1991).

2.4 Supervivencia en condiciones de desecación

Algunos seres vivos tienen una notable habilidad de sobrevivir a la desecación, un fenómeno conocido como anhidrobiosis o “vida sin agua”. Esta requiere una serie de eventos coordinados durante la deshidratación, que se asocian con la prevención de daño oxidativo y mantenimiento de la estructura nativa de macromoléculas y membranas, que depende de muchos factores como la síntesis de moléculas protectoras, tipo de organismo, condiciones ambientales, etc. (Hoekstra *et al.*, 2001). En estas condiciones de bajo contenido de humedad, los microorganismos reducen considerablemente la velocidad de sus procesos metabólicos (Crowe *et al.*, 1992).

Cuando la célula es deshidratada se incrementan las interacciones moleculares que pueden causar desnaturalización de proteínas y fusión de membranas, pero un amplio rango de compuestos han sido identificados que pueden prevenir tales interacciones. Entre los que se producen o acumulan se encuentran compuestos orgánicos de bajo peso molecular que tienen potencial osmótico. Estos osmolitos (polioles, azúcares o derivados de éstos como la trehalosa, sacarosa, sulfotrehalosa y glucosilglicerol, betainas, aminoácidos, glutamato, glicina-betaina, carnitina, manitol, sorbitol, entre otros) también pueden proteger contra inactivación, inhibición y desnaturalización de enzimas y macromoléculas bajo condiciones de baja actividad de agua (Grant, 2004; Hoekstra *et al.*, 2001).

2.4.1 Efecto protector de algunos azúcares

La acumulación de algunos azúcares, como la trehalosa en el caso de hongos y muchas especies animales, y sacarosa y otros carbohidratos en el caso de plantas, se correlaciona bien con un alto nivel de supervivencia bajo condiciones de desecación (Aguilera y Karel, 1997; Pedreschi y Aguilera, 1997; Crowe *et al.*, 1992).

La síntesis de azúcares como trehalosa y sacarosa, entre otros, se puede inducir por diferentes estímulos como son el choque térmico, el estrés osmótico y la fase de crecimiento de las células. Estos azúcares son capaces de preservar membranas, proteínas lábiles e incluso células completas en ausencia de agua (Pedreschi *et al.*, 1997; García de Castro *et al.*, 2000).

La trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido), el único disacárido no reductor de la glucosa, es uno de los carbohidratos sintetizados por nemátodos, levaduras, hongos y bacterias y, el más efectivo en la conservación de membranas deshidratadas (Aguilera y Karel, 1997). También ha sido reportado que este azúcar ayuda a la adquisición de resistencia a una variedad de condiciones estresantes, incluyendo estrés oxidativo y térmico (Fillinger *et al.*, 2001). La trehalosa recientemente ha sido punto de atención, como crioprotector y estabilizador durante la deshidratación o anhidrobiosis (Crowe, 2002).

La biosíntesis de trehalosa es catalizada por dos enzimas en *S. cerevisiae*, la trehalosa 6 fosfato (Tre6P) sintasa y la Tre6P fosfatasa, un complejo multi-proteico codificado por cuatro genes. La Tre6P es sintetizada a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato (Fillinger *et al.*, 2001). También dos genes codificando Tre6P sintasa han sido identificados en *Aspergillus niger* (Fillinger *et al.*, 2001). Se ha reportado que la trehalosa puede ser tomada del medio de cultivo e introducida a la célula por medio de sistemas de transporte de alta y baja afinidad, por ejemplo, un transportador α -glucósido codificado por el gen AGT1 capaz de transportar diversos disacáridos incluyendo la trehalosa (Plourde-Owobi *et al.*, 2000). La degradación de la trehalosa acumulada en respuesta a varios estímulos es mediada por un trehalasa codificada por NTH1 (Fillinger *et al.*, 2001).

Se ha reportado que en algunos eucariotes inferiores, la trehalosa constituye más del 15% en peso seco de las células en fase estacionaria o esporas (Aguilera y Karel, 1997). Cerrutti *et al.* (2000) deshidrataron células de *S. cerevisiae* con distintas concentraciones intracelulares de trehalosa (5, 10 y 20%) por secado a vacío a 40°C y por liofilización. En ambos sistemas se detectó una elevada pérdida de viabilidad cuando las células contenían 5% de trehalosa, en comparación con las células con 10% ó 20% de trehalosa.

Existen mecanismos propuestos de protección por la trehalosa en sistemas celulares. El primero es la hipótesis de reemplazo de agua. Los azúcares reemplazan parte del agua después de la deshidratación y previenen la agregación de proteínas por enlaces de hidrógeno con grupos polares de otras proteínas, manteniendo la integridad estructural de las membranas (Leslie *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2000). Por ejemplo, Sun *et al.* (1998) preservaron la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), después de liofilizarla, al hacer una solución de carbohidratos formada de glucosa/sacarosa y enzima. La retención de actividad enzimática de la G6PDH fue del 90% después de la liofilización con carbohidratos, y sin ellos la G6PDH retuvo menos del 40% de su actividad inicial. Carpenter *et al.* (1987) observaron que enlaces de hidrógeno entre proteínas deshidratadas y moléculas de carbohidratos contribuyeron a la estabilización de proteínas lábiles durante el secado por aspersión y liofilización, proponiendo que la presencia de

carbohidratos durante el secado podría mantener a las proteínas deshidratadas en sus conformaciones originales.

Una segunda hipótesis está relacionada con la habilidad que tiene la trehalosa de formar un estado vítreo durante el secado donde los componentes sensibles son embebidos y protegidos del daño térmico y oxidativo (Aguilera y Karel, 1997; Lodato *et al.*, 1999; Oliver *et al.*, 2002).

Por otro lado, Leslie *et al.* (1995), secando *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis*, mostraron un incremento de 30°C a 40°C en la temperatura de transición de fase (T_m) de los fosfolípidos cuando fueron secadas sin azúcares, mientras que las T_m 's de las mismas muestras secadas con azúcares se mantuvieron cercanas a aquéllas de las muestras no deshidratadas. Ellos atribuyeron el incremento en la sobrevivencia a la capacidad de los azúcares a disminuir la T_m de la membrana y proteger la estructura de las proteínas por los enlaces de hidrógeno formados con estas moléculas en anhidrobiosis.

Esporas de *T. harzianum* producidas en medio líquido y cosechadas en la fase estacionaria de esporulación presentaron una concentración 20 veces mayor de trehalosa con respecto a esporas cosechadas en la fase exponencial, presentando las primeras mayor viabilidad después de ser secadas (Pedreschi *et al.*, 1997). De esta manera la concentración intracelular de ciertos azúcares como la trehalosa principalmente, aumenta la resistencia a diferentes tipos de estrés que experimentan las células cuando son secadas, elevando la viabilidad y su vida de anaquel.

2.4.2 El estado vítreo

Se ha propuesto que la formación de sólidos amorfos (que conduce a un estado vítreo) en la célula está asociada con la sobrevivencia de organismos anhidrobióticos en estado de deshidratación. Un sólido vítreo o amorfo es un líquido superenfriado, termodinámicamente inestable con una viscosidad tan alta como 10^{12-14} Pa s (Buitink y Leprince, 2004).

Dentro de las células existen muchas moléculas capaces de formar sólidos amorfos como son la mayoría de los azúcares, aunque no son las únicas moléculas capaces de formar estos sólidos, sino también proteínas, iones y sales (Sun *et al.*, 1998). En sistemas modelo se ha observado que las proteínas tienen un considerable efecto sobre las propiedades moleculares de los sólidos amorfos formados por carbohidratos, aumentando la T_g (temperatura de transición vítrea) del sistema (Crowe *et al.*, 1996). Durante la deshidratación, los carbohidratos y los demás componentes mencionados ayudan a los microorganismos a pasar de un estado de líquido cristalino a un estado vítreo (Sun y Leopold, 1997). Buitink y Leprince (2004) proponen que la

formación de sólidos amorfos no es un mecanismo que inicialmente confiera tolerancia durante el secado, pero la formación de estos sólidos intracelulares es indispensable para sobrevivir en anhidrobiosis.

El estado vítreo se alcanza debido a la remoción de agua la cual induce una gran saturación de los componentes del citosol conduciendo a un incremento en las fuerzas cohesivas entre las moléculas y restricción de la movilidad molecular dentro del citoplasma (Sun y Leopold., 1997; Buitink y Leprince, 2004). La velocidad de las reacciones de deterioro se correlaciona inversamente con la viscosidad del citoplasma (Sun., 1997). En este estado, se minimizan cambios en la organización molecular y estructural de la célula durante la deshidratación, permitiendo la preservación de estructuras biológicas, y previniendo la cristalización del citoplasma; así como, repentinos cambios de pH que pueden amenazar la sobrevivencia de la célula (Sun *et al.*, 1998; Burke, 1986). Cuando el citoplasma de la célula no se encuentra en el estado vítreo, pueden aumentar la oxidación por radicales libres, separación de fases y cristalización del citoplasma y amenazar la sobrevivencia de los microorganismos (Sun, 1997).

La temperatura a la cual un compuesto se transforma de un sólido vítreo o amorfo a líquido cristalino se denomina temperatura de transición vítrea (T_g), y ha sido la manera más utilizada para caracterizar los sólidos amorfos (Sun *et al.*, 1998). En general, T_g incrementa con el peso molecular y decrece con el contenido de agua, lo que se representa en diagramas de fase (Figura 2.6), en este caso para trehalosa y sacarosa. Debajo de T_g el sistema estará en el estado vítreo, mientras que al incrementar la temperatura decrecerá su viscosidad cambiando al estado de líquido cristalino.

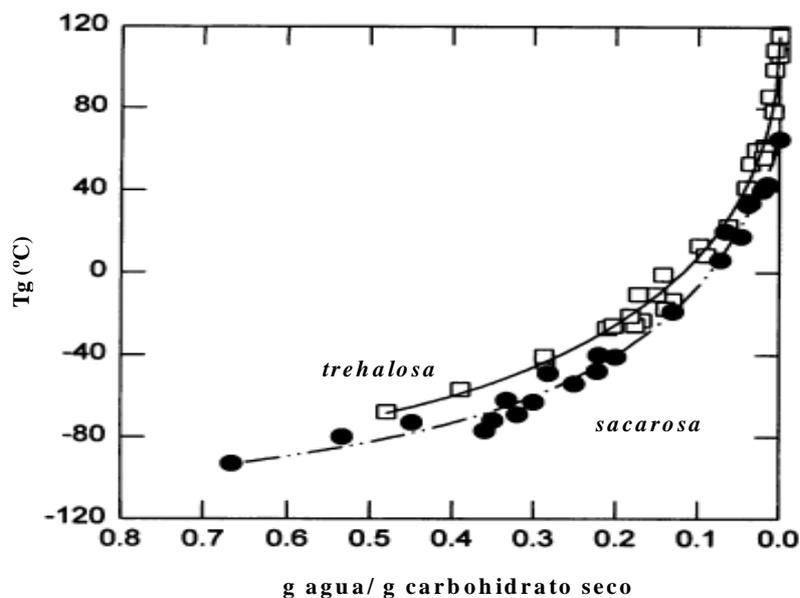


Figura 2.6. Diagrama de fase que presenta las temperaturas de transición vítrea en función del contenido de agua para trehalosa y sacarosa (Crowe *et al.*, 1996).

La trehalosa es uno de los carbohidratos que mejor protege a la célula en condiciones de desecación, pues forma sólidos amorfos a bajas temperaturas en lugar de cristalizar. En el diagrama de fase de la trehalosa, la Tg de la trehalosa pura o deshidratada según varios autores se encuentra en aproximadamente 110°C a comparación, por ejemplo, de la Tg de la sacarosa de aproximadamente 70°C. Esto es una ventaja, dado que las muestras para conservarlas, no siempre se deshidratan completamente, por lo que a cualquier contenido de humedad, se logrará estar en el estado vítreo a una temperatura mayor con trehalosa que con sacarosa u otros carbohidratos (Chen *et al.* 2000; Crowe, 2002).

La presencia del estado vítreo es necesaria durante el almacenamiento bajo condiciones de desecación, debido a que el almacenamiento por encima de la Tg de un sistema conduce a la fusión y ruptura de membrana y a la pérdida de viabilidad celular (Sun y Leopold, 1997; Buitink *et al.*, 1998). Dependiendo de las condiciones de almacenamiento, los microorganismos pueden sobrevivir en anhidrobiosis, variando la humedad relativa y temperatura de almacenamiento para poder alcanzar el estado vítreo.

Se ha observado, en el caso de semillas y polen que el deterioro es acelerado cuando no se encuentran en estado vítreo. Sun (1997) observó que la temperatura crítica de almacenamiento de semillas de maíz, chícharo y soya fue menor o igual a la Tg de las mismas en un rango de temperatura de -60 a 70°C, lo que indicó que durante el almacenamiento la estabilidad prolongada se asocia con la presencia del estado vítreo en semillas. Sun *et al.* (1998) también demostraron una posible asociación entre la sobrevivencia de semillas de *Vignata radiata* y la estabilidad de proteínas *in situ* en estado vítreo, observando que ambos, la estabilidad de las proteínas y la sobrevivencia de las semillas durante el almacenamiento, fueron Tg dependientes; es decir, a temperaturas de almacenamiento $T > T_g$, la estabilidad de proteínas y semillas decreció.

IV. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la contribución del estrés térmico, la deshidratación y la oxidación de lípidos, sobre la viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum* durante el proceso de secado y su almacenamiento.

Objetivos particulares

- Realizar las cinéticas de muerte térmica y estimar la energía de inactivación (E_{ia}) de muerte de las esporas de *Trichoderma harzianum*, por medio de la ecuación de Arrhenius.
- Estudiar, mediante el uso de sistema cerrados a A_w controlada, el efecto de la deshidratación en la viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum*.
- Estudiar el efecto de la A_w y temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad y vida de anaquel de esporas con diferente grado de deshidratación (A_w de deshidratación).
- Estudiar el efecto de la oxidación de lípidos celulares sobre la viabilidad de esporas almacenadas a diferentes A_w y temperaturas.

III. Justificación

Se ha demostrado el efecto antagonista del hongo *Trichoderma harzianum* contra diversos hongos fitopatógenos y la gran necesidad existente de alternativas para el control de plagas y enfermedades agrícolas de forma natural y no tóxica para el ambiente y los seres humanos. Además, dentro de nuestro grupo se han desarrollado procesos para una gran producción de conidios de *T. harzianum* con alta viabilidad después de la fermentación y recuperación, por lo que es de interés desarrollar tecnologías para la formulación y preservación de este agente de control biológico.

El secado de agentes de control biológico muestra varias ventajas sobre otras técnicas de conservación. Sin embargo, en el proceso de secado se presentan diversos daños a nivel celular debido a efectos térmicos, de deshidratación y de oxidación de macromoléculas al almacenar el producto. Estos factores han impedido que este agente de control biológico tenga una elevada viabilidad y vida de anaquel en los productos formulados hasta ahora con aplicaciones en campos de cultivo. Por tal motivo es conveniente el estudio de los factores que influyen durante el proceso de secado y el almacenamiento en la viabilidad de las esporas. Esto permitirá proponer estrategias que permitan una mayor estabilidad del producto que se vea reflejado en una mayor viabilidad y vida de anaquel de los propágulos (esporas) capaces de desarrollarse y competir con los microorganismos fitopatógenos.

IV. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la contribución del estrés térmico, la deshidratación y la oxidación de lípidos, sobre la viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum* durante el proceso de secado y su almacenamiento.

Objetivos particulares

- Realizar las cinéticas de muerte térmica y estimar la energía de inactivación (E_{ia}) de muerte de las esporas de *Trichoderma harzianum*, por medio de la ecuación de Arrhenius.
- Estudiar, mediante el uso de sistema cerrados a A_w controlada, el efecto de la deshidratación en la viabilidad de esporas de *Trichoderma harzianum*.
- Estudiar el efecto de la A_w y temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad y vida de anaquel de esporas con diferente grado de deshidratación (A_w de deshidratación).
- Estudiar el efecto de la oxidación de lípidos celulares sobre la viabilidad de esporas almacenadas a diferentes A_w y temperaturas.

V. Materiales y Métodos

5.1 Producción de esporas

5.1.1 Microorganismo

Se utilizó una cepa de *Trichoderma harzianum* variedad Rifai, empleada en estudios de control biológico. La cepa fue obtenida del *International Mycological Institute* (IMI 206040) y fue preservada en tubos inclinados en medio de agar papa y dextrosa (PDA) y resembrada cada mes. La cepa se sembró en placas de agar PDA con la cepa preservada en tubo y fue incubada durante 6 días a 29°C. Una vez al día por 15 minutos las cajas de Petri inoculadas fueron expuestas a la luz para inducir la esporulación.

5.1.2 Recuperación y conteo de esporas para inocular el medio de cultivo

Transcurrido el tiempo de incubación, las esporas se recuperaron bajo condiciones de esterilidad adicionando 8 mL de solución salina (Tween 40 al 0.05 % y NaCl 9 g L⁻¹) a las cajas de Petri sembradas, realizando un lavado y raspado sobre la superficie con un asa bacteriológica para ayudar a suspender las esporas. La suspensión se recolectó en un matraz Erlenmeyer de 100 mL y se ajustó a una concentración final de esporas de 1 x 10⁵ esporas mL⁻¹ que sirvió para inocular el medio de cultivo donde se producen las esporas.

5.1.3 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo para la producción de esporas se muestra en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Composición del medio de cultivo para la producción de conidios de *T. harzianum*

Compuesto	Fórmula	Concentración (g L ⁻¹)
Glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	30
Sulfato de amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.6
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	7
Fosfato de sodio dibásico	Na ₂ HPO ₄	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5
Extracto de levadura		0.5
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0671
Cloruro férrico hexahidratado	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.008
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0001

5.1.4 Cultivo en fermentador para la producción de esporas

Los cultivos se llevaron a cabo en un fermentador Microferm New Brunswick Scientific Co. Inc., modelo MF-114 de 14 litros de capacidad, con un volumen de trabajo de 10 litros a 29°C y pH de 5.6 como es descrito previamente (Gamboa, 2004). Se utilizaron 3 impulsores Rushton de relación diámetro de impulsor / diámetro de tanque (D/T) de 0.5 con una velocidad de agitación de 400 rpm y una aireación de 0.5 vvm, la tensión de oxígeno disuelto (TOD) fue monitoreada con un electrodo polarográfico de oxígeno esterilizable (Ingold, modelo A420) conectado a un amplificador de TOD y, previamente, calibrado a 100% de oxígeno disuelto.

El pH del medio de cultivo fue monitoreado mediante un electrodo esterilizable (Ingold, modelo 2300) conectado a un transmisor-controlador de pH. El pH se controló a un valor de 5.6 por medio de la adición automática de NaOH 2N estéril mediante una bomba peristáltica (Cole-Palmer, modelo 7014-20).

La espuma fue controlada por la adición de antiespumante estéril (Clerol AF, Dow Corning, 30 % P/V), mediante un sensor de nivel por conductividad conectado a una bomba peristáltica. Finalmente el cultivo tuvo un tiempo de duración de 120 horas.

5.1.5 Recuperación de esporas

Después del tiempo de cultivo, las esporas se separan del micelio mediante tamizado en malla. Posteriormente, la suspensión de esporas es centrifugada en una centrífuga Mini Sharples tipo CL-T-1 a 15,000 g para la obtención de una pasta húmeda, que sirve de material biológico, la

cual se resuspende en buffer de fosfatos pH 5.6 hasta una concentración de 7.5×10^9 esp mL⁻¹, en la cual hay aproximadamente 0.1 gramos en peso seco de esporas por mililitro de suspensión.

5.2 Estudio de la muerte térmica de las esporas

Se llevó a cabo una dilución 1:10 de la suspensión original de esporas obtenida después del tamizado con buffer de fosfatos para dar una concentración de 10^8 esporas mL⁻¹. Estas muestras fueron sometidas a 5 diferentes temperaturas (50, 60, 70, 80 y 90°C) en baño térmico a 5 diferentes tiempos, para obtener las constantes de velocidad de muerte térmica, suspendidas en buffer de fosfatos pH 5.6. Posterior a eso se realizaron diluciones seriadas en el mismo buffer y 100 µL de estas diluciones se sembraron en cajas de Petri con medio PDA por triplicado.

Los cultivos se incubaron a 29°C durante 48 horas y la cuantificación de las esporas sobrevivientes al tratamiento térmico (N) se estimó mediante el conteo de UFC en relación a las UFC de una muestra no sometida a tratamiento térmico (No). La energía de inactivación (E_{ia}) y la constante de Arrhenius se estimaron ajustando los datos generados a diferentes temperaturas y tiempos de exposición a la ecuación de Arrhenius. También se efectuó este estudio con las células suspendidas en buffer de fosfatos pH 7.0 para observar si existía algún efecto del pH en la resistencia de las esporas.

5.3 Estudio del efecto de la deshidratación sobre la viabilidad de las esporas

5.3.1 Efecto de la deshidratación en sistemas cerrados

Se utilizaron las siguientes soluciones sobresaturadas para la obtención de sistemas cerrados con diferente actividad de agua reportados a 25°C (Svensson *et al.*, 1994):

LiCl $A_w = 0.113$

MgCl₂ $A_w = 0.328$

Mg(NO₃)₂ $A_w = 0.529$

NaCl $A_w = 0.753$

K₂SO₄ $A_w = 0.973$

Como la deshidratación y un estudio de almacenamiento se llevarían a cabo a 4°C, se midió la A_w de estas mismas sales para observar si no existía variabilidad en la A_w debido a la temperatura (**Apéndice 1**).

Para llevar a cabo este estudio, un mililitro de una suspensión de esporas ($0.1 \text{ g de esporas mL}^{-1}$) en buffer de fosfatos pH 5.6, es colocada en tubos Eppendorf (1 mL) y es centrifugada para obtener una pasta en cada tubo con el propósito de que la deshidratación sea más rápida.

Los tubos son colocados dentro de frascos herméticamente cerrados conteniendo las soluciones sobresaturadas de las sales, sin estar en contacto con las sales, dejando que se alcance el equilibrio a 4°C para limitar el daño por temperatura. Después de alcanzar el equilibrio (15 días), las muestras fueron recuperadas, y resuspendidas con una solución de glucosa al 10% y tween 40 al 0.05% hasta el aforo de 1 mL, posterior a eso se hicieron diluciones y se sembraron las muestras en cajas con agar PDA cuantificando las UFC desarrolladas comparando con las UFC de una muestra control que no fue deshidratada.

El control fue una muestra en pasta mantenida a una A_w de 0.99, además de esto, una muestra extra fue mantenida sin centrifugar (en suspensión) a 4°C con una A_w de 0.99. Posteriormente, el control y la muestra mantenida en suspensión fueron eliminados debido a que estas muestras presentaron contaminación y lisis celular respectivamente, por lo que no se pudo contar con una muestra control.

5.3.2 Efecto de la velocidad de deshidratación a vacío

Para observar si existía algún efecto no sólo de la deshidratación sino de la velocidad a la que ésta sucedía, se procedió a deshidratar las muestras a valores muy parecidos de A_w que se obtuvieron al deshidratar las muestras con las soluciones de las sales (0.113 a 0.753).

La deshidratación se llevó a cabo en una centrífuga Eppendorf Vacufuge Concentrator modelo 5301 a 4°C con una presión de vacío de 9 mbar hasta que las muestras llegaron a la A_w requerida. Posteriormente las muestras fueron resuspendidas con solución glucosada (10%) y tween 40 y sembradas en medio PDA, cuantificando las UFC como fue descrito anteriormente, determinando si existía diferencia en la viabilidad con respecto a una muestra no deshidratada.

5.4. Secado por aspersión de esporas de *T. harzianum*

Utilizando un secador por aspersión Bowen Engineering BE-1448 se secaron suspensiones de esporas al 3% en peso en buffer de fosfatos pH 5.6 sin ningún tipo de agente protector. Las temperaturas de aire de entrada (T_e) fueron ajustadas a 120°C, 100°C y 80°C. Se utilizaron diferentes flujos de alimentación (mL min^{-1}), siendo función inversa la temperatura de aire de salida del secador (T_s) del flujo de alimentación. El secador por aspersión operó con un flujo de aire de $8.82 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$ y con una diferencial de presión de 6 columnas de agua.

Se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las muestras en suspensión (3% en peso) antes de entrar al secador y de los polvos obtenidos a la salida del secador, además de determinar la A_w de cada muestra, como fue descrito anteriormente.

5.5 Efecto de la A_w de deshidratación y de la A_w y temperatura de almacenamiento sobre la viabilidad y la vida de anaquel de las esporas

Cuando las esporas se han deshidratado, expuestas a las distintas humedades relativas creadas por las soluciones sobresaturadas de sales, éstas son recuperadas y sometidas a diferentes tratamientos para estudiar el efecto de la temperatura (4°C y 25°C) y de la A_w de almacenamiento (0.1 a 0.7).

Algunas de las muestras después de ser deshidratadas, siguieron almacenadas a la misma A_w a la cual se deshidrataron y otras fueron cambiadas a otros sistemas cerrados con diferente A_w , cambiando así la A_w de almacenamiento.

Después de que las muestras se deshidrataron a las distintas A_w y, a cada mes durante el almacenamiento se determinan las UFC g^{-1} de cada muestra a las distintas condiciones de almacenamiento sometidas, para lo cual las muestras deshidratadas contenidas en tubos Eppendorf fueron resuspendidas con una solución glucosada y se cuantificaron las UFC como fue descrito anteriormente. Así mismo, se estudió la oxidación de lípidos celulares como función de la A_w , temperatura y tiempo de almacenamiento.

5.6 Isotermas de desorción de esporas de *T. harzianum*

Las isotermas de desorción de las esporas de *T. harzianum* se construyeron una vez que las muestras se deshidrataron llegando al equilibrio con las A_w de los sistemas cerrados a 4°C y 25°C (**Apéndice 1**) cuantificando el contenido de humedad en equilibrio de las muestras en base seca a estas A_w . Los gráficos se construyeron con el contenido de humedad de equilibrio de las muestras en función de la A_w de deshidratación a la cual llegaron tanto a 4°C como a 25°C.

5.6.1 Estimación del valor de humedad de monocapa de esporas de *T. harzianum*

La estimación del valor de humedad de monocapa fue estimada utilizando los valores experimentales de las isotermas de desorción (contenido de humedad en equilibrio y A_w) por medio de las ecuaciones de BET (Brunauer *et al.*, 1938), Caurie (Caurie, 1981) y GAB (Van den Berg and Bruin, 1981). Estas ecuaciones que modelan isotermas de sorción, son mostradas y descritas en el **Apéndice 2** junto con los modelos de Henderson y Oswin que también fueron utilizados para modelar las isotermas, pero que sin embargo no incluyen un parámetro para determinar el valor de monocapa. Así, con la generación de gráficos de las ecuaciones de BET, GAB y Caurie fue posible estimar los valores de humedad de monocapa de las esporas de *T. harzianum*.

5.7 Métodos analíticos

5.7.1 Cuantificación de la biomasa total y esporas

La cuantificación de biomasa fue realizada por medio de la determinación gravimétrica de muestras tomadas cada 24 horas del biorreactor. Las muestras se filtraron al vacío utilizando papel filtro a peso constate. Una vez filtrada la muestra, el papel filtro con la biomasa miceliar fue introducida en un horno a 90°C por 24 horas para secarse y pasado el tiempo la muestra fue transferida a un desecador con sílica gel por 2 horas, por último, el papel filtro junto con las muestras fueron pesados en una balanza analítica.

La concentración de biomasa en peso seco se obtuvo sustrayendo el peso del papel filtro seco del peso del papel filtro con la muestra secos, dividiendo el peso obtenido por el volumen de muestra utilizado (10 mL).

La cuantificación de esporas producidas durante la fermentación fue realizada cada 24 horas por un tiempo total de 120 horas. De las muestras se filtraron 5 mL en un tamiz con malla 120 para separar el micelio de las esporas. Una vez filtrado el medio, se realizaron diluciones seriadas y se contó un promedio de las esporas en una cámara de Neubauer. Con el promedio obtenido se calcula la concentración de esporas de la siguiente manera:

$$\text{Esporas mL}^{-1} = \text{promedio de esporas contadas} * 1 \times 10^4 * \text{dilución}$$

La determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC), se realizó por medio del conteo de colonias en agar PDA, después de realizar diluciones seriadas en buffer de fosfatos pH 5.6 y sembrar en las cajas con PDA.

5.7.2 Determinación de glucosa residual

La cuantificación de la glucosa se llevó a cabo en un analizador YSI que se basa en la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa-oxidasa que se encuentra inmovilizada en una membrana en el sensor y cuyo producto de reacción, el peróxido de hidrógeno, es proporcional a la concentración de glucosa. Las muestras fueron tomadas cada 24 horas durante el tiempo que tardó la fermentación.

Para poder hacer las lecturas fue necesario centrifugar las muestras para eliminar residuos sólidos y hacer diluciones para aquellas muestras que rebasaban la concentración de 25 g L⁻¹ de glucosa, ya que el equipo no cuantifica de manera correcta por encima de esta concentración.

5.7.3 Estudio de la oxidación de lípidos

5.7.3.1 Cuantificación de especies reactivas de oxígeno intracelulares

Para evaluar la concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO), se efectuó una prueba fluorimétrica que se basa en la oxidación del diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA), la cual es una molécula no fluorescente que difunde libremente a través de la membrana celular y dentro de la célula es desacetilada por esterasas para formar 2',7'-diclorofluorescina (DCFH) no fluorescente, la cual es oxidada por las ERO para formar la molécula 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es fluorescente (LeBel *et al.*, 1992, Marchesi *et al.*, 1999). El fundamento de la técnica se muestra en la **Figura 5.1**.

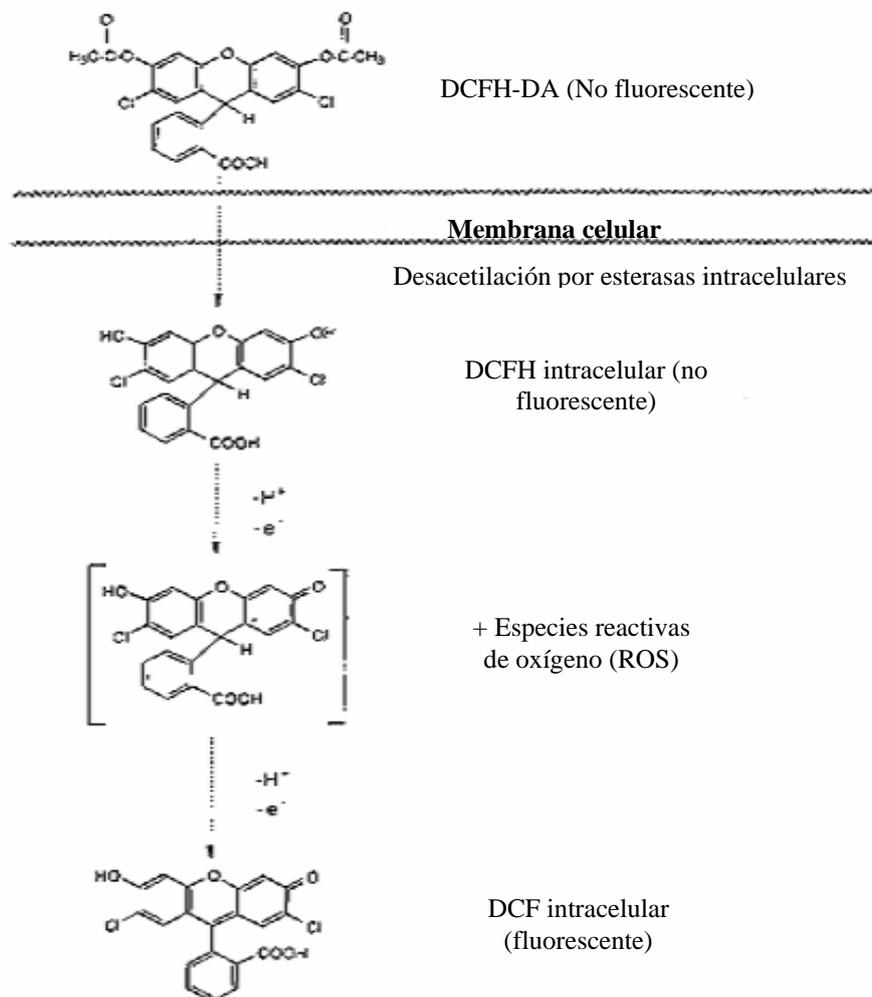


Figura 5.1. Mecanismo propuesto de la entrada de DCFH-DA a las células, su desacetilación a DCFH y su oxidación a DCF (LeBel *et al.*, 1992).

5.7.3.2 Curva estándar de oxidación de 2,7,-diclorofluorescina

La curva estándar de oxidación de 2,7,-diclorofluorescina (DCFH) se hizo en función de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como especie reactiva de oxígeno capaz de oxidar a DCFH a DCF.

Primero se mezcló 0.5 mL de una solución en etanol 1 mM del diacetato de diclorofluorescina (DCFH-DA) con 2 mL de NaOH 0.01 N y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos, para desesterificar la molécula. Pasado este tiempo, la solución se neutraliza con 10 mL de NaH_2PO_4 25 mM, pH 7.4 y de esta última solución se toman 50 μ L y se adicionan a Tris-HCl 40 mM, pH 7.4 en un volumen total de 2 mL.

La reacción se inicia por la adición de peróxido de hidrógeno a concentraciones finales de 10 a 100 μM y FeSO_4 a una concentración final de 10 μM (LeBel *et al.*, 1992). Después de 5 minutos de la adición, se mide la fluorescencia usando un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-55 con una longitud de onda de excitación y emisión de 504 nm y 520 nm respectivamente, con un slit de excitación de 2.5 nm, un slit de emisión de 3.7 nm y un tiempo de integración de 5 segundos, determinados experimentalmente. La curva estándar se muestra en la **Figura 5.2**.

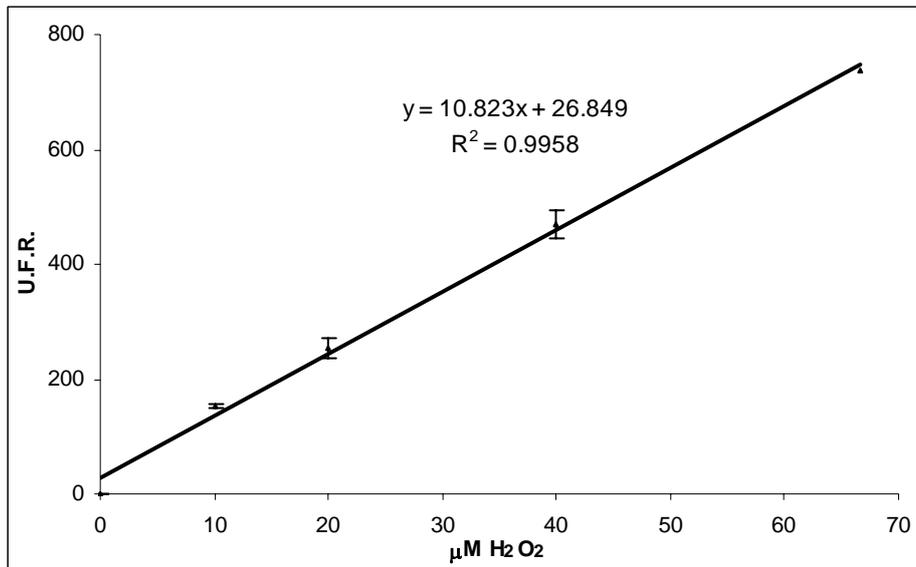


Figura 5.2. Curva estándar de oxidación de DCFH en función de la concentración de H_2O_2 .

5.7.3.3 Determinación de especies reactivas de oxígeno en esporas almacenadas por el método de DCFH

Los ensayos se efectuaron con 50 mg en peso seco de esporas (0.5 mL de las resuspensiones de esporas antes mencionadas) en un volumen final de 12.5 mL de buffer de fosfatos 50 mM, pH 5.6; el diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) fue adicionado a la suspensión de esporas antes mencionada a una concentración final de 10 μM de una solución fresca de DCFH-DA 1 mM en etanol.

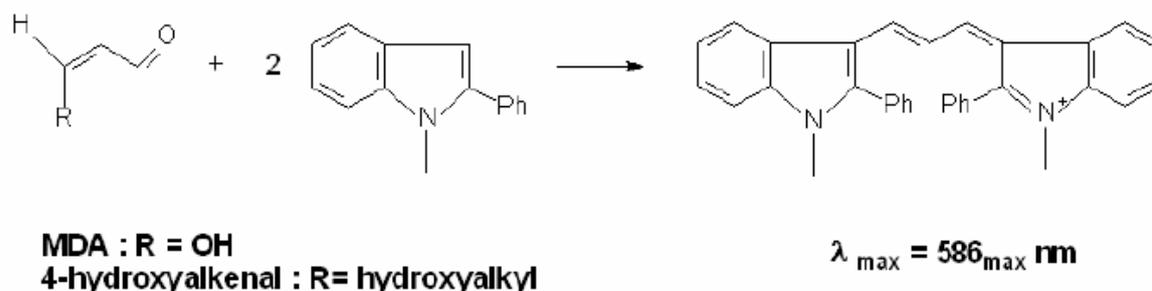
Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la suspensión fue centrifugada y el paquete celular lavado dos veces con el mismo buffer. Las células fueron resuspendidas en 500 μL del mismo buffer y 1.5 g de perlas de vidrio de 500 μm de diámetro fueron adicionadas para lisar las esporas con agitación con 5 ciclos de 1 minuto seguidos por 1 minuto en hielo, para evitar oxidaciones posteriores.

La suspensión de esporas lisadas se diluyó 1:5 con el buffer de fosfatos y se centrifugó a 25,000 g por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante diluyéndolo 1:10 en agua destilada y se midió la fluorescencia en las mismas condiciones descritas en la curva estándar (de Souza Espíndola *et al.*, 2003).

5.7.3.4 Cuantificación de malondialdehído como producto de la oxidación de macromoléculas

Dado que los peróxidos de lípidos son inestables y se descomponen para formar una serie de compuestos complejos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi alquenes (HAE), la medición de estas moléculas ha sido utilizada como indicador de peroxidación lipídica (Esterbauer *et al.*, 1991). En este estudio sólo se cuantificó la concentración de MDA por encontrarse en concentraciones mayores a las de HAE en muestras biológicas (Shimizu *et al.*, 2006), además de que el método utilizado para cuantificar productos de oxidación de lípidos (kit LPO-586 de OXIS Bioxytech) sólo cuantificaba MDA por separado o la mezcla de MDA y HAE sin poder determinar las concentraciones de HAE individualmente.

El método del kit LPO-586 está basado en la reacción del agente cromogénico, N-metil-2-fenilindol (MFI) con MDA o HAE a 45°C, donde una molécula de MDA o HAE reacciona con dos moléculas de MFI para rendir un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm de acuerdo a la siguiente reacción.



5.7.3.5 Curva estándar de malondialdehído

Para generar la curva tipo se realizaron diferentes diluciones con el acetal precursor del MDA, que incluía el kit, en agua en un rango de concentraciones de 0 a 4 μM . Se adicionaron 200 μL de cada una de las diluciones del acetal a tubos Eppendorf limpios, seguidos de 650 μL del reactivo diluido N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo y el ión férrico en metanol y 150 μL de HCl

concentrado (37%) por triplicado. La mezcla se agitó vigorosamente y fue mantenida en baño térmico a 45°C por 60 minutos, después fue centrifugada a 15,000 g por 10 minutos y el sobrenadante se transfirió a una celda para medir la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro. La curva estándar de MDA se muestra en la **Figura 5.3**.

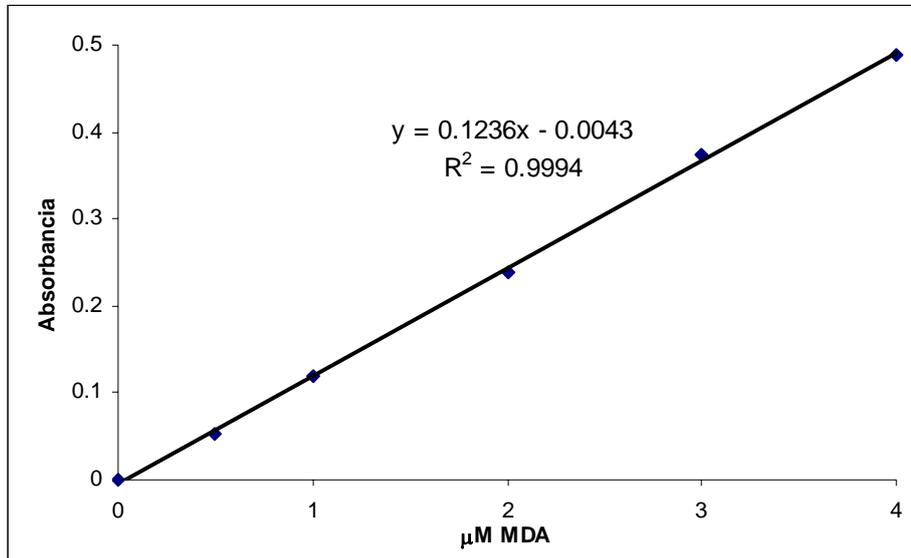


Figura 5.3. Curva estándar de concentración de MDA a 586 nm.

5.7.3.6 Determinación de malondialdehído en esporas almacenadas

Para la determinación de MDA en las muestras de esporas deshidratadas y almacenadas a diferentes A_w y a 4°C y 25°C, se efectuaron las pruebas siguiendo la recomendación del kit del uso de 5×10^8 células, por lo que se tomaron 66 μL de las suspensiones rehidratadas de esporas los cuales contenían esa cantidad de esporas aproximadamente.

Las muestras se lavaron 2 veces con buffer Tris 20 mM pH 7.4 para eliminar cualquier interferencia con la técnica y, posteriormente, las células fueron resuspendidas en 500 μL del mismo buffer y lisadas con perlas de vidrio exactamente igual como en la técnica de fluorescencia con la adición previa del antioxidante BHT a una concentración final de 5 mM. Después de la lisis, la muestra se diluyó 1:2 con el mismo buffer y 500 μL de la dilución fueron centrifugados a 3000 g por 10 min a 4°C tomando 200 μL del sobrenadante para determinar la concentración de MDA, siguiendo el mismo orden y metodología descrita para la curva estándar pero ahora con las distintas muestras.

5.7.4 Determinación de actividad de agua en muestras deshidratadas

La actividad de agua (A_w) de las muestras deshidratadas se determinó en un medidor Aw Sprint TH-500 de Novasina previamente calibrado a 25°C con 6 soluciones saturadas de diferentes sales, incluidas con el equipo, que dan distintos valores de A_w . Las A_w de las muestras se midieron hasta que llegaron al equilibrio con el valor de A_w de los sistemas cerrados a 4°C y 25°C, para esto, aproximadamente 3 gramos de muestra se depositaron en bandejas, incluidas en el equipo, haciendo ajuste de la temperatura de medición y posterior a eso se midió la A_w de las muestras.

5.7.5 Determinación del contenido de agua en muestras deshidratadas

El contenido de agua de las muestras deshidratadas se cuantificó utilizando un Titrino KFD 758 de Metrohm por el método de Karl Fisher, el cual cuantifica el agua presente en una muestra, por la reacción de yodo elemental con agua en presencia de dióxido de azufre, llevando a cabo una titulación con Hydranal Composite 2 (solución valorada de yodo), la cual cuantifica 2 mg de agua por mililitro de Hydranal gastado.

La titulación se hizo agregando la muestra en polvo, previamente pesada, a un recipiente con metanol puro en agitación, adicionando Hydranal hasta que se completó la reacción de óxido-reducción detectada por el electrodo del equipo y cuantificándose el volumen gastado de Hydranal. Los cálculos del contenido de humedad se hicieron en base seca.

VI. Resultados y Discusión

6.1 Cinéticas de producción de biomasa y consumo de sustrato

Los gráficos que representan las cinéticas de la producción de biomasa, esporas y consumo de glucosa durante el tiempo en que se llevó a cabo la fermentación son mostrados en la **Figura 6.1**.

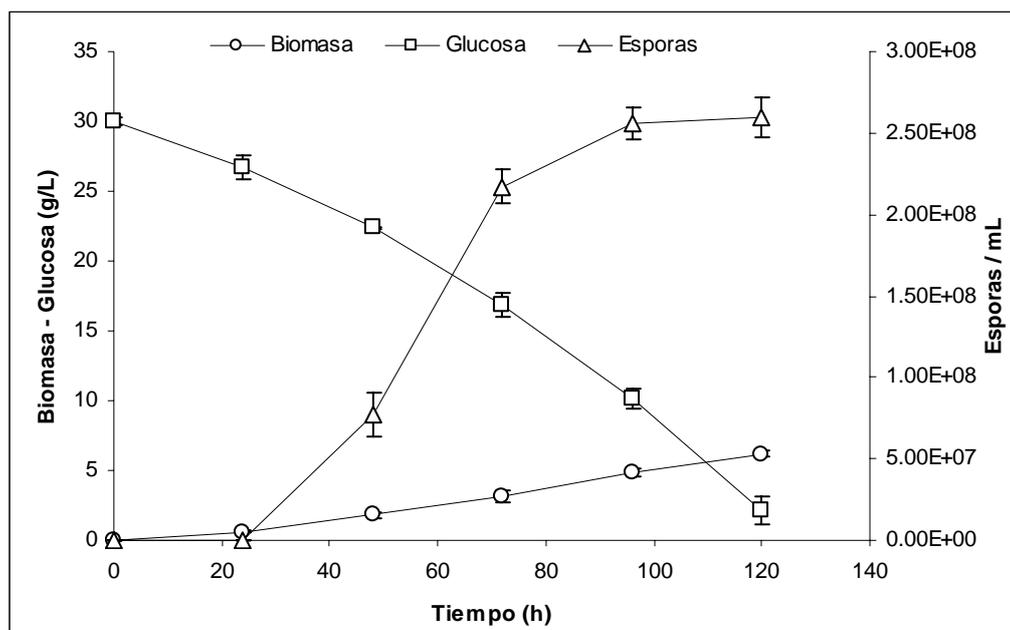


Figura 6.1. Cinética de la producción de biomasa, esporas y concentración de glucosa residual durante la producción de esporas como material biológico de estudio.

Los resultados de la cinética de producción y consumo antes presentados concuerdan con los resultados obtenidos por Gamboa (2004) utilizando la misma cepa, medio y condiciones de cultivo.

6.2 Estudio de muerte térmica en esporas de *T. harzianum*

Se encontró que las esporas producidas en medio líquido, bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, fueron muy sensibles al efecto de la temperatura, mostrando una disminución drástica de la sobrevivencia al ser sometidas a temperaturas mayores a 50°C en baño térmico, como es descrito en materiales y métodos.

Se calculó la relación de células viables antes (N_0) y después del tratamiento térmico (N) y se graficó el logaritmo natural de estas relaciones ($\ln N/N_0$) con respecto al tiempo de exposición de la células a cada temperatura en buffer de fosfatos pH 5.6 para obtener las constantes de

velocidad de muerte térmica (k) representada en la pendiente de cada gráfico a las temperaturas de prueba (**Figura 6.2**). A las temperaturas de prueba de 80°C y 90°C se encuentran menos puntos en los gráficos debido a la gran termosensibilidad de las esporas y al tiempo tan corto (segundos) para la inactivación térmica. Los valores de las constantes específicas de muerte térmica (k) para cada temperatura a pH 5.6 se muestran en la **Tabla 6.1**.

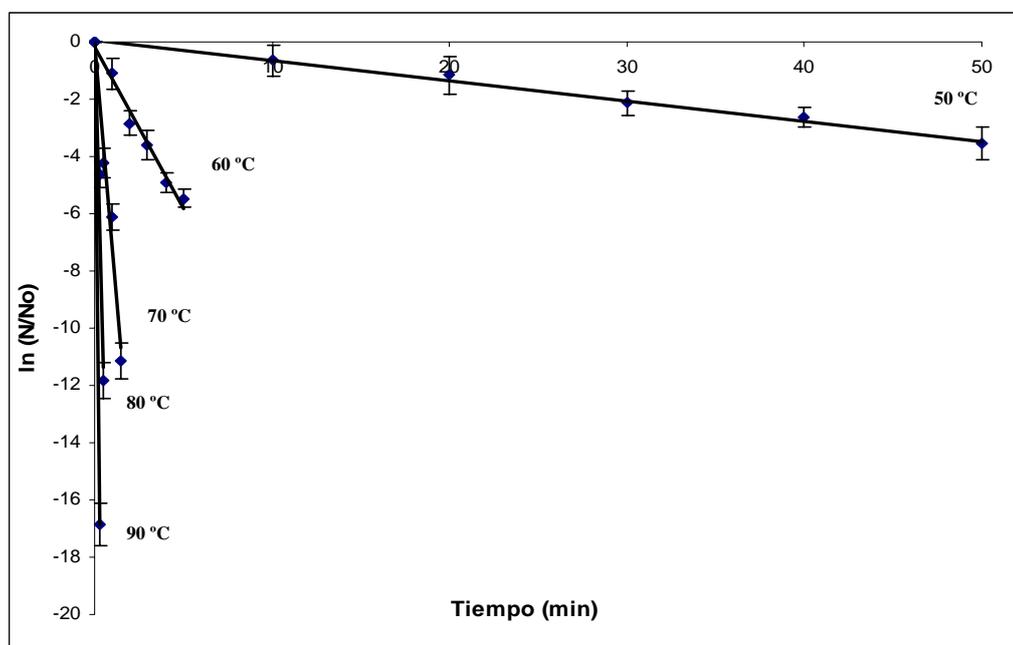


Figura 6.2. Gráfico de índice de supervivencia en función del tiempo a diferentes temperaturas, indicando las constantes de velocidad de muerte térmica para esporas de *T. harzianum*.

Tabla 6.1. Constantes específicas de muerte térmica (k) para esporas de *T. harzianum* a distintas temperaturas suspendidas en buffer de fosfatos pH 5.6.

Temperatura (°C)	k (min ⁻¹)
50	0.07
60	1.13
70	7.06
80	23.64
90	67.44

Con los valores de las constantes de velocidad de muerte térmica a cada temperatura se graficó el valor del logaritmo natural de k versus el inverso de la temperatura absoluta (K) para obtener por la pendiente y ordenada al origen el valor de la energía de inactivación y constante de Arrhenius respectivamente de las esporas de *T. harzianum* (**Figura 6.3**).

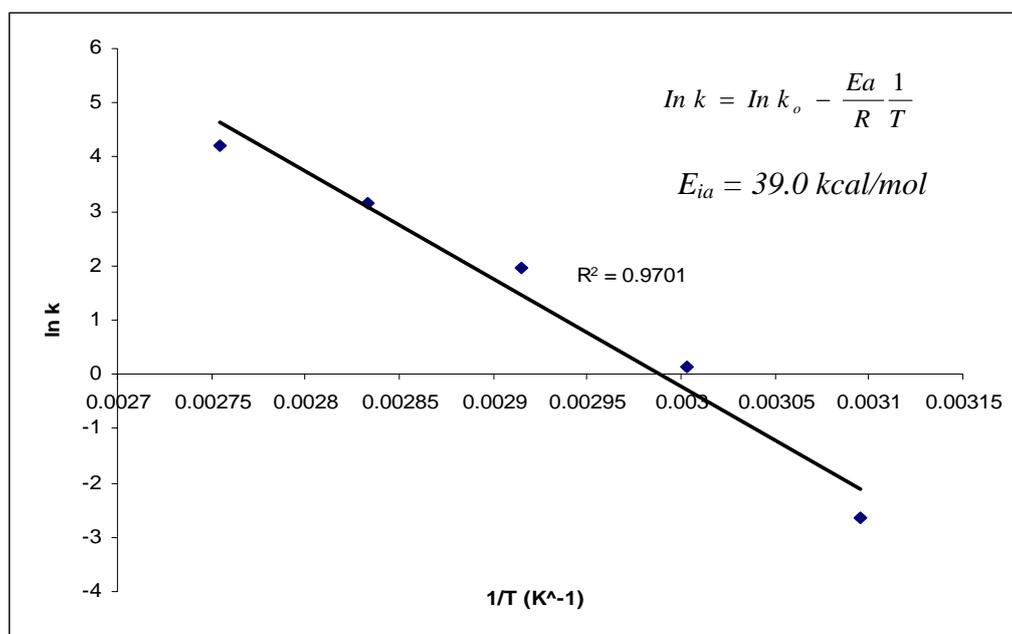


Figura 6.3. Gráfico del logaritmo natural de los valores de k versus el inverso de la temperatura (K^{-1}) para obtener E_{ia} y k_o .

La pendiente de la **Figura 6.3** expresa la relación E_{ia}/R donde E_{ia} es la energía de inactivación térmica de las esporas y R es la constante de los gases ideales. Así, se estimó un valor de energía de inactivación de **39,000 cal mol⁻¹**. La constante de Arrhenius fue estimada en un valor de **$4.7 \times 10^{25} \text{ min}^{-1}$** utilizando la ordenada al origen del gráfico de la **Figura 6.3**.

Este estudio también se efectuó con células resuspendidas en buffer de fosfatos pH 7, utilizando las mismas temperaturas y tiempos, no encontrándose diferencias significativas entre las constantes de velocidad de muerte térmica y la energía de inactivación de las esporas, por lo que no se presentan los resultados.

Comparando la energía de inactivación obtenida para esporas de *T. harzianum* con la energía de inactivación de esporas de algunos de los microorganismos más termorresistentes como *Bacillus stearothermophilus*, *B. subtilis* y *Clostridium botulinum*, mostrados en la **Tabla 6.2** (Perry y Green, 1997), se puede apreciar que el valor de E_{ia} para las esporas de *T. harzianum* es menor a la mitad de estas energías de inactivación de muerte celular y, por lo tanto mucho más sensibles al estrés térmico.

Tabla 6.2. Energías de inactivación térmica de algunos compuestos y microorganismos (Perry y Green, 1997).

Energía de inactivación (cal mol ⁻¹)	
Ácido fólico	16,800
Alcohol <i>d</i> -Pantotenílico	21,000
Cianocobalamina	23,100
Clorhidrato de tiamina	22,000
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	67,700
<i>Bacillus subtilis</i>	76,000
<i>Clostridium botulinum</i>	82,000
Anaerobio putrefacto NCA 3679	72,400

Haciendo una comparación entre la constante específica de muerte térmica a 50°C de esporas de *Trichoderma harzianum* y de esporas de *B. stearothermophilus*, se calculó el valor de la constante específica de muerte térmica a 50°C para las esporas de este último, la cual fue estimada en $k = 1 \times 10^{-8} \text{ min}^{-1}$. Este valor refleja la gran termorresistencia de *B. stearothermophilus* a 50°C, comparada con el valor de k calculado para las esporas de *T. harzianum* (0.07 min^{-1}), existiendo 6 órdenes de magnitud de diferencia entre ellos.

Con el valor de k , se calculó el tiempo de reducción decimal (D) (Ec. 6.1), que es el tiempo necesario para reducir a una décima parte la población de células viables a una determinada temperatura, a 50°C para esporas de *T. harzianum*.

$$\ln \frac{N}{N_o} = -k D \quad (6.1)$$

$$D = \frac{-2.303}{-0.0707 \text{ min}^{-1}} = 32.6 \text{ min}$$

Se obtuvo un valor muy bajo en comparación con el valor D calculado para *B. stearothermophilus* de $2.3 \times 10^8 \text{ min}$.

Para poder explicar esta gran sensibilidad de las esporas a la temperatura, se podría proponer la existencia de cambios a nivel intracelular y de pared celular cuando las células son producidas en diferentes medios, lo cual haría a las células más sensibles a diversos tipos de estrés incluyendo el térmico. Muñoz *et al.* (1995) trabajando con esporas de *T. harzianum* producidas en medio sólido y líquido, encontraron que las esporas producidas en medio líquido fueron más sensibles a la temperatura, la radiación UV y otros tipos de estrés, además de tener una menor vida de anaquel, que aquellas producidas en medio sólido. Lo anterior fue asumido a las

diferencias en la morfología entre estas esporas, donde las esporas producidas en medio líquido presentaron una pared celular menos gruesa y más organelos celulares (pudiéndose relacionar con una actividad metabólica mayor), mientras que las esporas de medio sólido tuvieron menos organelos y una pared celular más gruesa. Montazeri y Greaves (2002) reportaron que esporas de *Colletotrichum sp.* están rodeadas por una matriz extracelular, la cual es a menudo soluble en sistemas acuosos y sirve como protección a las esporas. Se cree que esta matriz protege a las esporas de los efectos dañinos de congelamiento, radiación UV, fluctuaciones de humedad relativa y desecación (Louis y Cooke, 1985; Louis *et al.*, 1988). Por lo tanto podría esperarse que esporas de *T. harzianum* producidas en medio líquido no tuvieran una matriz semejante (que es soluble en medio acuoso), lo cual es apoyado con microfotografías electrónicas de esporas de *T. harzianum* producidas en medio sólido, las cuales presentan un material extracelular que les permite formar agrupamientos o racimos (Muñoz *et al.*, 1995). Esto podría explicar en parte la alta termosensibilidad de las esporas de *T. harzianum* producidas en medio líquido.

Como varios autores reportan, existen además varios factores que intervienen en la sensibilidad de los microorganismos, como son su resistencia intrínseca (E_{ia}) (Stephan y Zimmermann, 1998; Bayrock y Ingledeew, 1997), la composición del medio de crecimiento (Morgan *et al.*, 2006), la fase de crecimiento en la cual son cosechadas las células (Pedreschi *et al.*, 1997), el uso de agentes protectores durante el crecimiento o antes de secar (Morgan *et al.*, 2006), el almacenamiento de trehalosa durante el crecimiento (Plourde-Owobi *et al.*, 2000), la actividad de agua en el medio de producción del microorganismo (Blaszyk *et al.*, 1998) entre otros. Todos ellos pueden afectar la sensibilidad a la temperatura de los propágulos aquí estudiados (conidios).

6.3 Estudio del efecto de la deshidratación y de su velocidad sobre la viabilidad de esporas de *T. harzianum*

6.3.1 Efecto de la deshidratación sobre la viabilidad de las esporas

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6.4**, donde se expresa el porcentaje de sobrevivencia de las esporas en función del grado de deshidratación alcanzado cuando las muestras se equilibraron a una determinada A_w . Las muestras se recuperaron después de 15 días de deshidratación en los sistemas cerrados a 4°C en el rango de A_w de 0.125 a 0.760. Después se determinó el porcentaje de sobrevivencia con el cociente de las UFC g^{-1} de las muestras deshidratadas y las UFC g^{-1} de la muestra no deshidratada (día cero).

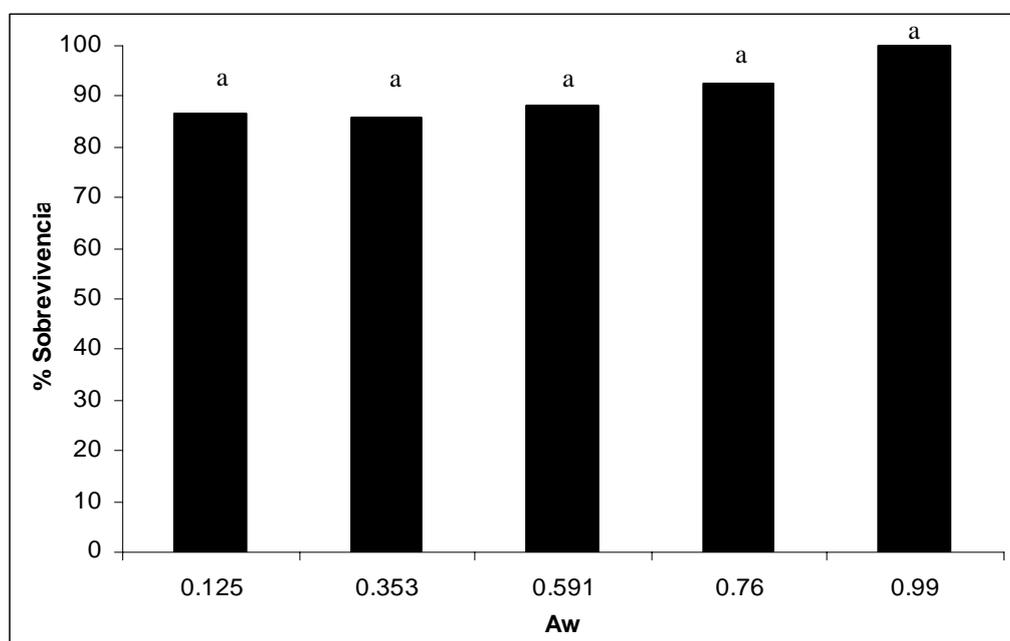


Figura 6.4. Sobrevivencia en función de la deshidratación en sistemas cerrados con sales expresada como A_w a 4°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Como se puede apreciar en los resultados de la **Figura 6.4** no hubo diferencia significativa en la sobrevivencia de las células una vez que estas se deshidrataron al llegar a la A_w de equilibrio en los sistemas cerrados después de 15 días de deshidratación. Esto, en un principio nos indicaba que no existía algún efecto por la deshidratación llevada en este caso a 4°C sobre la viabilidad de las esporas. Sin embargo, muestras frescas se deshidrataron a vacío para observar si seguían el mismo comportamiento.

6.3.2 Efecto de la velocidad de deshidratación sobre la viabilidad de las esporas

Por otra parte se evaluó el efecto de la velocidad de deshidratación sobre la sobrevivencia de las células. Los resultados de la deshidratación rápida, llevada a cabo a vacío a 4°C, son mostrados en la **Figura 6.5** donde el 100 % de sobrevivencia es representado por la muestra que no fue deshidratada.

Aún así, reduciendo el tiempo en el cual fue llevada la deshidratación de 15 días a 2 horas aproximadamente, no hubo diferencia significativa en la sobrevivencia entre las distintas muestras en el rango de A_w de 0.1 a 0.7 con respecto al control (no deshidratado) reafirmando lo mostrado en la **Figura 6.4**. Solamente, se encontró diferencia significativa en la muestra deshidratada hasta valores de A_w de 0.062 (3% humedad en base seca), el cual es muy bajo con respecto al control y en donde muy probablemente se removió agua constitutiva de diversas moléculas, pues el contenido de humedad estuvo por debajo del contenido de humedad de monocapa (< 6 % b. s.), el cual se verá más adelante, lo que causó un mayor decremento en la sobrevivencia. En general en el rango de A_w de 0.1 a 0.7 (5-23% humedad b.s.) no se observaron cambios drásticos en la sobrevivencia de las esporas como se esperaba debido sólo a la deshidratación.

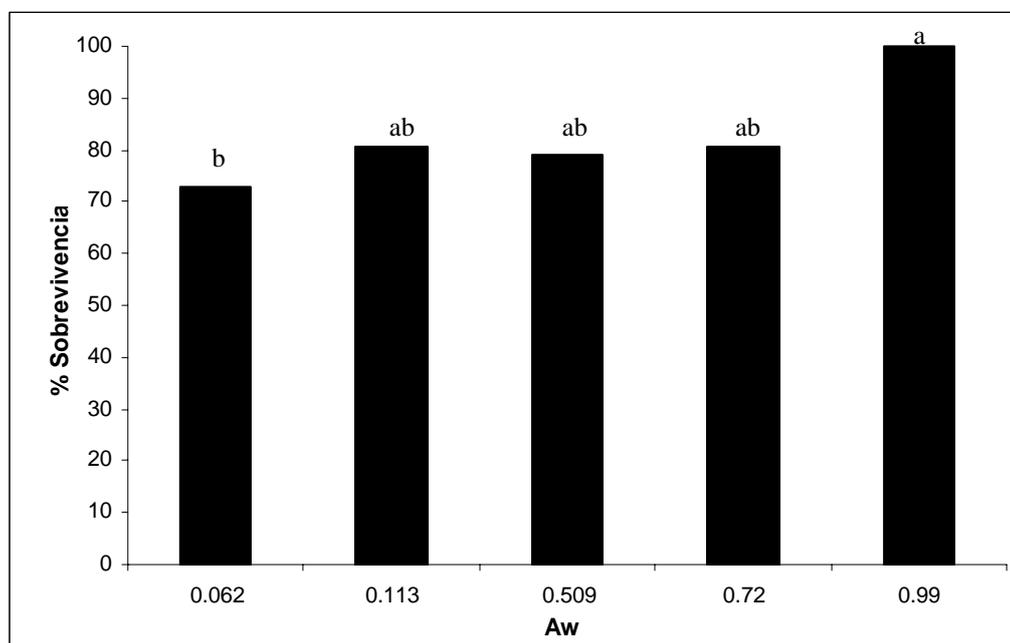


Figura 6.5. Sobrevivencia en función de la deshidratación a vacío expresada como A_w a 4°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Para constatar que en realidad las células sometidas a deshidratación por vacío no sufrieron daño en su estructura y membrana, se obtuvieron micrografías electrónicas de las esporas

deshidratadas a A_w 's de 0.11, 0.50 y 0.75 y se compararon con una muestra control que no fue deshidratada. Las imágenes se muestran en la **Figura 6.6**.

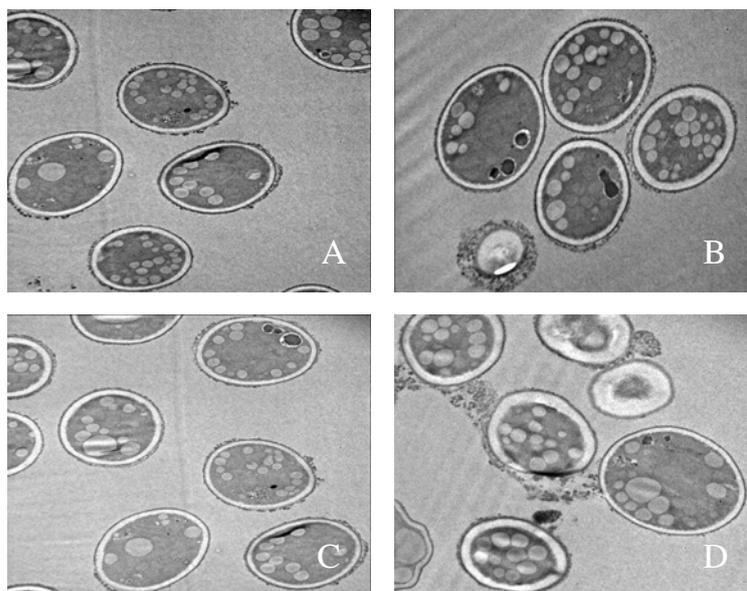


Figura 6.6. Micrográficas electrónicas de esporas deshidratadas a vacío a distintas A_w a 4°C (7×10^3 veces de aumento). **A)** Muestra sin deshidratar (A_w 0.99); **B)** muestra a A_w 0.11; **C)** muestra a A_w 0.5 y **D)** muestra a A_w 0.72.

Como puede apreciarse en las imágenes de la **Figura 6.6**, no existen evidentes diferencias en la forma e integridad de la membrana entre las esporas deshidratadas a las distintas A_w y la muestra no deshidratada, además de que no hubo colapso ni ruptura en ellas, lo que concuerda con el elevado porcentaje de sobrevivencia mostrado en la **Figura 6.5**, dado que las células no sufrieron daño al deshidratarse y fueron capaces de germinar cuando fueron sembradas. Por lo que al parecer la deshidratación, no tiene un efecto considerable sobre la viabilidad de las esporas inmediatamente después de llevarse a cabo, en el rango de A_w de 0.1 a 0.7, cuando el contenido de humedad en base seca estuvo de 5 a 23%. Sin embargo, al deshidratar a contenidos de humedad o A_w más bajos es posible que la disminución de la sobrevivencia sea producto del daño a macromoléculas como proteínas, DNA y lípidos de membrana.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hong *et al.* (2000), quienes reportan que esporas de *Metarhizium flavoviride* al secarse con aire de forma rápida (20°C/17 horas, 0.1 de A_w y 20% de humedad en las esporas) y de forma lenta (27°C/5 días, A_w de 0.5 y 27% de humedad en las esporas) disminuyeron su sobrevivencia sólo en un 10%, no observando un gran efecto sobre la sobrevivencia independientemente de la velocidad de deshidratación. Sin embargo, cuando almacenaron ambas muestras por 14 días a 50°C y 8.1% de contenido de humedad (previamente ajustadas a esta humedad), ellos observaron que la sobrevivencia fue

mayor cuando las esporas fueron deshidratadas lentamente, determinando el efecto benéfico del secado a una velocidad lenta para una larga vida de anaquel en las esporas.

En contraparte, Bayrock y Ingledeew (1997) sometieron a *S. cerevisiae* a secado por lecho fluidizado a 40°C, obteniendo un 10% de sobrevivencia al final del proceso, conociendo previamente por experimentos en baño térmico, que a esta temperatura las levaduras no sufrían reducción en su viabilidad. Al secar las muestras, observaron que sólo cuando éstas alcanzaron <15% de humedad decreció la viabilidad aún aumentando las temperaturas de secado de 40°C a 80°C, por lo que propusieron que el mecanismo principal de daño celular durante el secado por lecho fluidizado de estas levaduras era el grado de deshidratación que alcanzaron las muestras.

Lo encontrado por nosotros podría deberse a que en este experimento se usaron células frescas, mientras que en el trabajo de ellos se usaron muestras comerciales, tratadas y almacenadas por un tiempo, por lo que la cantidad de carbohidratos de reserva como trehalosa o sacarosa en estas muestras pudieron ser agotados y no tener el efecto protector antes mencionado. Además la temperatura a la que se efectuaron los experimentos por ellos fue arriba de 40°C, mientras que nosotros realizamos la deshidratación a 4°C, para limitar cualquier daño por temperatura.

Por otro lado, Pedreschi y Aguilera (1997) reportaron una pérdida de sobrevivencia de esporas de *T. harzianum* del 37% con respecto a la inicial, cuando las esporas se deshidrataron con sílica gel hasta una A_w de 0.03 a temperatura ambiente. Esto contrasta con la pérdida de sobrevivencia del 20% obtenida en este estudio. Probablemente a que ellos alcanzaron una mayor deshidratación y un contenido de humedad de casi 0%, sin embargo, la sobrevivencia de las esporas obtenida por ellos después de deshidratar hasta A_w de 0.03 no fue drásticamente disminuida, como se esperaba si la deshidratación tuviera un gran impacto sobre la viabilidad de estas esporas.

En operaciones donde el agua es removida rápidamente de sistemas biológicos, como es el caso de secado por aspersión (segundos), es muy probable que las células de diversos organismos no cuenten con mecanismos que sean capaces de proteger a la célula de la deshidratación o que el tiempo requerido para activar estos mecanismos sea mayor al tiempo en que sucede la deshidratación y así el daño causado por esta sea mayor e irreversible, no así cuando las células son deshidratadas a velocidades moderadas o lentas que les permitirían activar dichos mecanismos de defensa a daño por deshidratación y mantener su integridad celular y una elevada viabilidad después de la deshidratación.

Con respecto a lo anterior, aunque los sistemas biológicos descritos a continuación no sean esporas de hongos, se esperaría que en general organismos anhidrobióticos tuvieran mecanismos en común para disminuir los daños por deshidratación. Por ejemplo, Crowe y Crowe (1982) observaron que nemátodos (*Aphelenchus avenae*) en estado de anhidrobiosis asumían una morfología característica en forma de espiral que los hacía sobrevivir a la deshidratación cuando esta se llevaba a cabo lentamente, pero cuando eran deshidratados de manera rápida, ellos no asumían la morfología de espiral y eran poco resistentes a la deshidratación. Ellos propusieron que existen mecanismos dependientes del tiempo de adaptación a la eliminación de agua en estos organismos, como la producción de trehalosa principalmente, los cuales les permiten sobrevivir a la deshidratación.

En el caso de plantas, se ha visto que los mecanismos de protección en contra del daño por desecación en angiospermas son complejos y varían entre especies. Estos incluyen: la producción de proteínas, azúcares y varios solutos compatibles, los cuales mantienen la integridad de macromoléculas y membranas; la producción de antioxidantes para minimizar el daño por radicales libres; reorganización subcelular, tales como el plegado de paredes celulares y el reemplazo de agua dentro de vacuolas, para minimizar daños mecánicos asociados con pérdida de turgor. Estos mecanismos de protección son generalmente inducidos durante el secado y ha sido sugerido que el tiempo tomado para su inducción y establecimiento evita la sobrevivencia cuando se lleva a cabo el secado en forma rápida (Farrant *et al.*, 1999).

6.4 Secado por aspersión de esporas de *T. harzianum*

En otro experimento llevado a cabo para poder determinar los efectos tanto de la deshidratación y la temperatura durante el secado, se secaron por aspersión suspensiones de esporas al 3% en peso con las condiciones descritas anteriormente.

La sobrevivencia de las esporas utilizando una temperatura de entrada (T_e) de 120°C, aún con una temperatura de aire salida (T_s) de 50°C, fue cercana a 0%, no así cuando se utilizaron T_e 's de 100°C y 80°C donde la sobrevivencia a pesar de disminuir fue superior, alcanzándose porcentajes de sobrevivencia de hasta el 12% y 25% respectivamente cuando la T_s fue de 50°C, sólo cuando la $T_s > 70^\circ\text{C}$ a una T_e de 100°C la sobrevivencia cayó cerca del 0%. Debido a las condiciones de operación del equipo a la T_e de 80°C sólo se evaluaron dos temperaturas de salida, no pudiendo evaluar la viabilidad a temperaturas mayores a 60°C debido a que los flujos de alimentación al secador eran muy pequeños y la recuperación final del polvo deshidratado muy baja. La **Figura 6.7** muestra la sobrevivencia en función de la T_s cuando la T_e fue de 120°C, 100°C y 80 °C.

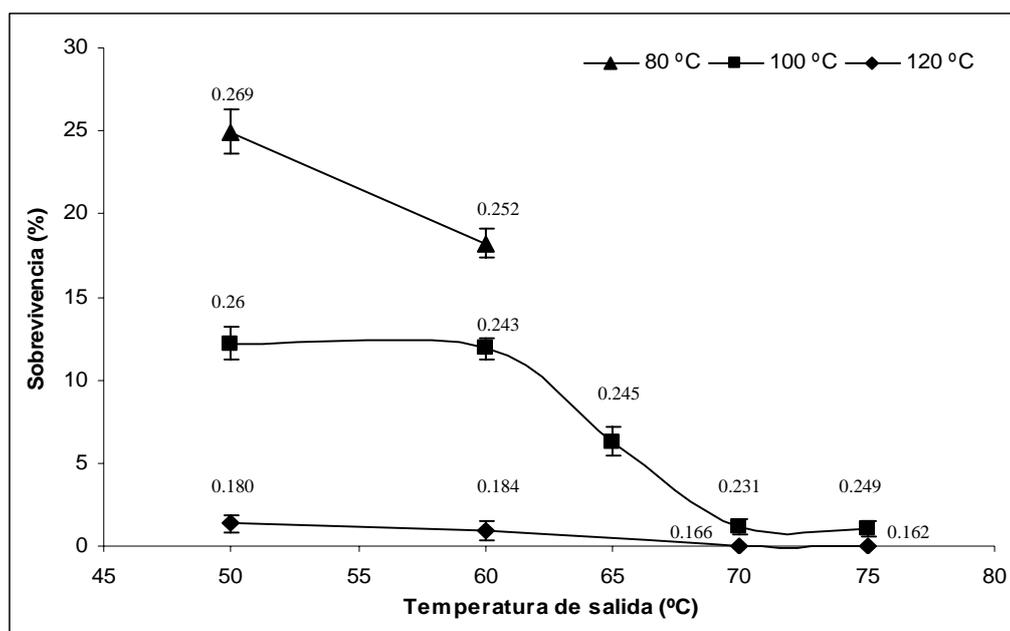


Figura 6.7. Sobrevivencia de muestras secadas por aspersión a una Te de 120°C, 100°C y 80°C en función de la Ts. Los números en los símbolos son los valores de Aw de las muestras a la salida del secador.

Como se muestra en la **Figura 6.7** la sobrevivencia fue función aparentemente sólo de Te y Ts, ya que la Aw de todas las muestras no cambió considerablemente permaneciendo en el rango de 0.16 a 0.26. En cambio, la sobrevivencia de las muestras si fue marcadamente alterada conforme aumentó la temperatura de entrada y salida del secador. Por ejemplo, las muestras secadas a una Te de 120°C y 100°C presentaron valores similares de Aw al salir del secador a una Ts de 50°C, sin embargo, la sobrevivencia entre ellas fue diferente en casi un orden de magnitud.

Con lo anterior se puede notar un mayor efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las esporas más que por la deshidratación, apoyado por los resultados obtenidos en las pruebas de deshidratación (**Figuras 6.4 y 6.5**) y las micrografías de la **Figura 6.6**, pues a valores de Aw de 0.1 y 0.3 la pérdida de viabilidad en las esporas no fue significativa, por lo que al secar por aspersión nos reafirma la gran sensibilidad de las esporas a la temperatura y posiblemente el menor daño que conlleva la deshidratación.

El daño causado durante el secado por aspersión en las esporas puede ser dirigido principalmente a membranas y proteínas, no permitiendo la reparación del daño y la consecuente incapacidad para germinar. Lo anterior es apoyado por resultados dentro de nuestro grupo al secar esporas de *T. harzianum* con el uso de soportes, cuya forma y estructura celular es considerablemente alterada por compactamiento y deformación en la membrana acompañado de una baja viabilidad (**Figura 6.8**). La deformación que se observa en las membranas de las esporas puede ser debida a la velocidad de remoción de agua y a la falta de

interacción de otras moléculas con fosfolípidos y proteínas de membrana reemplazando las moléculas de agua, lo que originaría un compactamiento y alteración de la membrana celular, como han propuesto Crowe *et al.* (1992), además del daño causado por la temperatura a moléculas como proteínas, desnaturalizándolas y cambiando sus conformaciones en la membrana.

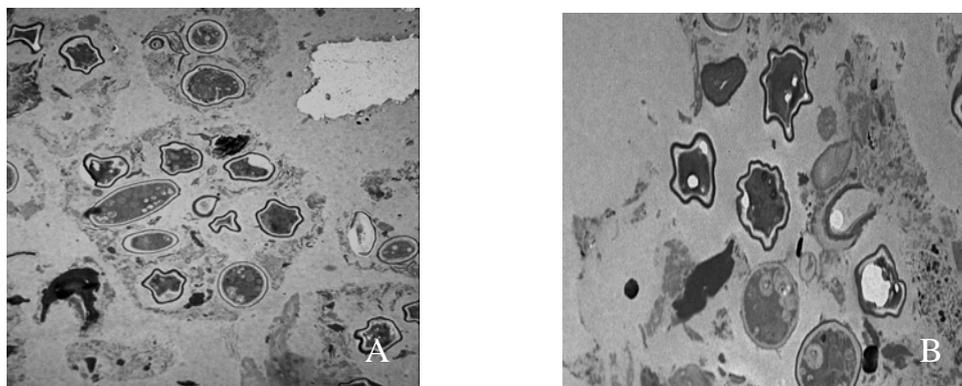


Figura 6.8. Micrografías electrónicas de esporas de *T. harzianum* secadas por aspersión con fécula de maíz como soporte, aumento: 7×10^3 . A) $T_e = 120^\circ\text{C}$; B) $T_e = 150^\circ\text{C}$ ambas a un flujo de 150 mL min^{-1} .

Lo anterior concuerda con Ananta *et al.* (2005), quienes demostraron que la muerte celular de *Lactobacillus rhamnosus* secado por aspersión, usando leche en polvo como soporte, fue causada principalmente por daño a la membrana celular, evaluado por citometría de flujo, utilizando diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio, y que el grado de desintegración membranal incrementó progresivamente cuando la temperatura de aire de salida incrementó, lo que concuerda con estudios previos que reflejan que daños en la membrana son los responsables de muerte celular durante el secado (Teixeira *et al.*, 1995).

En varios estudios de secado por aspersión mencionados anteriormente, se puede observar que este método de secado es uno de los más dañinos, en comparación de otros, debido a las altas temperaturas utilizadas en el proceso. Haciendo una comparación de los tres métodos de secado más ampliamente usados en la industria (Morgan *et al.*, 2006), la **Tabla 6.3** muestra el efecto de estos métodos de secado y sus condiciones de operación sobre la viabilidad de conidios de hongos utilizados como agentes de control biológico.

Tabla 6.3. Comparación entre los principales métodos de secado utilizados para preservar esporas de hongos.

Microorganismo (conidios)	Secado por aspersión	Secado en lecho fluidizado	Liofilización
<i>Epicoccum nigrum</i> ¹	Vi < 10%, con agentes protectores Te = 150°C Ts = 80°C Flujo = 200 mL min ⁻¹	Vi: 100%, sin agentes protectores T = 30-40°C t = 20 min.	Vi: 100%, con leche en polvo como protector y 80% sin protectores Congelamiento: -20 °C/24 h Sublimación: -80°C, 1.5 kg, 24 h
<i>Penicillium oxalicum</i> ²	Vi < 20%, con agentes protectores Te = 150°C Ts > 80°C Flujo = 200 mL min ⁻¹	Vi: 100%, sin agentes protectores T = 30-40°C t = 20 min	Vi: 100% con agentes protectores y 63% sin protectores Congelamiento: -20 °C/24 h Sublimación: -80 °C, 1.5 kg, 24 h
<i>Beauveria brongniarti</i> ³	Vi: 37%, con agentes protectores Te = 80°C Ts = 53°C Flujo = 2.3 mL min ⁻¹	T = 60-80 °C t = 6 min. Vi (60 °C) = 16 % Vi (80 °C) = 9 %	Vi: 68 %, con agentes protectores Congelamiento: -80 °C/24 h Sublimación: -35°C, 0.09 mbar, 20 h
<i>Metarhizium anisopliae</i> ³	Vi: 35 % con agentes protectores Te = 80 °C Ts = 53 °C Flujo = 2.3 mL min ⁻¹	T = 60-80°C t = 6 min. Vi (60°C) = 12% Vi (80°C) = 5%	Vi: 4%, con agentes protectores Congelamiento: -80 °C/24 h Sublimación: -35°C, 0.09 mbar, 20 h

Fuente: **1)** Larena *et al.*, 2003 (a) ; **2)** Larena *et al.*, 2003 (b); **3)** Horaczek y Viernstein, 2004. Vi: viabilidad (comparada con el control sin deshidratar), Te: temperatura de entrada, Ts: temperatura de salida, t: tiempo.

Como se muestra en la **Tabla 6.3**, el secado por aspersión es el método que reduce más la viabilidad de microorganismos, aun usando agentes protectores, principalmente por el uso de altas temperaturas de proceso, no así el secado por lecho fluidizado o la liofilización los cuales usan temperaturas más bajas y congelación respectivamente.

El secado por lecho fluidizado se presenta como una buena opción para la deshidratación y conservación de microorganismos por las altas viabilidades que se obtienen después de secar, aún sin usar agentes protectores, además de que permite el uso de bajas temperaturas de proceso reduciendo el daño por temperatura; sin embargo, se han hecho pocos estudios con respecto a este método de secado en microorganismos (Morgan *et al.*, 2006). Por otro lado, aunque con la liofilización se obtienen altas viabilidades con el uso de agentes protectores, ésta es más costosa y consume más tiempo que los otros métodos.

6.5 Isotermas de desorción de esporas de *T. harzianum* a diferentes temperaturas

Las isotermas de desorción de las esporas se construyeron una vez que las esporas se deshidrataron en los sistemas cerrados (soluciones de sales) hasta alcanzar la humedad en equilibrio con la A_w correspondiente a 4°C y 25°C. Las metodologías para determinar la A_w y el contenido de agua de las muestras fueron explicadas anteriormente. Las isotermas se construyeron en el rango de A_w de 0.11 a 0.99. Sólo el rango de A_w de 0.1 a 0.76 se muestra en la **Figura 6.9** para una mejor visualización.

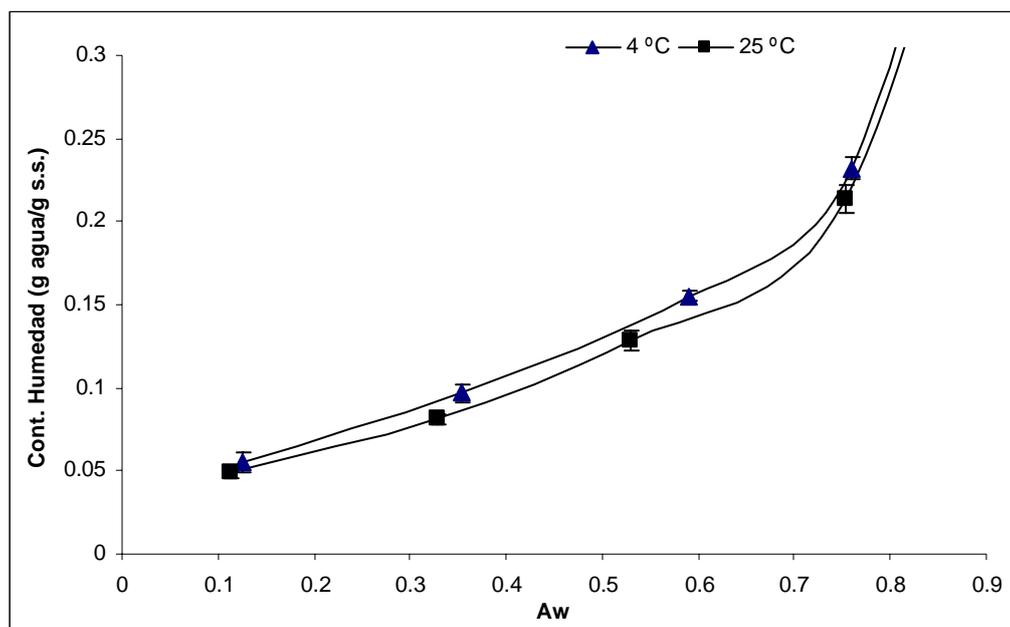


Figura 6.9. Isotermas de desorción de esporas de *T. harzianum* a 4°C y 25°C. El contenido de humedad está expresado por gramo de sólido seco (g s.s.).

6.5.1 Determinación del valor de humedad de monocapa de esporas de *T. harzianum*

Para obtener el valor de humedad de monocapa (X_0) de las esporas de *T. harzianum*, que en teoría representa el contenido de humedad óptimo de almacenamiento, se utilizaron 3 ecuaciones para estimar este valor. El valor de la monocapa para las muestras de esporas almacenadas a 4°C y 25°C se calculó con las ecuaciones de BET, GAB y Caurie como fue explicado previamente. Debido al rango limitante de la ecuación de BET (A_w 0.05-0.5), para ambas isotermas (4°C y 25°C) se tomaron los datos hasta los valores de A_w de 0.5. Ambas rectas se muestran en la **Figura 6.10**.

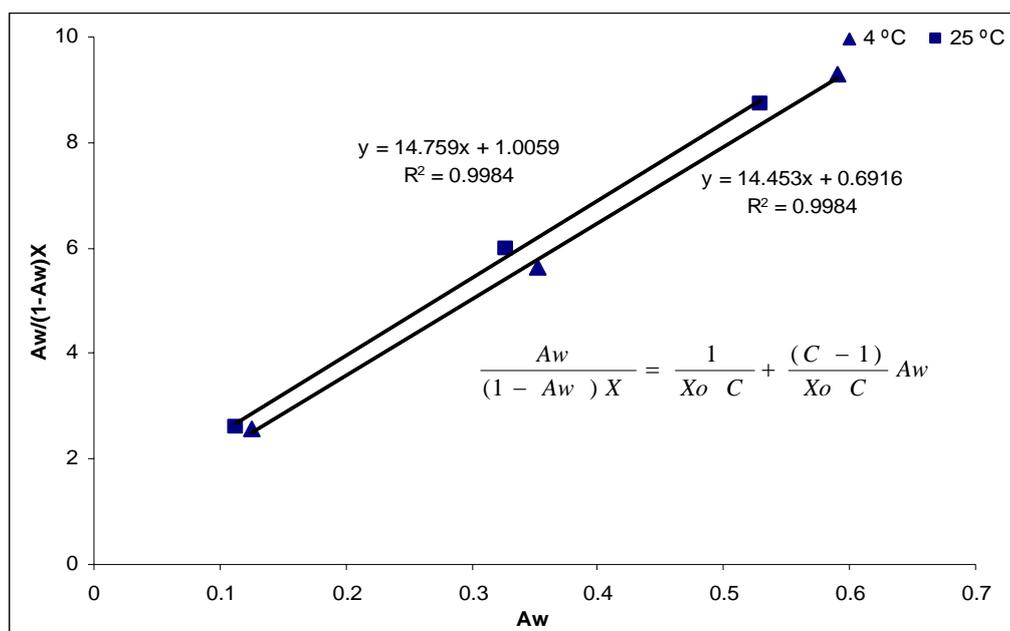


Figura 6.10. Gráfico de $A_w/(1-A_w)X$ en función de A_w que representa la ecuación de BET linealizada para el cálculo de la humedad de monocapa (X_o) y la constante C .

De la ecuación de BET se pueden calcular los valores de la humedad de monocapa (X_o) y de la constante C conociendo los valores de la pendiente y ordenada al origen de las rectas de la **Figura 6.10**. Los valores de X_o y C para muestras almacenadas a 4°C y 25°C calculados por la ecuación de BET se muestran en la **Tabla 6.4**.

Tabla 6.4. Valores calculados de monocapa (X_o) y la constante C utilizando la ecuación de BET a 4°C y 25°C .

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	X_o (g agua g^{-1} s.s.)	C
4	0.066 ± 0.002	21.9
25	0.061 ± 0.004	15.7

Utilizando el modelo de GAB, que permite manejar un rango más amplio de datos de A_w (0.05 a 0.95), se construyeron los gráficos con los datos experimentales de las isothermas de desorción a 4°C y 25°C (**Figura 6.11**) incluyendo los datos de humedad de esporas frescas con $A_w = 0.99$, los cuales se ajustaron bien a esta ecuación a pesar del rango de A_w que esta permite.

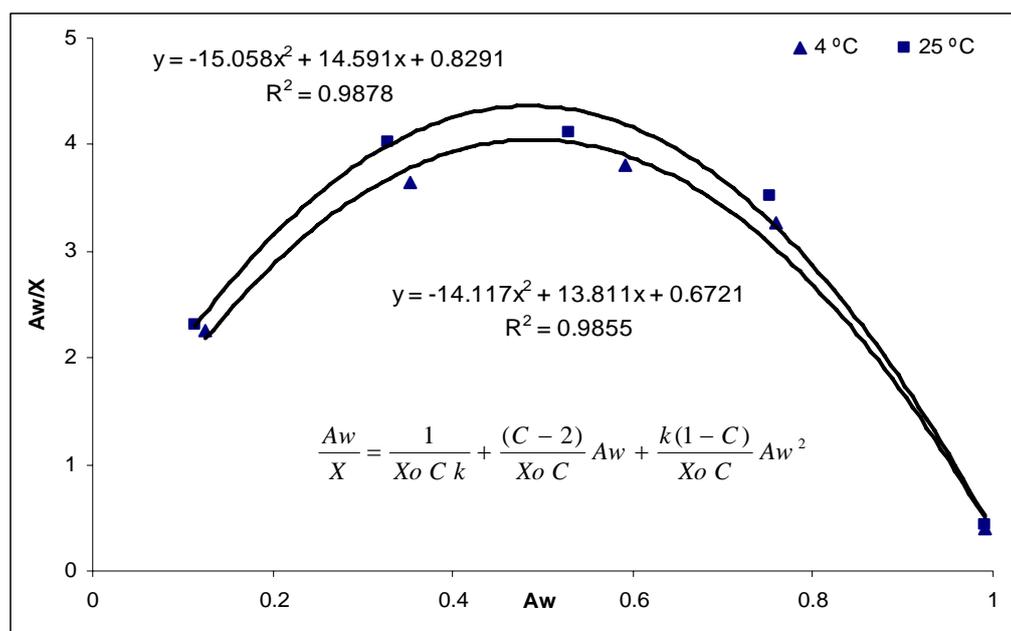


Figura 6.11. Gráfico de A_w/X en función de A_w que representa la ecuación de GAB para el cálculo del valor de monocapa (X_o) y las constantes C y k .

De las ecuaciones polinómicas de segundo grado ajustadas de los gráficos de la **Figura 6.11** se calculan los valores de X_o , C y k resolviendo las ecuaciones numéricamente o utilizando las igualdades dadas por Timmermann *et al.* (2001). La **Tabla 6.5** muestra los valores calculados de X_o , C y k para muestras almacenadas a 4°C y 25°C , según la ecuación de GAB.

Tabla 6.5. Valores calculados de monocapa (X_o) y las constantes C y k utilizando la ecuación de GAB a 4°C y 25°C .

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	X_o (g agua g^{-1} s.s.)	C	k
4	0.072 ± 0.004	23.6	0.97
25	0.066 ± 0.003	20.3	0.97

Utilizando ahora la ecuación de Caurie linealizada, la cual permite utilizar un rango de datos de A_w de 0 a 0.85, se crearon los gráficos con datos experimentales de las isothermas de desorción a 4°C y 25°C solamente hasta valores de A_w de 0.75 (**Figura 6.12**). Con las regresiones lineales de los gráficos de la **Figura 6.12** se calculó X_s , humedad de seguridad para el almacenamiento, que es equivalente a X_o y la constante r (**Apéndice 2**).

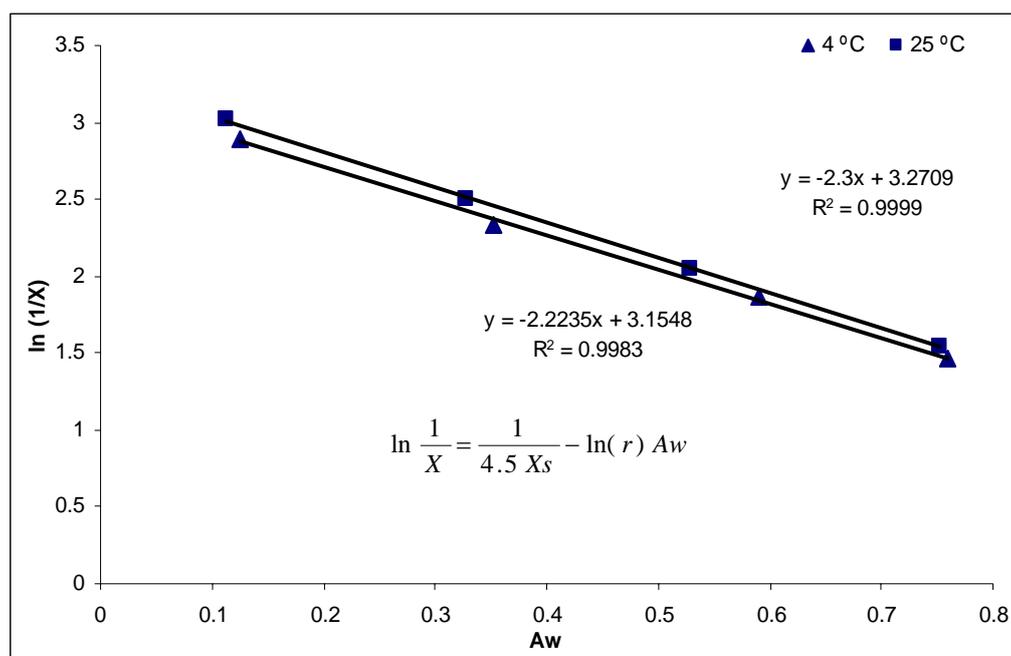


Figura 6.12. Gráfico de $\ln 1/X$ en función de A_w que representa la ecuación de Caurie para el cálculo del valor de la humedad de seguridad (X_s) y la constante r .

Los valores de X_s y r para las muestras almacenadas a 4°C y 25°C se muestran en la **Tabla 6.6**.

Tabla 6.6. Valores calculados de humedad de seguridad (X_s) y la constante r utilizando la ecuación de Caurie a 4°C y 25°C.

Temperatura (°C)	X_s (g agua g ⁻¹ s.s.)	r
4	0.070 ± 0.002	0.108
25	0.068 ± 0.001	0.100

Los valores de la monocapa para esporas de *T. harzianum* obtenidos por las ecuaciones de BET, GAB y Caurie son muy semejantes (6-7% de humedad b.s.) y se encuentran en el rango del 5% a 10% de humedad de monocapa para muchos alimentos y proteínas. El valor obtenido de humedad de monocapa por la ecuación de GAB fue considerado como una mejor aproximación porque fue el modelo que mejor se ajustó a los valores experimentales de las isothermas de desorción en el rango de A_w experimental de 0.1-0.99 (**Apéndice 3**). Este valor de monocapa obtenido por la ecuación de GAB se correlacionará con los siguientes resultados.

6.6 Efecto de la A_w y temperatura de almacenamiento sobre la vida de anaquel de las esporas

Las muestras una vez deshidratadas a la A_w de equilibrio en los sistemas cerrados a 4°C, siguieron almacenadas en dichos sistemas para observar el efecto de la A_w y la temperatura

(4°C y 25°C) durante el almacenamiento, siguiendo la evolución de la viabilidad cada mes. Cabe aclarar que las muestras almacenadas a 25°C primero fueron deshidratadas a la Aw correspondiente a 4°C y después almacenadas a 25°C, para disminuir el efecto de la temperatura y riesgos de contaminación durante la deshidratación.

Los resultados del efecto de la Aw y la temperatura (4°C y 25°C) sobre la vida de anaquel de las esporas de *T. harzianum* a 75 días se muestran en las **Figuras 6.13 y 6.14** respectivamente.

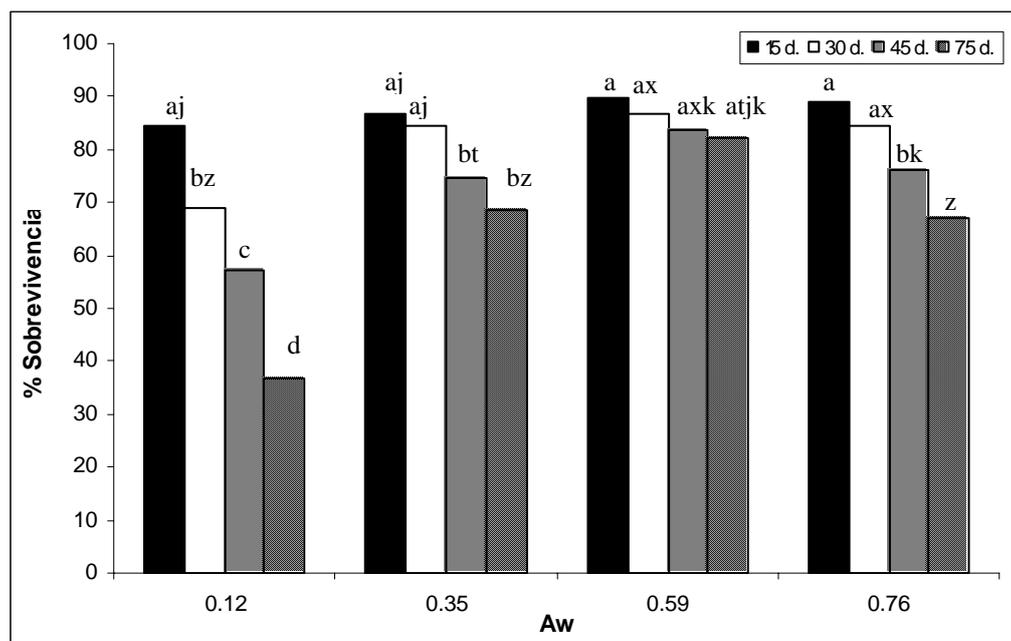


Figura 6.13. Efecto de la Aw sobre la vida de anaquel de muestras almacenadas a 4°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Las muestras almacenadas a 4°C a diferentes Aw por 75 días presentaron una disminución significativa de la viabilidad, expresada como porcentaje de sobrevivencia, a valores de Aw de 0.12, 0.35 y 0.76, comparadas con la muestra almacenada a Aw de 0.59. Las muestras almacenadas a 25°C mostraron una tendencia similar a las de 4°C pero con un máximo de sobrevivencia a una Aw de 0.32 (**Figura 6.14**).

Comparando la sobrevivencia de las muestras a las dos temperaturas de almacenamiento puede observarse también que una sobrevivencia máxima del 82% fue mantenida cuando las células fueron almacenadas a 4°C a una Aw de 0.59 y que la sobrevivencia máxima a 25°C (60%) fue obtenida cuando las células fueron almacenadas a una Aw de 0.32.

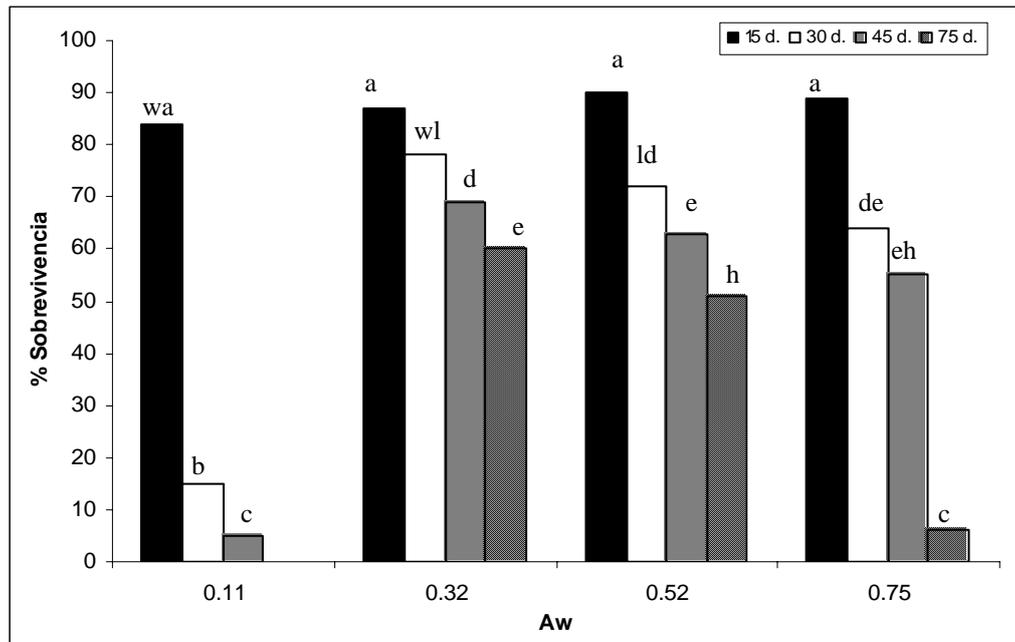


Figura 6.14. Efecto de la Aw sobre la vida de anaquel de muestras almacenadas a 25°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una p = 0.05.

Obteniendo las pendientes de los gráficos anteriores a cada una de las Aw's de almacenamiento pueden estimarse las velocidades de pérdida de sobrevivencia para cada Aw y temperatura de almacenamiento, las cuales se muestran en la **Figura 6.15**. En esta figura se puede apreciar mejor la pérdida de viabilidad bajo las condiciones de almacenamiento (temperatura y Aw), en las cuales se observa una velocidad de muerte mayor cuando la Aw de almacenamiento se encuentra en valores de Aw de 0.1 ó 0.7 y cuando la temperatura de almacenamiento es de 25°C.

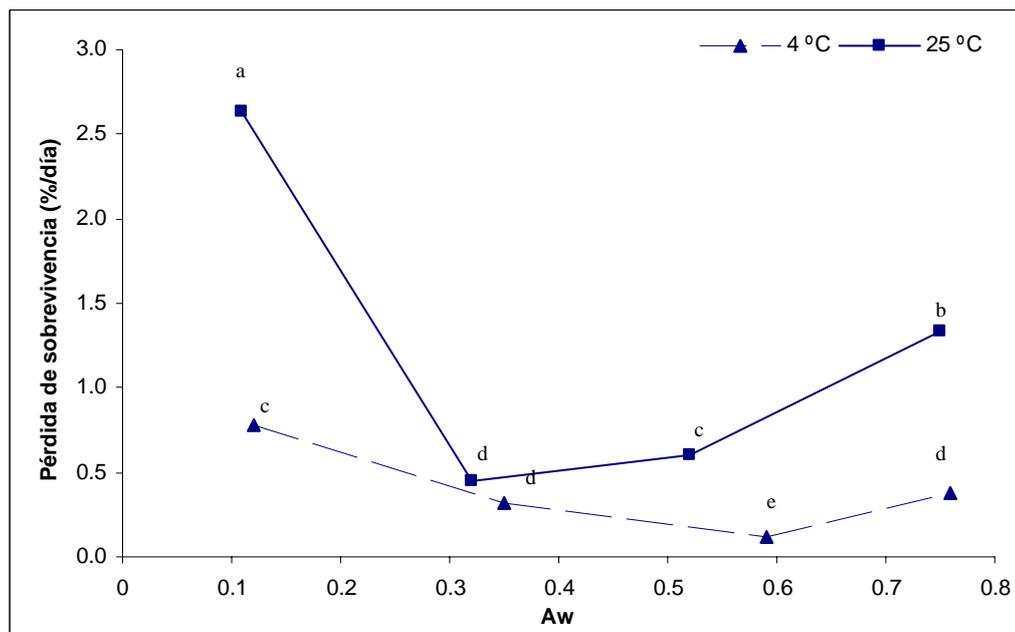


Figura 6.15. Pérdida de sobrevivencia por día en función de la Aw de almacenamiento a 4°C y 25°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa a una p= 0.05.

Nuestros resultados concuerdan con Elzein *et al.* (2004) quienes estudiaron, en formulaciones en forma de gránulos, los efectos de la temperatura, tamaño de gránulo y actividad de agua sobre la viabilidad de propágulos (conidios) desarrollados en una formulación denominada “Pesta” de *Fusarium oxysporum* (un potencial micoherbicida) durante el almacenamiento. Ellos encontraron, en muestras formuladas y almacenadas a tres distintas Aw de almacenamiento (0.12, 0.41 y 0.62) y a dos distintas temperaturas (4 y 25°C), una elevada vida de anaquel cuando las células fueron almacenadas a una Aw de 0.12 a 25°C; mientras que a 4°C se retuvo una elevada viabilidad cuando fueron almacenadas a una Aw de 0.62, siendo mayor esta viabilidad que la obtenida a 25°C, concluyendo que la temperatura fue el más importante factor abiótico que afectó la vida de anaquel de este formulado.

Montazeri y Greaves (2002) demostraron que las mejores condiciones de almacenamiento para conidios de *Colletotricum truncatum* fueron una Aw de 0.15 y 15°C utilizando varias temperaturas (15, 5 y -10 °C) y después de 115 días de almacenamiento, siendo el porcentaje de germinación del 91 %. Cuando la Aw fue cambiada a 0.3 manteniendo la temperatura a 15 °C, el porcentaje de germinación disminuyó drásticamente hasta casi el 0%.

También, se ha determinado que una humedad relativa del 11% es la óptima para preservar muestras deshidratadas de *Lactobacillus rhamnosus* a temperatura ambiente (25°C ó 37 °C), siendo la pérdida de viabilidad mayor a la más alta temperatura como es esperado (Ananta *et al.*, 2005).

Magalhaes y Boucias (2004) almacenaron durante 135 y 176 días conidios de *M. anisopliae* en una cámara de secado con una Aw de 0.05 a temperatura ambiente y observaron que la viabilidad decreció a un 72.5 y 28.5% respectivamente, en contraste con conidios frescos mantenidos en bolsas de plástico selladas a temperatura ambiente por 52 días, los cuales fueron inactivos (<10 % de viabilidad). Ellos observaron el mismo fenómeno que nosotros, es decir, utilizando Aw's de almacenamiento bajas es posible prolongar la vida de anaquel de conidios a temperatura ambiente o mayor a ésta.

El hecho de que en éste estudio con esporas de *T. harzianum*, la mejor Aw de almacenamiento, a temperatura ambiente (25°C), sea de 0.328 con una correspondiente humedad de 0.081 g agua g⁻¹ s.s. se relaciona con el valor de monocapa calculado por la ecuación de GAB a 25°C (0.066 g agua g⁻¹ s.s.). Como es reportado por varios autores, muchos productos biológicos son muy estables cuando estos se almacenan con una humedad igual al valor de monocapa. En este caso la humedad de las muestras estuvo ligeramente arriba del valor de monocapa (1.2 valores de monocapa) y podría asumirse que tal estabilidad es alcanzada por el efecto protector de la

monocapa, la cual evita reacciones enzimáticas, de Maillard y de oxidación en sistemas biológicos (Fennema, 1996). Así, para esta temperatura de almacenamiento (25°C) la A_w óptima sería de 0.24 (A_w de la monocapa) o también se podría expresar en términos de humedad de monocapa (0.066 g agua g⁻¹ s.s.).

En el caso de las muestras almacenadas a 4°C donde la mejor A_w de almacenamiento fue de 0.59 (0.155 g agua g⁻¹ s.s.) y el valor de monocapa determinado por GAB fue 0.072 g agua g⁻¹ s.s. (A_w de 0.23), la mejor estabilidad biológica se obtuvo en este caso al doble del valor de la monocapa (2.15 valores de monocapa). En este último caso, donde la mayor estabilidad se obtuvo a mayores valores de A_w y monocapa, pudo deberse al efecto de la temperatura (4°C) donde más moléculas de agua pueden ser adsorbidas alrededor de grupos hidrofílicos de carbohidratos y proteínas al tener más capacidad de ligar moléculas de agua a bajas temperaturas (Jayaraj *et al.*, 2006), sin promover daños enzimáticos o por difusión de moléculas reactivas debido a la limitación de movimiento molecular a esta temperatura. Como es propuesto por algunos autores, existe una reducción en adsorción de moléculas de agua en péptidos con un incremento de temperatura debido a una reducción en la exposición de grupos polares (Jayaraj *et al.*, 2006). También Mihoubi y Bellagi (2006) reportan que una reducción en el número de grupos polares en biomoléculas es observado debido a cambios físicos y químicos inducidos por temperatura.

La mayor humedad de almacenamiento encontrada para estas esporas a 4°C puede explicarse, por la mayor cantidad de agua que puede ser adsorbida a bajas temperaturas por los efectos que se mencionaron antes. Por lo que las células almacenadas a 4°C fueron capaces de adsorber una mayor cantidad de agua que la predicha por la monocapa y mantener una alta viabilidad, aún a contenidos de humedad elevados (0.155 g agua g⁻¹ s.s.) restringiendo la movilidad molecular a estos contenidos de humedad por el efecto de la temperatura, inhibiendo seguramente muchas reacciones que pudieran causar daño a las mismas. Este mismo comportamiento se ha reportado en los casos mencionados anteriormente por Elzein *et al.* (2004) y por Magalhaes y Boucias (2004) en conidios pero sin relacionarlo con valores de humedad de monocapa. También en semillas y polen deshidratados; por ejemplo, Buitink *et al.* (1998) reportaron que el contenido óptimo de humedad para el almacenamiento de semillas y polen incrementa al disminuir la temperatura en un rango de prueba de 45°C a -5°C, también mostraron que la mínima movilidad molecular y la máxima estabilidad durante el almacenamiento de estas muestras ocurrió en un contenido de humedad casi igual en el mismo rango de temperaturas, por lo que es posible almacenar muestras con contenidos de humedad mayores a baja temperatura.

Otra teoría que nos ayudaría a explicar este comportamiento es la teoría de la transición vítrea, que aunque la temperatura de transición vítrea (T_g) de las esporas no fue determinada, es muy probable que la formación del estado vítreo tenga alguna contribución en la conservación de estas células. Recordando los diagramas de fase de distintas moléculas (**Figura 2.6**) y siendo los carbohidratos y proteínas los que se acumulan en altas concentraciones en el citoplasma principalmente, podría esperarse que la T_g del citoplasma tenga un comportamiento semejante a la T_g de estas moléculas, teniendo un decaimiento exponencial cuando la cantidad de agua aumenta. Así, dependiendo de la temperatura y de la humedad relativa (A_w) de almacenamiento se puede alcanzar el estado vítreo. Por la razón anterior cuando las células fueron almacenadas a 4°C es probable que pudieran estar en el estado vítreo a una mayor A_w (en este caso de 0.59) que las muestras a 25°C. En cambio cuando las células fueron almacenadas a 25°C, la A_w óptima a esta temperatura, forzosamente tuvo que disminuir (según los diagramas de fase) para poder encontrarse en el estado vítreo, en este caso a A_w de 0.328.

Con lo anterior podría explicarse la gran disminución de la viabilidad de las muestras almacenadas a 25°C y a A_w de 0.75, donde muy probablemente no se logró estar en el estado vítreo, además de haber una gran movilidad molecular y por lo tanto una mayor actividad metabólica debido al alto contenido de humedad y temperatura.

La observación de que las muestras a cualquier temperatura (4°C ó 25°C) a la A_w de almacenamiento de 0.1 tengan las mayores velocidades de muerte, es por el grado de deshidratación alcanzado, 0.055 g agua g⁻¹ s.s. y 0.049 g agua g⁻¹ s.s. respectivamente, los cuales estuvieron por debajo del valor de la monocapa estimado por la ecuación de GAB (0.072 y 0.066 g agua g⁻¹ s.s. respectivamente), y como es mencionado por varios autores, una menor estabilidad biológica es alcanzada al estar por debajo del valor de humedad de monocapa. Esta interpretación es apoyada por la observación que proteínas secadas a contenidos de agua abajo del 5-8% en base seca son desestabilizadas aun en cristales de carbohidratos (Bell *et al.*, 1995). Abajo del contenido de humedad de monocapa la oxidación de macromoléculas se encuentra entre las reacciones más comunes llevadas en sistemas biológicos y se mostrará más adelante su gran influencia en la viabilidad de las esporas. Buitink y Leprince (2004) han propuesto que a bajos contenidos de agua, moléculas como el oxígeno y radicales libres pueden difundir con más libertad a pesar de la presencia del estado vítreo, promoviéndose la oxidación de macromoléculas.

Otra causa que conlleva a la disminución de la viabilidad de microorganismos almacenados a baja A_w es el daño al DNA. Por ejemplo, Dose *et al.* (1992) observaron, usando electroforesis en geles de poliacrilamida y agarosa, que el DNA de esporas de *B. subtilis* expuestas a una A_w

cercana a 0 en una cámara de vacío fue dañado después de 3 semanas a estas condiciones, no siendo alterado el DNA cuando fueron expuestas al aire a una humedad relativa del 70 % (A_w 0.7) en el mismo tiempo. Ellos concluyeron que la deshidratación extrema (A_w cercana a 0) puede conducir a una acumulación de lesiones en el DNA. Aunque algunos sistemas celulares, particularmente en anhidrofitas, parecen ser capaces de reparar estas lesiones durante prolongadas exposiciones a vacío (por meses), lesiones adicionales al DNA, por ejemplo por radiaciones, pueden finalmente disminuir estos sistemas de reparación y permitir un decremento en la viabilidad de las células (Dose *et al.*, 1992).

6.7 Oxidación de lípidos durante el almacenamiento de esporas de *T. harzianum*

6.7.1 Determinación de oxidación de lípidos en muestras almacenadas a distintas A_w a 4°C

Después de hacer las determinaciones de viabilidad en las muestras almacenadas a 4°C a diferentes tiempos, a esas mismas muestras se les determinaron las concentraciones específicas de ERO y MDA. La concentración por gramo de espора de ERO en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 4°C se muestra en la **Figura 6.16**. La concentración específica de ERO en muestras antes de deshidratar fue de $2.5 \mu\text{m ERO g}^{-1}$ de espора.

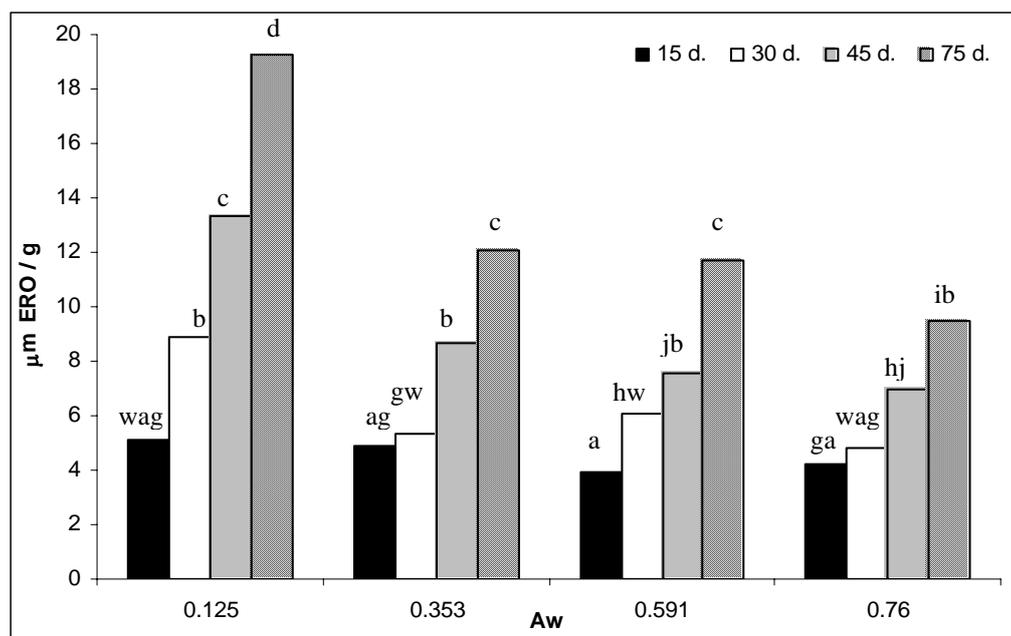


Figura 6.16. Concentraciones específicas de ERO en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 4°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Los resultados de la **Figura 6.16** muestran como a valores bajos de A_w de almacenamiento (0.125) se genera una mayor concentración específica de ERO conforme pasa el tiempo y, por lo tanto, una probable mayor oxidación de lípidos celulares, disminuyendo conforme la A_w de almacenamiento aumenta. Cabe mencionar que después de la deshidratación la concentración de ERO permaneció prácticamente constante en todas las condiciones de deshidratación desde la A_w de 0.1 hasta la de 0.76, debido a que esta medición refleja la concentración de ERO en ese instante, no un acumulado, porque las ERO tienen una vida media muy corta y reaccionan rápidamente con otras moléculas. Así, se puede observar una relación inversa entre la A_w de almacenamiento y la generación de ERO.

La concentración específica de ERO de esporas frescas (antes de la deshidratación) concuerda con el resultado encontrado por Savoie y Largeteau (2004) utilizando esporas de *Agaricus bisporus* cuya concentración fue de $3 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de espora.

Así mismo, se determinó la concentración específica de MDA que se muestra en función de la A_w y el tiempo de almacenamiento a 4°C en la **Figura 6.17**. La concentración específica de MDA en muestras antes de deshidratar fue de $0.0194 \mu\text{M MDA g}^{-1}$ de espora.

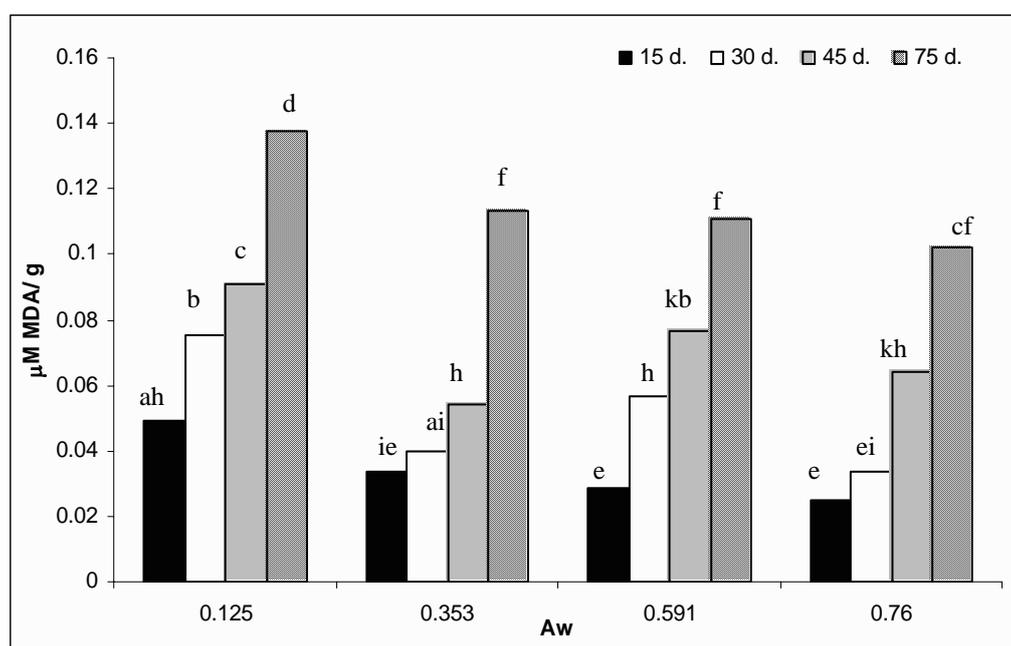


Figura 6.17. Concentraciones específicas de MDA en función de la A_w y tiempo de almacenamiento a 4°C . Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Nuevamente se observa que las mayores concentraciones específicas de MDA se encuentran cuando las células son almacenadas a la A_w más baja (0.125) y que estas concentraciones incrementan con el tiempo. Cuando las células son almacenadas en A_w mayores a 0.125, las

concentraciones específicas de MDA fueron menores aunque no diferentes significativamente entre sí a los 75 días.

Las concentraciones mayores obtenidas tanto de ERO como de MDA a la A_w de 0.125 podrían correlacionarse con que estas células fueron deshidratadas hasta una humedad ($0.055 \text{ g agua g}^{-1} \text{ s.s.}$) debajo del valor de la humedad de la monocapa ($0.072 \text{ g agua g}^{-1} \text{ s.s.}$) haciéndose más vulnerables a daño por oxidación. Por lo que este aumento en ERO y MDA podría deberse a la remoción de humedad de monocapa y a la mayor reactividad del oxígeno presente en las células, aunado con una posible reducción de la defensa antioxidante celular bajo estas condiciones de almacenamiento. Lo anterior es apoyado por las evidencias que mencionan Aguilera y Karel (1997) de que reacciones de oxidación a nivel celular son aceleradas abajo del valor de humedad de monocapa.

6.7.2 Determinación de oxidación de lípidos en muestras almacenadas a distintas A_w a 25°C

Los resultados de las concentraciones específicas de ERO y MDA de las muestras almacenadas a 25°C se muestran en las **Figuras 6.18 y 6.19** respectivamente. En estas, se muestra una tendencia similar a las almacenadas a 4°C, con la diferencia de que las concentraciones específicas de ERO a los 75 días no se pudieron cuantificar a las A_w 's de 0.11 y 0.75 debido a que la técnica requiere de la presencia de esterasas para poder desesterificar la molécula y así ser oxidada a DCF que es fluorescente (**Figura 5.1**). Por lo tanto, al decrecer mucho la viabilidad a los 75 días a estas A_w (0.11 y 0.75) no fue posible determinar de manera real y correcta las concentraciones de ERO, debido muy probablemente a la pérdida de actividad esterasa intracelular de la célula por lisis celular (la cual fue vista) o desnaturalización de las enzimas. Aun así, puede apreciarse una relación inversamente proporcional entre la A_w de almacenamiento y la concentración específica de ERO conforme transcurre el tiempo.

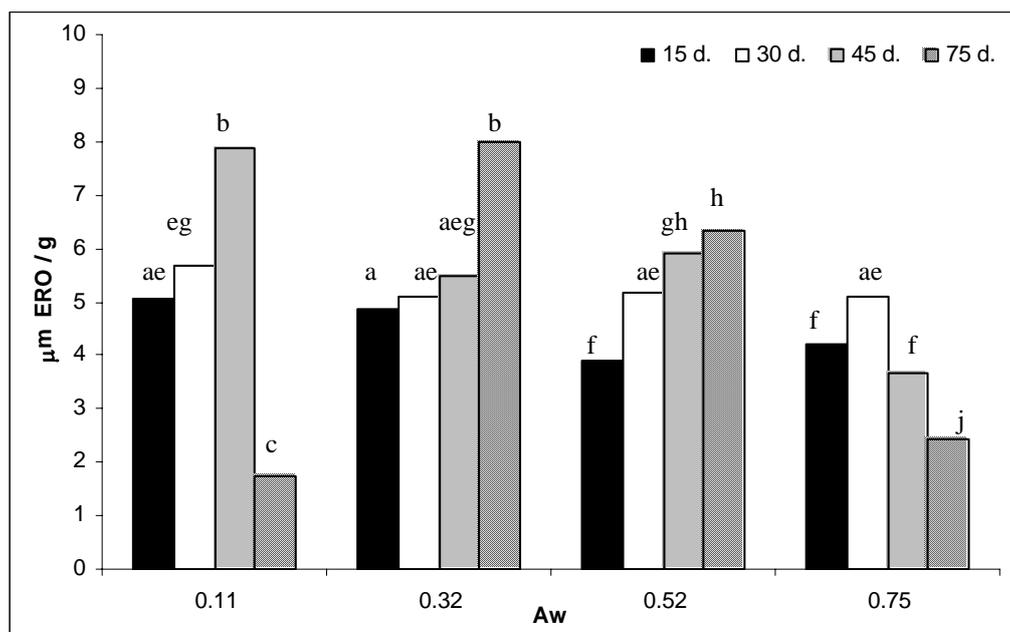


Figura 6.18. Concentraciones específicas de ERO en función de la Aw y tiempo de almacenamiento a 25°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Las concentraciones específicas de MDA a 25°C también muestran una tendencia inversamente proporcional con la Aw de almacenamiento, donde, a pesar de la baja viabilidad de las muestras almacenadas a Aw de 0.11 y 0.75 pudieron ser cuantificadas estas concentraciones.

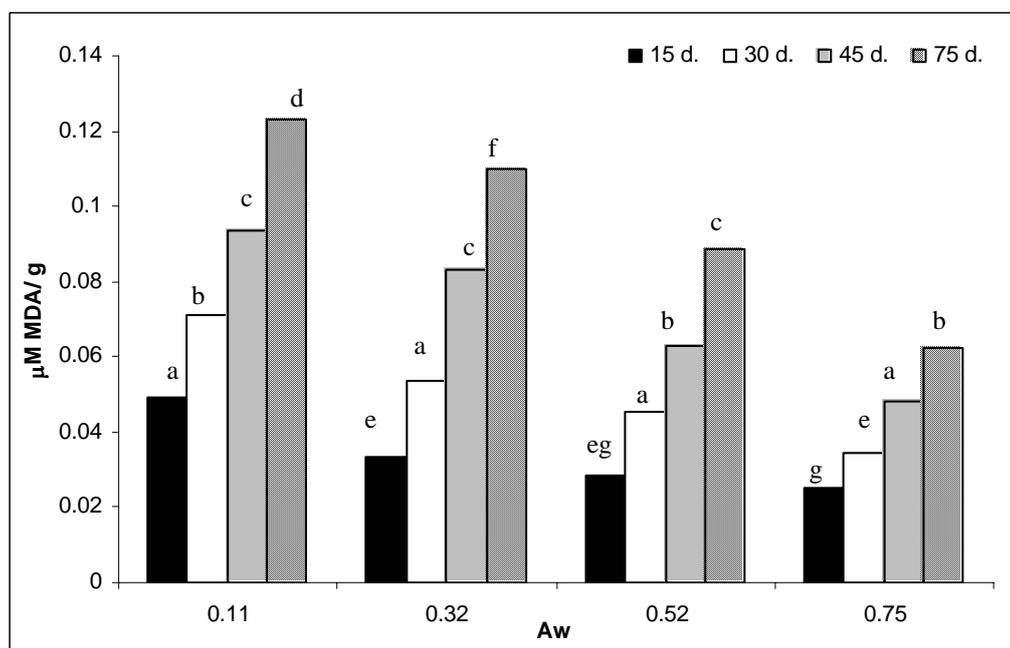


Figura 6.19. Concentraciones específicas de MDA en función de la Aw y tiempo de almacenamiento a 25°C. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Como es visto, la generación de MDA proveniente de la oxidación de macromoléculas celulares se promueve también a bajos valores de A_w durante el almacenamiento a 25°C, al igual que en las muestras almacenadas a 4°C; con la diferencia de que a 4°C, aparentemente, se promueve más la oxidación como lo indican las concentraciones más elevadas de ERO y MDA a los diferentes tiempos de prueba cuando se expresa por gramo de espina total. Estas observaciones se podrían explicar probablemente a que la respuesta celular antioxidante (enzimática y no enzimática) fuera mayor a 25°C que a 4°C, y por lo tanto a 25°C se encontraron menores concentraciones de estas moléculas oxidantes.

Nuevamente, se observa a 25°C una generación mayor de ERO y MDA cuando las células son almacenadas a la A_w más baja (0.11) que puede ser explicado nuevamente debido a la eliminación de agua hasta 0.049 g agua g^{-1} s.s. por debajo del valor de monocapa (0.066 g agua g^{-1} s.s.) a esta temperatura, dejando la superficie de las macromoléculas desprotegida y facilitando la reacción del oxígeno con éstas, por lo que aún si las células estuvieran en el estado vítreo, debajo de ciertos contenidos de humedad, la protección que este estado pudiera conferir a la célula con respecto a la reactividad del oxígeno sería limitada.

Existe evidencia de que especialmente bajo condiciones de déficit de agua en tejidos de plantas intolerantes a la desecación, radicales orgánicos son formados debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno (Oliver *et al.*, 2002). Hoekstra *et al.* (2001) proponen, en el caso de una reducida hidratación, que cambios conformacionales causen disfunción en enzimas de cadenas transportadoras de electrones, lo cual conduce a la acumulación de radicales libres y oxidación de lípidos, desnaturalización de proteínas y mutación de DNA.

Por otro lado, existe la posibilidad de que no solamente sean las ERO quienes causen desesterificación de lípidos de membrana, sino que también algunas enzimas tengan alguna contribución y peso específico en el deterioro de membranas en condiciones de anhidrobiosis. Tal es el caso de enzimas, como las fosfolipasas A_2 y C, que en condiciones de bajo contenido de humedad han demostrado tener actividad y contribuir en la liberación de ácidos grasos de membrana (Oliver *et al.*, 2002). La presencia de disacáridos, necesaria para la protección de la estructura de la membrana, no inhibe la actividad enzimática de estas fosfolipasas, aunque debido a los bajos contenidos de agua en células deshidratadas, la degradación mediada por radicales libres parece ser el más probable candidato de la desesterificación de lípidos (Crowe *et al.*, 2002).

6.8 Vida de anaquel de las esporas en función de las concentraciones de ERO y MDA a diferentes temperaturas

Para una mejor apreciación del efecto de la oxidación sobre la sobrevivencia de las esporas, en las Figuras 6.20 y 6.21 se muestra la relación que existe entre la sobrevivencia de las esporas y las concentraciones de ERO y MDA por gramo de espora viable a las dos temperaturas (4°C y 25°C), después de 75 días de almacenamiento.

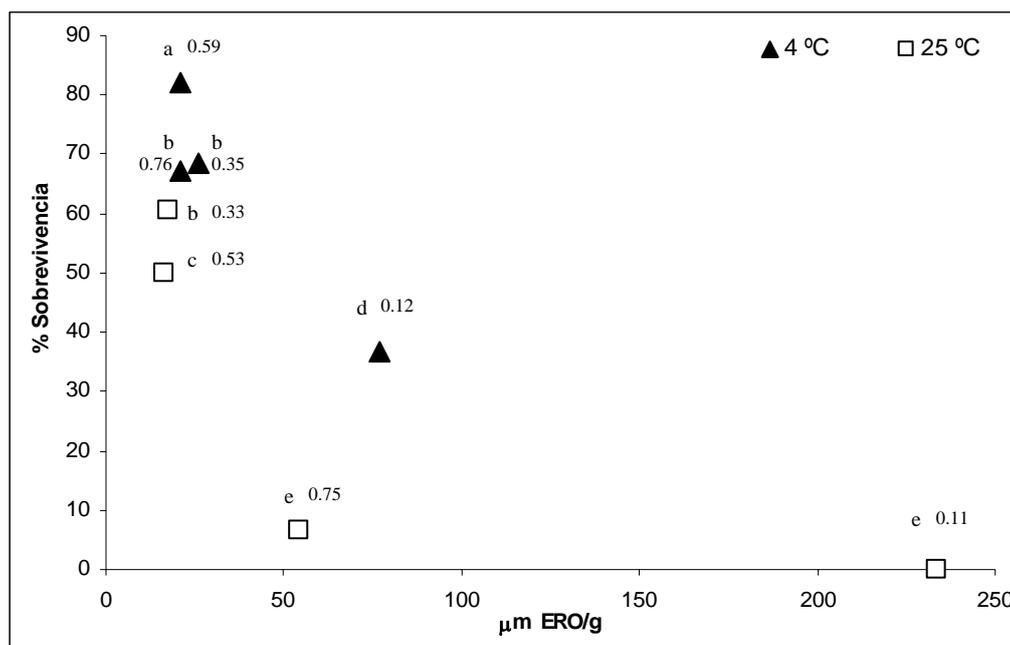


Figura 6.20. Sobrevivencia en función de la concentración específica de ERO a 4°C y 25°C después de 75 días de almacenamiento. Los números a los lados de las figuras indican los valores de A_w . Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

La Figura 6.20 muestra que en el caso de las muestras almacenadas a 4°C la concentración de ERO tiene una relación inversamente proporcional con la A_w de almacenamiento, excepto a A_w de 0.76. Existe también una relación inversamente proporcional de la viabilidad de las muestras con la concentración de ERO para el rango de A_w de 0.12 a 0.59, excepto para la muestra almacenada a una A_w de 0.76.

Para las muestras almacenadas a 25°C no se puede apreciar una relación inversa entre la A_w de almacenamiento y la concentración de ERO tan clara como a 4°C en el rango de A_w de 0.11 a 0.53, sin embargo, con respecto a la sobrevivencia se aprecia una relación inversa, obteniéndose la menor sobrevivencia cuando la concentración de ERO es la mayor y la A_w de

almacenamiento es 0.11. Bajo estas condiciones se producen más ERO y, por lo tanto, se esperaría más estrés oxidativo y muerte celular.

La relación entre la sobrevivencia y las concentraciones de MDA (**Figura 6.21**) a 4°C es parecida a la relación de ERO con la misma, una relación inversamente proporcional en el rango de A_w de 0.59 a 0.12 con excepción de la muestra almacenada a A_w de 0.76 donde nuevamente al parecer no solamente la oxidación tiene un efecto sobre la viabilidad sino que seguramente otras reacciones de naturaleza no oxidativa tienen lugar, afectando la sobrevivencia de las células. Lo anterior es mejor visto con la misma muestra (A_w de 0.75) a 25°C.

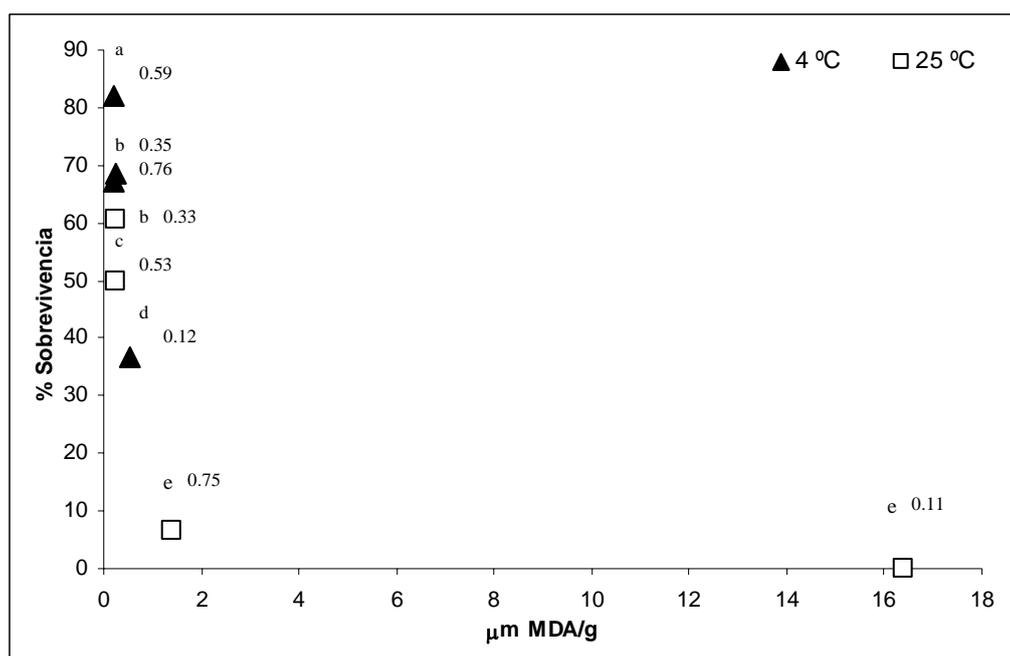


Figura 6.21. Sobrevivencia en función de la concentración específica de MDA a 4°C y 25°C después de 75 días de almacenamiento. Los números a los lados de las figuras indican los valores de A_w . Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

La sobrevivencia a 25°C muestra una relación inversa con la concentración de MDA de las esporas obteniéndose la menor sobrevivencia cuando la concentración de MDA fue la mayor, lo que muestra la toxicidad de esta molécula en la célula. La relación de la A_w de almacenamiento y la concentración de MDA no es clara dado que en el rango de A_w de 0.53 a 0.11 se creería que sigue una relación inversa; sin embargo, esto no se cumple de la misma manera cuando se relaciona la sobrevivencia con la concentración de MDA porque cuando las muestras fueron almacenadas a A_w de 0.53 se obtuvo la menor concentración de MDA y no así la mayor sobrevivencia, mientras que a A_w de 0.75 la sobrevivencia fue muy baja y la concentración de MDA no fue elevada, lo que nos reafirma que a esta A_w (0.75) otros factores influyen en la muerte celular además de la oxidación de lípidos.

6.9 Efecto de la A_w de deshidratación y A_w y temperatura de almacenamiento sobre la vida de anaquel de las esporas

Para observar el efecto conjunto que tiene la A_w de deshidratación y de almacenamiento sobre la viabilidad de las muestras y la oxidación de lípidos, las muestras deshidratadas previamente a una determinada A_w en sistemas cerrados a 4°C, fueron almacenadas a distintos valores de A_w tanto a 4°C como a 25°C. Las **Figuras 6.22 y 6.23** muestran los perfiles de sobrevivencia después de 60 días de almacenamiento en función de la A_w de deshidratación y almacenamiento a 4°C y 25°C respectivamente.

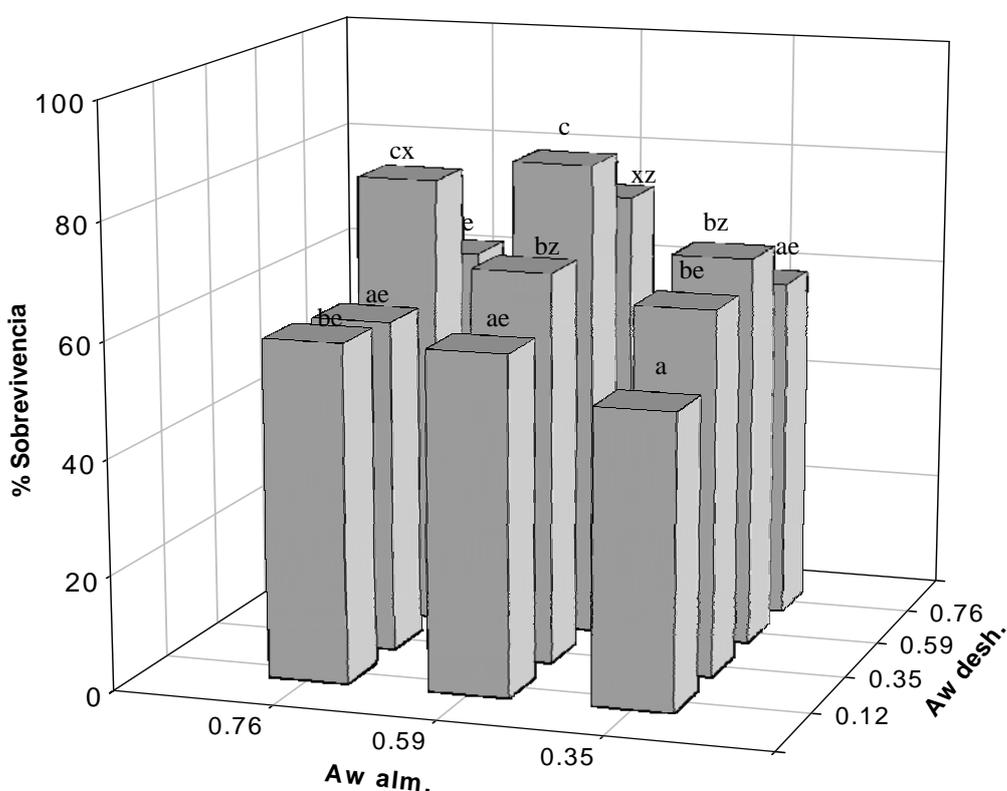


Figura 6.22. Sobrevivencia en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 4°C después de 60 días de almacenamiento. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

La **Figura 6.22** muestra que cuando las células son deshidratadas a una A_w de 0.59 y almacenadas a A_w 's de 0.5 y 0.7 a 4°C tiene como resultado una mayor sobrevivencia. Cuando son deshidratadas a A_w de 0.1 y almacenadas a A_w de 0.3 se presenta el más bajo valor de sobrevivencia, debido a la deshidratación alcanzada, no mejorándose la sobrevivencia incluso cuando la A_w de almacenamiento es 0.59. En general, los mayores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron a una A_w de almacenamiento de 0.59 que, como se observó anteriormente, es la A_w óptima de almacenamiento probada a 4°C. En contraste, en la **Figura 6.23** se observa que el

mayor valor de sobrevivencia a 25°C ocurre cuando las células son almacenadas a una A_w de 0.32, al parecer no importando la A_w de deshidratación, cuando ésta fue de 0.35 a 0.76.

Como en los casos anteriores, estas diferencias entre las mejores condiciones de almacenamiento, dependiendo la temperatura y A_w , pueden ser explicadas por efecto de la humedad de monocapa y con la teoría de la transición vítrea, las cuales se discutieron anteriormente.

La **Figura 6.23** muestra como una A_w de almacenamiento de 0.75 es perjudicial para las células, independientemente del grado de deshidratación alcanzado previamente (quizá por la gran movilidad y difusión molecular dentro de la célula) y, que deshidratando las células a una A_w de 0.12 decrece la sobrevivencia de las esporas aún si son almacenadas a la A_w de 0.32 (A_w óptima para los demás grados de deshidratación). Esto, probablemente debido al nivel de deshidratación alcanzado ($0.0554 \text{ g agua g}^{-1} \text{ s.s.}$) y al daño provocado por esta condición que, probablemente, durante el almacenamiento a A_w de 0.32 fue incapaz de reparar.

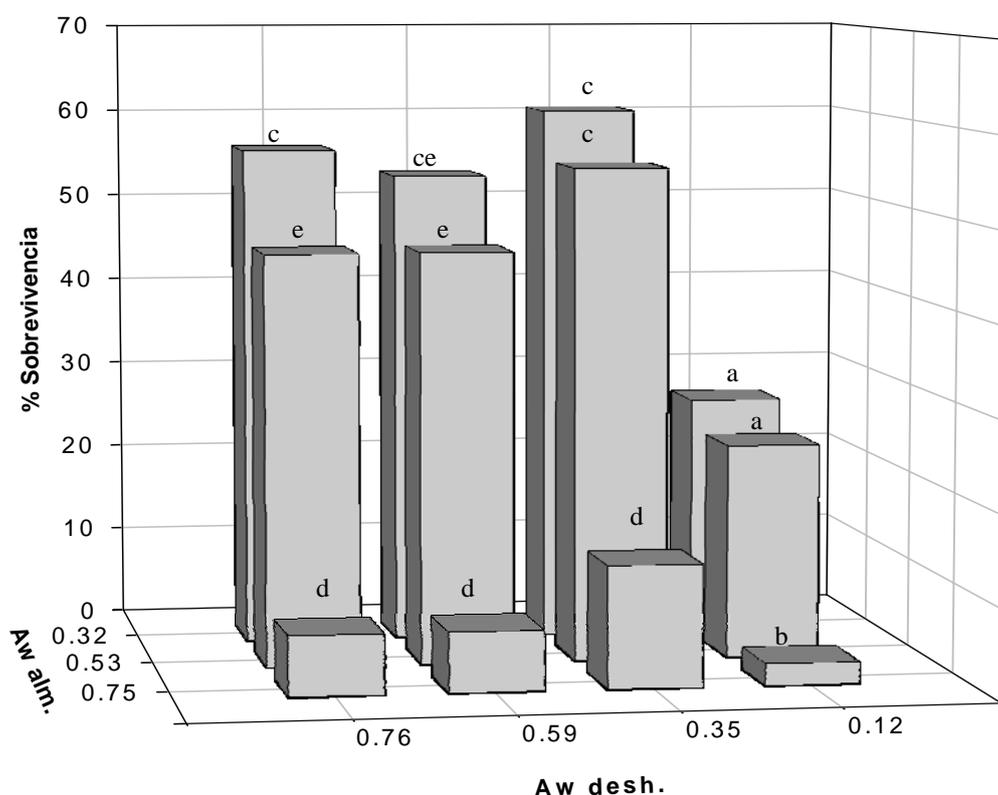


Figura 6.23. Sobrevivencia en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 25°C después de 60 días de almacenamiento. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

La **Figura 6.24** muestra micrografías electrónicas de muestras almacenadas a 25°C durante 60 días a distintas Aw, donde se observaron claras diferencias en la sobrevivencia de las esporas para tratar de explicar lo que pudo ocurrir bajo estas condiciones. En la **Figura 6.24** se observa como las muestras almacenadas a una Aw de 0.32, con la mayor sobrevivencia (B), conservaron su forma e integridad de la membrana comparadas con la muestra fresca (A); mientras que las células almacenadas a Aw de 0.52, con sobrevivencia intermedia (C), mostraron ligeras pero apreciables diferencias en su forma y contorno, además de presentar una pared celular más delgada y una estructura interna desordenada comparada con la muestra fresca. Las células almacenadas a 0.76 de Aw (D) tuvieron la más baja sobrevivencia y mostraron una estructura celular deformada presentando lisis celular o probablemente inicios de germinación pero sin desarrollo miceliar, lo que provocó la disminución de la viabilidad, debido a la elevada humedad de las muestras y la temperatura de almacenamiento (25°C), provocando una mayor actividad intracelular.

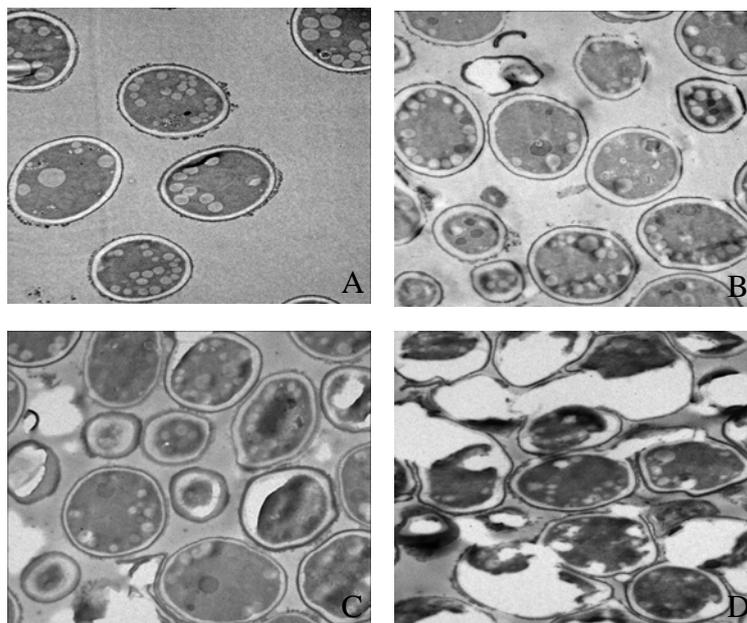


Figura 6.24. Micrografías electrónicas de esporas almacenadas por 60 días a diferentes Aw a 25°C; con 7×10^3 veces de aumento. **A)** Muestra fresca (Aw 0.99); **B)** muestra almacenada a Aw 0.32; **C)** muestra almacenada a Aw 0.52 y **D)** muestra almacenada a Aw 0.75.

6.10 Efecto de la A_w de deshidratación y A_w y temperatura de almacenamiento en la generación de MDA en las esporas

A las muestras anteriores se les determinó la concentración específica de MDA después de 60 días de almacenamiento en función de la A_w de deshidratación y almacenamiento a 4°C y 25°C respectivamente.

La **Figura 6.25** muestra como las concentraciones más bajas de MDA se encuentran principalmente cuando las células son almacenadas a valores de A_w de 0.59 a excepción de cuando estas mismas muestras fueron deshidratadas a A_w de 0.12 y, también cuando las células son deshidratadas a A_w de 0.76 y almacenadas a cualquier A_w , aunque la sobrevivencia en estas muestras no sea la más alta. Lo que se puede resaltar de este resultado es que cuando las células son deshidratadas y mantenidas a una A_w de 0.76, la disminución de la sobrevivencia en estas muestras no es debida principalmente a la oxidación, como sería el caso en las muestras deshidratadas a una A_w de 0.12 y mantenidas a una A_w de 0.35, donde se tiene la mayor concentración de MDA y la menor sobrevivencia.

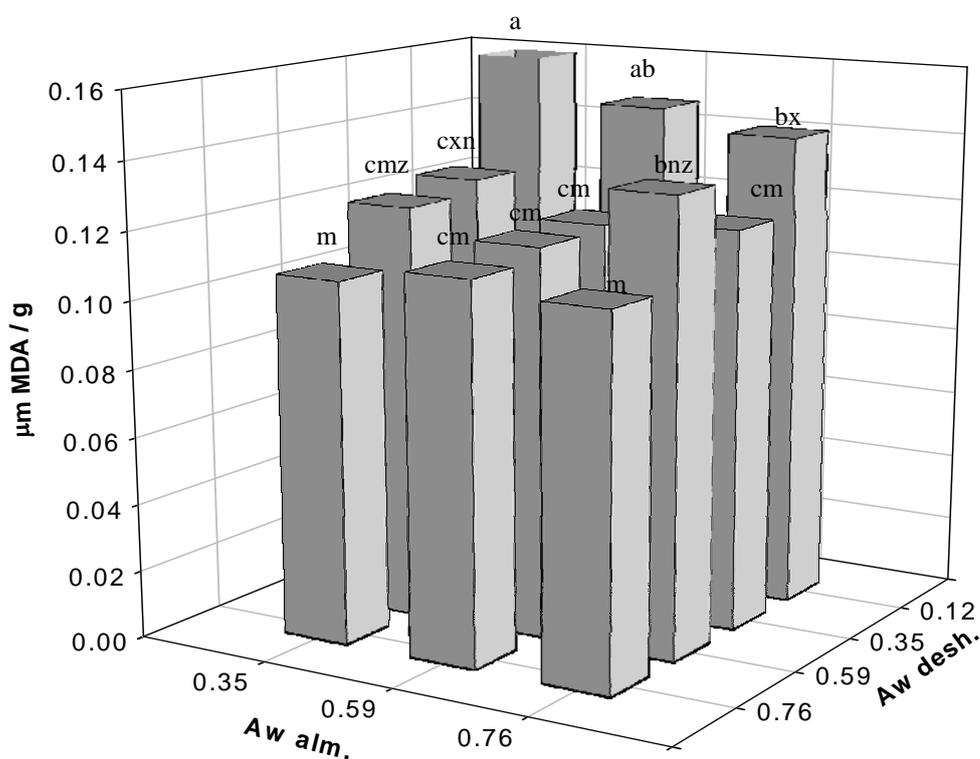


Figura 6.25. Concentración específica de MDA en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 4°C después de 60 días de almacenamiento. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

Las concentraciones de MDA obtenidas para las muestras almacenadas a 25°C (**Figura 6.26**) muestran que la mayor concentración de MDA se encuentra cuando las células son deshidratadas y mantenidas a una A_w de 0.3, como se había visto anteriormente. Con estos resultados es difícil explicar tal comportamiento cuando las células son almacenadas a 25°C, pues a las más elevadas concentraciones de MDA se obtienen porcentajes de sobrevivencia elevados. Sin embargo, cabe hacer notar que las concentraciones de MDA a 25°C son menores que las determinadas a 4°C, probablemente porque la respuesta celular antioxidante es mayor a esta temperatura, lo que pudiera permitir porcentajes de sobrevivencia del 60%, a costa de un mayor gasto de energía para contrarrestar el estrés oxidativo generado bajo estas condiciones de almacenamiento.

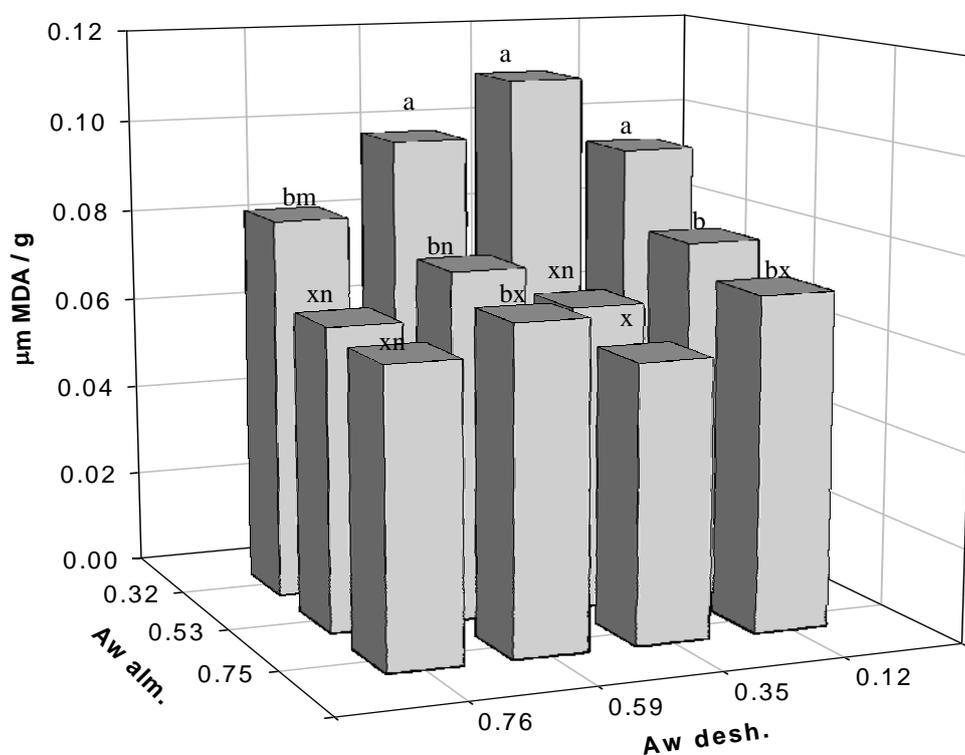


Figura 6.26. Concentración específica de MDA en función de la A_w de deshidratación y de almacenamiento a 25°C después de 60 días de almacenamiento. Mismos subíndices indican que no hay diferencia significativa entre las muestras a una $p = 0.05$.

VII. Conclusiones

En este trabajo, con respecto a los factores que intervienen durante el secado de las esporas, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Esporas de *T. harzianum* producidas en medio líquido presentan una mayor sensibilidad a la temperatura que aquellas esporas de microorganismos termorresistentes.
- La deshidratación *per se*, no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de las esporas, después de que ésta se lleva a cabo.
- Durante el secado por aspersión de las esporas, la temperatura de entrada y salida del secador tienen un mayor efecto sobre la viabilidad que el grado de deshidratación alcanzado, expresado como A_w .

Referente a los factores que afectan la vida de anaquel de las esporas se concluye que:

- La A_w óptima de almacenamiento de las esporas, en la cual se presenta una mayor sobrevivencia, es función inversa de la temperatura de almacenamiento y pudiera explicarse por la teoría de la transición vítrea.
- El contenido de humedad óptimo de almacenamiento de las esporas a 25°C es semejante al valor calculado de humedad de monocapa, donde se esperaría la mayor estabilidad de las esporas.
- No es favorable la deshidratación de muestras a A_w de 0.1 (por debajo del valor de monocapa) y su consecuente almacenamiento a A_w 's bajas (menores a 0.3) ya que presentan la menor sobrevivencia durante el almacenamiento a 4°C y 25°C.
- Una mayor oxidación de lípidos determinado por la generación de ERO y MDA se presenta cuando las esporas son almacenadas a una A_w baja (0.1) o alrededor del 5% de humedad a ambas temperaturas, pudiéndose deber a la eliminación de agua por debajo del valor de monocapa.
- El decremento de la viabilidad durante el almacenamiento a 4°C y 25°C puede ser relacionado con el incremento de las [ERO] y [MDA] a A_w 's debajo de 0.7, existiendo una relación inversa con la A_w de almacenamiento.
- La oxidación de lípidos no parece ser el mecanismo principal por el cual, muestras almacenadas a una A_w mayor de 0.7 pierdan su viabilidad. Es probable que otras reacciones de carácter no oxidativo sean las que disminuyan la viabilidad de estas muestras.

VIII. Perspectivas

A continuación se presentan algunas recomendaciones para mejorar la estabilidad de las esporas durante el secado y obtener así una aceptable viabilidad y vida de anaquel.

- Utilizar agentes termoprotectores para reducir la termosensibilidad de las esporas, o probar disminuyendo la A_w del medio de calentamiento si es posible aumentar la resistencia a la temperatura de las esporas.
- Realizar un estudio detallado del efecto de la velocidad de deshidratación en tiempos tan cortos como segundos para determinar una posible relación entre la velocidad de secado y la sobrevivencia de microorganismos.
- Realizar formulados en los que se incluyan antioxidantes para evitar que se lleve a cabo la oxidación de moléculas biológicas a nivel celular, además de evaluar variables de proceso y metodologías de secado, como secado por lecho fluidizado, para obtener productos con una mayor vida de anaquel.
- Determinar la temperatura de transición vítrea de las esporas de *T. harzianum* a diferentes contenidos de humedad y ver su posible correlación con la mayor estabilidad de las esporas durante el almacenamiento.
- Evaluar la relación entre la temperatura y el grado de deshidratación sobre la actividad metabólica y respuesta celular para un mejor entendimiento de los fenómenos que causan una baja viabilidad de las esporas.

IX. Bibliografía

- Abadias, M., Teixidó, N., Usall, J., Viñas, I., and Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol agent *Candida sake*. **Journal of Applied Microbiology**, 89: 1009-1017.
- Agosin, E. and Aguilera, J.M. (1998). Industrial production of active propagules of *Trichoderma* for agricultural uses. In: **Trichoderma & Gliocladium. Vol. 2: Enzymes, biological control and commercial applications**. G.E. Harman and C.P. Kubicek (eds.). Taylor & Francis Ltd, Bristol, USA. pp. 205-228.
- Aguilera, J.M. and Karel, M. (1997). Preservation of biological materials under desiccation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 37(3): 287-309.
- Ananta, E., Volkert, M. and Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, 15: 399-409.
- Batta, Y.A. (2004). Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. **International Journal of Food Microbiology**, 96: 281-288.
- Bayrock, D. and Ingledew, W. M. (1997). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. **Food Research International**, 30: 417-425.
- Beker, M.J. and Rapoport, A.I. (1987). Conservation of yeast by dehydration. **Advances in Biochemical Engineering**, 35: 127-171.
- Belanger, R., Dufour, N., Caron, J., and Benhamou, N. (1995). Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, 5: 41-54.
- Bell, L.N., Hageman, M.J. and Muraoka, L.M. (1995). Thermally induced denaturation of lyophilized bovine somatotropin and lysozyme as impacted by moisture and excipients. **Journal of Pharmaceutical Science**, 84: 707-712.
- Billi, D. and Potts, M. (2002). Life and death of dried prokaryotes. **Research in Microbiology**, 153: 7-12.
- Blaszyk, M., Blank, G., Holley, R., and Chong, J. (1998). Reduced water activity during sporogenesis in selected penicillia: impact on spore quality. **Food Research International**, 6: 503-509.
- Brunauer, S., Emmet, P.H. and Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemical Society**, 60:309-320.
- Buitink, J., Claessens, M.M.A.E., Hemminga, M.A. and Hoekstra, F.A. (1998). Influence of water content and temperature on molecular mobility and intracellular glasses in seeds and pollen. **Plant Physiology**, 118:531-541.
- Buitink, J. and Leprince, O. (2004). Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. **Cryobiology**, 48: 215-228.
- Burke, M.J. (1986). The vitreous state and survival of anhydrous biological systems. In: **Membranes Metabolism and Dry Organisms**. Leopold, A.C. (ed). Ithaca, NY: Cornell University Press; 1986:358-364.
- Carpenter, J.F., Martin, B., Crowe, L.M. and Crowe, J.H. (1987). Stabilization of phosphofructokinase during air-drying with sugars and sugar/transition metal mixtures. **Cryobiology**, 24 : 455-464.
- Caurie, M. (1981). Derivation of full range moisture isotherms. In: **Water activity: influences on food quality**. L.B. Rockland and G.F. Stewart (Eds.), New York: Academic Press. pp. 63-87.
- Champagne, C.P., Gardner, N., Brochu, E. and Beaulieu, Y. (1991). The freeze drying of lactic bacteria. A review. **Canadian Institute of Food Science and Technology**, 24:118-128.
- Chet, I. and Ibar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 48: 37-43.

- Chet, I., Ibar, J. and Hadar, I. (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. **In: Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. Wicklow DT and Soderstrom B, (eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
- Cerruti, P., Segovia de Huergo, M., Galvagno, M., Schebor, C. and Buera, M.P. (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. **Applied Microbial Biotechnology**, 54: 575-580.
- Charnley, A.K. (1991). Microbial pathogens and insect pest control. **Letters in Applied Microbiology**, 12:149-157.
- Chen, T., Fowler, A. and Toner, M. (2000). Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. **Cryobiology**, 40: 277-282.
- Chet, I. (1987). *Trichoderma* - Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. **In: Innovative Approaches to Plant Disease Control**. I. Chet and John Wiley, Eds. New York, pp. 137-160.
- Chio, K.S. and Tappel, A.L. (1969). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and aminoacids. Products of malonaldehyde and aminoacids. **Biochemistry**, 8: 22821-2832.
- Chirife, J., and Iglesias, H.A. (1978). Equations for fitting water sorption isotherms of foods: Part I a review. **Journal of Food Technology**, 13: 159-174.
- Constantino, H.R., Curley, J.G. and Hsu, C.C. (1997). Determining the water sorption monolayer of lyophilized pharmaceutical proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 86 (12): 1390-1393.
- Cook, R.S. and Baker, K.F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogenus. **The American Phytopathological Society**, St. Paul, MN. pp. 539.
- Coroller, L., Leguérinel, I. and Mafart, P. (2001). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 317-322.
- Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1982). Induction of anhydrobiosis: membrane changes during drying. **Cryobiology**, 19: 317-328.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. (1992). Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, 54: 579-599.
- Crowe, L.M., Reid, D.S. and Crowe, J.H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials?. **Biophysical Journal**, 71: 2087-2093.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F. and Crowe, L.M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, 60: 73-103.
- Crowe, L.M. (2002). Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 131: 505-513.
- Crowe, J.H., Oliver, A.E. and Tablin, F. (2002). Is there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis?. **Integrative and Comparative Biology**, 42: 497-503.
- de Souza Espindola, A., Silva Gomes, D., Dolly Panek, A. and Araujo Eleuterio, E.C. (2003). The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. **Cryobiology**, 47: 236-241.
- de Vrije, T., Antoine, N., Buitelaar, M., Bruckner, S., Dissevelt, M., Durand, A., Gerlagh, M., Jones, E.E., Lüth, P., Oostra, J., Ravensberg, W.J., Renaud, R., Rinzema, A., Weber, F.J. and Whipps, J.M. (2001). The fungal biocontrol agent *Coniothyrium minitans*: production by solid-state fermentation, application and marketing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 56: 58-68.
- Dose, K., Bieger-Dose, A., Labusch, M. and Gill, M. (1992). Survival in extreme dryness and DNA-single-strand breaks. **Advances in Space Research**, 12 (4): 221-229.
- Elzein, A., Kroschel, J. and Müller-Stöver, D. (2004). Optimization of storage conditions for adequate shelf-life of Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* Foxy 2, a potential mycoherbicide for striga: effects of temperature, granule size and water activity. **Biocontrol Science and Technology**, (14) 6: 545-559.
- Esterbauer, H. and Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, 186: 407-421.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J. and Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, 11: 81-128.
- Ezziyyani, M., Pérez Sánchez, C., Sid Ahmed, A., Requena, M.E. and Candela, M.E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). **Anales de Biología**, 26: 35-45.
- Farrant, J.M., Cooper, K., Kruger, L.A. and Sherwin, H.W. (1999). The effect of drying rate on the survival of three desiccation-tolerant angiosperm species. **Annals of Botany**, 84: 371-379.
- Fennema, O.R. (1996). Water and ice. **In: Food Chemistry**. Owen R. Fennema (ed.), 3era. edición. Marcel Dekker Inc. pp. 30-56.
- Fillinger, S., Chaverroche, M.K., Dijck, P., Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J., and d'Enfert, C. (2001). Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**, 147: 1851-1862.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 43: 337-359.
- Fu, W. and Etzel, M.R. (1995). Spray drying of *Lactococcus lactis* sp. *lactis* C2 and cellular injury. **Journal of Food Science**, 60(1): 195-200.
- Gamboa, H. (2004). Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido. **Tesis de Maestría**. Programa de posgrado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- García de Castro, A., Bredholt, H., Strom, A.R. and Tunnacliffe, A. (2000). Anhydrobiotic engineering of gram-negative bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Sept. 2000, pp. 4142-4144.
- Gardiner, G., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M., Fitzgerald, G., Collins, J., Ross, R. and Stanton, C. (2000). Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**. 66(6): 2605-2612.
- Grant, W.D. (2004). Life at low water activity. **Philosophical Transactions. The Royal Society of London**, 359: 1249-1267.
- Hansberg Torres, W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XXVI. Depto. Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F., pp. 19-54.
- Harman, G.E., Latorre, B., Agosin, E., San Martín, R., Riegel, D.G., Nielsen, P.A., Tronsmo, A. and Pearson, R.C. (1996). Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot grape using *Trichoderma* sp. **Biological Control**, 7: 259-266.
- Henderson, S. (1952). A basic concept of equilibrium moisture. **Agricultural Engineering**, 33(1) 29-31.
- Herrera-López, J. Pérez-Jimenez, M., Llobel, A., Monte-Vázquez, E., and Zea-Bonilla, T. (1999). Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en aguacate. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, 5: 261-265.
- Hjeljord, L. G. and Tronsmo, A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. **In: Trichoderma and Gliocladium**, Vol 2, Harman, G.E., and Kubicek, eds., Taylor and Francis, London, pp. 131-151.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. and Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, 6 (9):431-438.
- Hong, T.D., Jenkins, N.E. and Ellis, R.H. (2000). The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, 104 (6): 662-665.
- Horaczek A. and Viernstein H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, 31:65-71.
- Hutter, W., Werner, L., Peter, I. and Hempel, W. (1995). Spray drying of the dehalogenating bacterium *Rhodococcus* sp. **Bioprocess Engineering**, 13:19-21.

- Jackson, A.T. (1991). **Process Engineering in Biotechnology**. Prentice Hall pp.12-20.
- Jayaraj Rao, K., Heartwin amala dhas, P., Magdaline Eljeeva Emerald F., Bikash Ghosh, C., Balasubramanyam, B.V. and Kulkarni, S. (2006). Moisture sorption characteristics of chhana podo at 5°C and 35°C. **Journal of Food Engineering**, 76:453-459.
- Jenkins, N.E. and Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents – assurance of product performance. **Biocontrol Science and Technology**, 10: 753-777.
- Jin, X., Harman, G.E. and Taylor, A.G. (1991). Conidial biomass and desiccation tolerance of *Trichoderma harzianum* produced at different medium water potentials. **Biological Control**, 1: 237-243.
- Jin, X., Taylor, G. and Harman, G.E. (1996). Development of media and automated liquid fermentation methods to produce desiccation-tolerant propagules of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, 7: 267-274.
- Jones, K.A. and Burgues, H.D. (1998). Technology of formulation and application. In: **Formulation of Microbial Biopesticides**. Burgues, H.D., Ed. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 7-30.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, 30(6): 620-650.
- Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Science and Technology**, 9:295-306.
- Larena, I., De Cal, M. and Melgarejo P. (2003) (a). Drying of *Epicoccum nigrum* conidia for obtaining a shelf-stable biological product against brown rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, 94:508-514.
- Larena, I., Melgarejo, P. and De Cal, A. (2003) (b). Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, 151: 600-606.
- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, 5, 227-231.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. and Crowe, L.M. (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, 61 (10): 3592-3597.
- Lewis, J.A. and Papavizas, G.C. (1983). Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma sp.* in liquid and solid growth media. **Soil Biology and Biochemistry**, 15(3): 351-357.
- Lievense, L.C., and van 't Riet, K. (1993). Convective drying of bacteria I. The drying process. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 50:45-63.
- Lodato, P., Segocia de Huerdo, M. and Buera, M.P. (1999). Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52:215-220.
- Louis, I. and Cooke, R.C. (1985). Conidial matrix and spore germination in some plant pathogens. **Transactions of the British Mycological Society**, 84: 661-667.
- Louis, I., Chew, A. and Lim, G. (1988). Influence of spore density and extracellular conidial matrix on spore germination in *Colletotricum capsici*. **Transactions of the British Mycological Society**, 91: 694-697.
- Magalhaes, B.P. and Boucias, D.G. (2004). Effects of drying on the survival of conidiospores of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* driver and milner. **Journal of Orthoptera Research**, 13(1): 155-159.
- Maltini, E., Torreggiani, D., Venir, E. and Bertolo, G. (2003). Water activity and the preservation of plant foods. **Food Chemistry**, 82: 79-86.
- Marchesi, E., Rota, C., Fann, Y.C., Chignell, C. F. and Mason, R.P. (1999). Photoreduction of fluorescent dye 2',7'- dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, 26:148-161.

- Martínez Navarrete, N., Andrés Grau, A.M., Chiralt Boix, A. and Fito Maupoey, P. (1999). Isotermas de sorción. **En: Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno**. 1era. edición. D.R., I.P.N., pp. 155-179.
- Mihoubi, D. and Bellagi, A. (2006). Thermodynamic analysis of sorption isotherms of bentonite. **Journal of Chemical Thermodynamics**, 38:1105-1110.
- Montazeri, M. and Greaves, M.P. (2002). Effects of culture age, washing and storage conditions on desiccation tolerance of *Colletotrichum truncatum* conidia. **Biocontrol Science and Technology**, 12: 95-105.
- Moraitis, C. and Curran, B.P.G. (2004). Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 21:313-323.
- Morgan, C.A., Herman, N., White, P.A. and Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, 66: 183-193.
- Muñoz, G.A., Agosin, E., Cotoras, M., San Martín, R. and Volpe, D. (1995). Comparison of aerial and submerged spore properties for *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, 125: 63-70.
- Nair, V., Vietti, D.E. and Cooper, C.S. (1981). Degenerative chemistry of malonaldehyde. Structure, stereochemistry and kinetics of formation of enaminals from reaction with aminoacids. **Journal of the American Chemical Society**, 103: 3030-3096.
- Nair, V., Turner, G.A. and Offerman, R.J. (1984). Novel adducts from the modification of nucleic acid bases by malondialdehyde. **Journal of the American Chemical Society**, 106: 3370-3371.
- Oliver, A.E., Hinch, D.K. and Crowe, J.H. (2002). Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water contents. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, 131: 515-525.
- Oswin, C.R. (1946). The kinetics of package life III. The isotherm. **Journal of the Society of Chemical Industry**, 65: 419-421.
- Papavizas, G.C., Lewis, J.A. and Add-Elmoity T.H. (1982). Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. **Phytopathology**, 72: 126-132.
- Papavizas, G. C., Dunn, M.T., Lewis, J.A. and Beagle-Ristaino.(1984). Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. **Phytopathology**, 74 (10): 1171-1175.
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, 80:627-630.
- Pauling, L. (1945). The adsorption of water by proteins. **Journal of the American Chemical Society**, 67: 555-557.
- Pedreschi, F., and Aguilera, J.M. (1997). Viability of *Trichoderma harzianum* spores under storage. **Bioprocess Engineering**, 17: 177-183.
- Pedreschi, F., Aguilera, J.M., Agosin, E. and San Martín R. (1997). Induction of trehalose in spores of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Bioprocess Engineering**, 17: 317-322.
- Perry, R.H., and Green, D.W. (1997). **Perry's Chemical Engineers' Handbook** (7th edition). McGraw Hill. 24: 13-15.
- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Goma, G. and François, J. (2000). Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. **International Journal of Food Microbiology**, 55: 33-40.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 58 (4): 755-805.
- Rodhman, D.K., Wang Y., Cantwell, J.B., Winn, P.D. and Foundling, J. (1999). Formulating microbial biocontrol agents. **Pesticide Science**, 55:340-342.
- Rogers, L.A. (1914). The preparation of dried cultures. **Journal of Infectious Diseases**, 14:100-123.
- Salwin, H. (1962). The role of moisture in deteriorative reactions of dehydrated foods. **In: Freeze-drying of foods**. National Academic Science Research. Council P., Washington, D.C. pp: 58-73.

- Sandoval-Coronado, C.F., Luna-Olvera, H.A., Arévalo-Niño K., Jackson, M.A., Poprawski T.J. and Galán-Wong, L.J. (2001). Drying and formulation of blastospores of *Paecilomyces fumosoroseus* (hyphomycetes) produced in two different liquid media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 17:423-428.
- Savoir, J.M. and Largeteau, M.L. (2004). Hydrogen peroxide concentrations detected in *Agaricus bisporus* sporocarps and relation with their susceptibility to the pathogen *Verticillium fungicola*. **FEMS Microbiology Letters**, 237: 311-315.
- Shimizu, N., Hosogi, N., Hyon, G., Jiang, S., Inoue, K. and Park, P. (2006). ROS generation and ROS-induced lipid peroxidation are associated with plasma membrane modifications in host cells in response to AK-toxin I from *Alternaria alternate* Japanese pear pathotype. **Journal of General Plant Pathology**, 72:6-15.
- Sid Ahmed, A., Pérez Sánchez, C. and Candela, M.E. (2000). Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 817-824.
- Slater, T.F. (1984). Free-radical mechanism in tissue injury. **Biochemical Journal**, 222: 1-15.
- Stephan, D. and Zimmermann, G. (1998). Development of a spray-drying technique for submerged spores of entopathogenic fungi. **Biocontrol Science and Technology**, 8:3-11.
- Sun, Q.W. and Leopold, A.C. (1997). Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 117 (3): 327-333.
- Sun, Q.W. (1997). Glassy state and seed storage stability: The WLF kinetics of seed viability loss at $T > T_g$ and the plasticization effect of water on storage stability. **Annals of Botany**, 79: 291-297.
- Sun, Q. W., Davidson, P. and Chan, H.S.O. (1998). Protein stability in the amorphous carbohydrate matrix: relevance to anhydrobiosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1425: 245-254.
- Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B. (1994). Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. **Biotechnology and Bioengineering**, 44: 549-556.
- Teixeira, P.C., Castro, H., Malcata, F.X. and Kirby, R. (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus* following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, 78: 1025-1031.
- Teixeira, P., Castro, H. and Kirby., R. (1996). Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. **Letters of Applied Microbiology**, 22: 34-38.
- Thomas, M.B. and Willis, A.J. (1998). Biocontrol-risky but necessary?. **Trends in Ecology and Evolution**, 13: 325-329.
- Timmermann, E.O., Chirife, J. and Iglesias, H.A. (2001). Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters?. **Journal of Food Engineering**, 48: 19-31.
- Timmermann, E.O. (2003). Multilayer sorption parameters: BET or GAB values? **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 220: 235-260.
- Turton, H.E., Dawes, I.W. and Grant, C.M. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1 mediated adaptive response to malondialdehyde. **Journal of Bacteriology**, 179 (4): 1096-1101.
- van den Berg, C. and Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. **In: Water activity: Influences on food quality**. Rockland L.B. and Stewart G.F. (ed.) Academic Press, New York. pp. 1-61.
- Viterbo, A., Ramot, O., Chernin, L. and Chet, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma sp.* in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, 81: 549-556.
- Wang, H., Chang, K.F., Hwang, S.F., Turnbull, G.D., Howard, R.J., Blade, S.F. and Callan N.W. (2005). *Fusarium* root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides. **Biocontrol**, 50:317-329.

- Yedida, I., Benhamou, N. and Chet, I. (1999). Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus L.*) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 1061-1070.
- Zhonghu ,B., Harvey, L.M. and McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of fungi. **Critical Reviews in Biotechnoogy**, 23 (4): 267-302.

APÉNDICE 1

Medición de actividad de agua a 4°C y 25 °C.

Se efectuaron 5 mediciones de actividad de agua en el equipo de medición Aw Sprint de Novasina, para las 5 sales mencionadas anteriormente en soluciones sobresaturadas. Las mediciones se hicieron a las 2 temperaturas a las que se almacenaron las esporas para estudiar el efecto de la deshidratación. Estas mediciones se efectuaron para comparar si los estudios de deshidratación se llevarían a cabo en condiciones similares de humedad relativa.

A los valores obtenidos se les calculó la media y la desviación estándar y se observó la variación de los valores a las diferentes temperaturas de prueba. Los resultados se muestran en la **Tabla A.1.**

Tabla A.1. Medición de actividad de agua de soluciones saturadas de sales a 4°C y 25 °C.

Sales	Aw a 25 °C (media)	Desviación estándar (25 °C)	Aw a 4 °C (media)	Desviación estándar (4 °C)
LiCl	0.111	0.00114	0.125	0.00282
MgCl ₂	0.327	0.00219	0.353	0.00296
Mg(NO ₃) ₂	0.527	0.00083	0.591	0.00148
NaCl	0.750	0.00250	0.760	0.00164
K ₂ SO ₄	0.973	0.00095	0.999	0

Como se puede observar los valores de actividad de agua a 4°C y 25 °C son muy parecidos aumentando poco cuando la temperatura disminuye, pero permaneciendo en el mismo rango de actividad de agua para ambas temperaturas. Aunque se sabe que la presión de vapor de agua varía con la temperatura, disminuyendo con esta, los valores a 4°C fueron ligeramente mayores que los de 25°C, lo que concuerda con el mismo comportamiento con la tabla presentada de humedad relativa (HR) en función de la temperatura de las diferentes soluciones saturadas de las sales de calibración del equipo y que puede explicarse dado que la solubilidad de las sales es menor a baja temperatura siendo así la solvatación de las sales menor y mayor la disposición de agua (Aw).

APÉNDICE 2

Modelización de isotermas de sorción y determinación del valor de humedad de monocapa.

Ecuación de BET

La ecuación de BET linealizada permite el cálculo del valor de humedad de la monocapa (X_0) y una constante C , al representar gráficamente los valores del término $A_w/(1-A_w)X$ frente a la A_w , donde X es la humedad en equilibrio con A_w .

$$\frac{A_w}{(1-A_w)X} = \frac{1}{X_0 C} + \frac{(C-1)}{X_0 C} A_w$$

De los valores de la pendiente y ordenada de la ecuación de BET se pueden obtener así los valores de X_0 y C , sin embargo, la ecuación de BET tiene la limitante de que solamente es constante en el rango de A_w de 0.05 a 0.5. Esto es debido principalmente, a que a partir de estos niveles de A_w ($A_w > 0.5$), los fenómenos que describen mayoritariamente las interacciones del agua en un sistema no son de sorción, sino del tipo soluto-disolvente y el agua empieza a estar presente en el sistema movilizándolo los solutos en forma de fase líquida (Fennema, 1996; Timmermann, 2003). La constante C corresponde a una constante de equilibrio de adsorción y está relacionada exponencialmente con el calor de sorción (Martínez Navarrete *et al.*, 1999; Timmermann *et al.*, 2001).

Ecuación de GAB

La ecuación de GAB es usada ampliamente para representar adecuadamente los datos experimentales de A_w y X en un rango de A_w más práctico de 0.05-0.95 (Timmermann, 2003). A continuación se muestra la ecuación de GAB reorganizada:

$$\frac{A_w}{X} = \frac{1}{X_0 C K} + \frac{(C-2)}{X_0 C} A_w + \frac{K(1-C)}{X_0 C} A_w^2$$

La expresión anterior resulta de graficar los datos experimentales de A_w/X en función de A_w , ajustando los datos a una función polinómica de segundo grado, donde X es la humedad de equilibrio con su correspondiente A_w , X_0 es la humedad de la monocapa, C es la constante de

Guggenheim, característica del sistema y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa y k es un factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa (Timmermann *et al.*, 2001).

Ecuación de Caurie

La ecuación de Caurie tiene un amplio rango de A_w en la que puede ser utilizada (0 – 0.85) y permite calcular el contenido de humedad de seguridad que proporciona la máxima estabilidad de un sistema biológico durante el almacenamiento (X_s) y una constante característica del sistema (r). La ecuación linealizada se presenta a continuación:

$$\ln\left(\frac{1}{X}\right) = \frac{1}{4.5 X_s} - \ln(r) A_w$$

donde X es el contenido de humedad en equilibrio (g de agua g^{-1} sólido seco) con su A_w correspondiente (Martínez Navarrete *et al.*, 1999).

Ecuación de Henderson

El modelo de Henderson se trata de una ecuación empírica, cuya ecuación puede expresarse en forma linealizada como (Martínez Navarrete *et al.*, 1999):

$$\log\left(\log\left(\frac{1}{1 - A_w}\right)\right) = f + n \log(100 X)$$

donde n y f son parámetros característicos del sistema en estudio.

Ecuación de Oswin

La ecuación de Oswin describe el comportamiento de sorción de un amplio rango de productos biológicos y su expresión en forma linealizada es la siguiente:

$$\ln X = \ln a + n \ln\left(\frac{A_w}{1 - A_w}\right)$$

donde a y n son parámetros característicos del sistema en estudio (Martínez Navarrete *et al.*, 1999).

APÉNDICE 3

Tabla A.2 Ajuste de datos experimentales obtenidos por diferentes modelos de isothermas de desorción a 4°C y 25°C de esporas de *T. harzianum*.

Ecuación	Temperatura (°C)	Aw utilizada	Parámetros	R ²
$\frac{Aw}{(1 - Aw)X} = \frac{1}{Xo C} + \frac{(C - 1)}{Xo C} Aw$	4	0.1-0.59	Xo = 0.066 C = 21.9	0.9977
	25	0.1-0.53	Xo = 0.063 C = 15.7	0.9979
$\frac{Aw}{X} = \frac{1}{Xo C K} + \frac{(C - 2)}{Xo C} Aw + \frac{K(1 - C)}{Xo C} Aw^2$	4	0.1-0.99	Xo = 0.072 C = 23.6 k = 0.97	0.9992
	25	0.1-0.99	Xo = 0.066 C = 20.3 k = 0.97	0.9995
$\ln\left(\frac{1}{X}\right) = \frac{1}{4.5 Xs} - \ln(r) Aw$	4	0.1-0.76	Xs = 0.070 r = 0.11	0.8603
	25	0.1-0.75	Xs = 0.068 r = 0.10	0.8352
$\log\left(\log\left(\frac{1}{1 - Aw}\right)\right) = f + n \log(100 X)$	4	0.1-0.76	f = -2.42 n = 1.65	0.9812
	25	0.1-0.75	f = -2.34 n = 1.64	0.9778
$\ln X = \ln a + n \ln\left(\frac{Aw}{1 - Aw}\right)$	4	0.1-0.76	a = 0.132 n = 0.46	0.9978
	25	0.1-0.75	a = 0.122 n = 0.46	0.9959

X: contenido de humedad (g agua g⁻¹ s.s.), Aw: actividad de agua (adimensional), Xo: contenido de humedad de monocapa (g agua g⁻¹ s.s.), Xs: contenido de humedad de seguridad que proporciona la máxima estabilidad (g agua g⁻¹ s.s.), C, k, r, f, n, a: constantes adimensionales de los diferentes modelos, R: coeficiente de correlación.