

EFFECTO DEL QUITOSANO Y LA TEMPERATURA SOBRE LA GERMINACIÓN DE ESPORAS DE *Aspergillus niger*: MODELAMIENTO MATEMÁTICO

M. Plascencia-Jatomea¹, R. Olayo¹, G. Viniegra¹, M.M. Castillo-Ortega² y K. Shirai^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Lab. Biopolímeros. Av. San Rafael Atlixco No.186. Col. Vicentina, México, D.F. C.P. 09340. Tel. (55) 5804 4921. ²DIPM, UNISON.

E-mail: smk@xanum.uam.mx

Introducción. El quitosano es un biopolímero natural, biodegradable y no tóxico, cuyo empleo como agente antimicrobiano en alimentos ha sido aprobado por la FDA.¹ En un trabajo previo se ha reportado que este biopolímero aumenta el diámetro de las hifas distorsionándolas y ocasionando ruptura; asimismo se determinó que el principal efecto inhibitorio era detectado durante las etapas iniciales de crecimiento². El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del quitosano sobre la germinación de esporas *Aspergillus niger*, a diferentes temperaturas de incubación.

Metodología. Placas con medio de cultivo Czapeck añadido con 1.6, 3 y 5 g/L de quitosano fueron inoculadas con una suspensión de esporas de *A. niger* e incubadas a 30°C, realizándose muestreos a diferentes intervalos de tiempo. El conteo de esporas germinadas se realizó mediante tinción diferencial en un total de 200 esporas en diferentes campos del microscopio (40x), añadiendo una solución de *o*-toluidina / ácido bórico. La espora se consideró germinada una vez que la longitud del túbulo germinal fue igual o mayor al diámetro de la espora. La concentración del quitosano que retardó el 50% de la germinación de esporas (CQ₅₀) fue estimada mediante análisis Probit, utilizando el programa estadístico NCSS 2001 (NCSS Inc., USA). El valor de CQ₅₀ obtenido fue usado en estudios posteriores de germinación, variando la temperatura de incubación (12, 18, 22, 25 y 37°C). Los datos experimentales fueron ajustados a la siguiente expresión logística (ecuación 1):

$$S = \frac{S_{\max}}{1 + \left(\frac{S_{\max} - S_0}{S_0} \right) \exp^{-kt}} \quad \dots \text{ecuación 1.}$$

en donde: S es el porcentaje de esporas germinadas en tiempo (t), S₀ es el porcentaje inicial de esporas germinadas, S_{max} el nivel máximo de germinación (t→∞) y k es la tasa de germinación. Además se supuso que los parámetros, S_{max} y k (ecuación 2) fueron funciones de la temperatura, que podrían ser diferentes según hubiese quitosano o no en el medio.

$$k = k_0 \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right) \quad \dots \text{ecuación 2.}$$

Resultados y Discusión. El retardo de la germinación de esporas fue directamente proporcional a la concentración de quitosano. La germinación de esporas fue inhibida en un 40% a la temperatura óptima de crecimiento (30°C), después de 13 h de inoculación. El valor estimado de CQ₅₀ indicó que a 30°C se requieren 3.5 g/L de quitosano para retardar la germinación en un 50% de esporas de *A. niger*. Bajas temperaturas presentaron un efecto sinérgico sobre la actividad fungistática del quitosano, tal como se muestra en la figura 1a, en donde el porcentaje de esporas germinadas es disminuido a medida que se reduce la temperatura. En la figura 1b se observa que en el medio adicionado con quitosano se observa una reducción significativa de S_{max} que con el control (P≤0.05), el cual presentó una tendencia lineal con un valor alrededor del 100%; por el contrario, en medio con quitosano se observó que el valor de S_{max} aumentó proporcionalmente a la temperatura de incubación. Con respecto al cálculo de la energía de activación (Ea) obtenida, se encontró que cuando *A. niger* crece en presencia de quitosano, requiere mayor energía para germinar, obteniendo

en promedio 35.6 y 36.6 kcal/mol para el hongo inoculado en medio control y medio con quitosano, respectivamente (figura 1a).

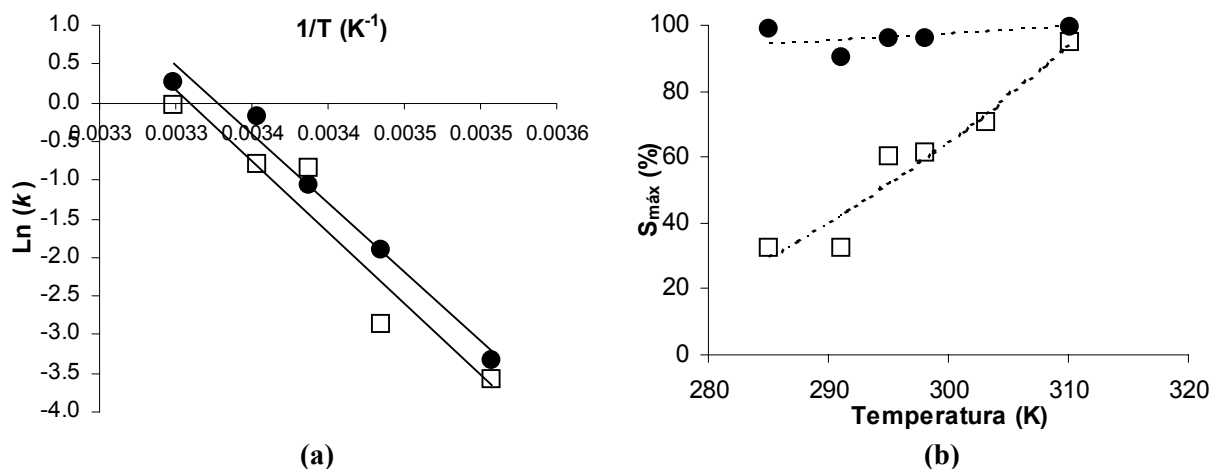


Figura 1a. Gráfico de Arrhenius de la velocidad de germinación, $\ln k$ (h^{-1}), en función de $(1/T)$, para la germinación de *Aspergillus niger*, control (●) o con 3.5 g/L de quitosano (□). Las rectas no fueron estadísticamente significativas ($P \geq 0.05$). **Figura 1b.** Gráfico de S_{\max} vs. T (K), para la germinación de *Aspergillus niger*, control (●) o con 3.5 g/L de quitosano (□). El testigo sin quitosano no mostró variación significativa de S_{\max} con T . Para el tratamiento con el biopolímero, se observó una tendencia creciente.

Los modelos ajustados a la ecuación 1 permiten predecir porcentaje máximo de germinación de esporas de la especie estudiada a una determinada temperatura, proporcionando información para determinar la temperatura con la que se obtendrían reducciones en crecimiento de este microorganismo.

Conclusiones. En este trabajo se demuestra que la adición de quitosano puede inhibir la germinación de cultivos de *Aspergillus niger*. Se demostró que el proceso de germinación se puede representar por una ecuación polinomial, con velocidad, k (h^{-1}) y máximo nivel, S_{\max} . La velocidad siguió una curva de Arrhenius que no mostró diferencias significativas por la adición de quitosano, pero S_{\max} sí fue una función de la temperatura en presencia de quitosano ($P \leq 0.05$), y permaneció constante en el intervalo 12°C (285 K) $< T < 37^\circ\text{C}$ (310 K). Esto indica que la germinación de *A. niger* puede inhibirse a menos del 30% a 12°C en periodos (no mostrados) de hasta 240 h. Por lo tanto, la combinación de una refrigeración moderada con un nivel de quitosano (3.5 g/L) puede retardar en forma efectiva la germinación de cultivos de mohos saprofitos, como *A. niger*. Se sugiere que puede ser un método para aumentar la vida de anaquel de los alimentos, ofreciendo una alternativa al uso de funguicidas sintéticos comerciales.

Agradecimientos.

Los autores agradecen a CONACyT por el financiamiento a través del proyecto No. 400200-5-J33566-E.

Referencias.

1. Hirano, S. (1999). Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym. Int.*, 48:732-734.
2. Plascencia, J.M., Viniegra, G.G., Larralde, P., Olayo, G.R., Castillo, M. and Shirai, K. (2000). Effect of chitosan on fungal growth using morphometric evaluation. *Chitin and Chitosan in Life Science*. Edited by Urugami, T., Kurita, K. And Fukamizo, T. Proceedings of the 8th International Chitin and Chitosan Conference and 4th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium, Japan.