

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Determinación del Efecto de Quitosano y Agentes de Estrés Osmótico u Oxidativo en el Crecimiento de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Fernanda Campa Quijada

Hermosillo, Sonora

Junio 2016

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Fernanda Campa Quijada la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dra. Maribel Plascencia Jatomea
Presidente del Jurado

M. en C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña
Secretario

Dra. Ana Patricia Martínez Camacho
Vocal

M. en C. Griselda Macrina Moreno Ibarra
Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres, que sin su ejemplo y apoyo no sería ni la mitad de lo que soy ahora, por su paciencia y por su cariño mostrado en todo momento. A mis hermanos por compartir y acompañarme en mis planes y sueños, y a mis amigos que más que amigos son mis compañeros de vida.

A mi directora de tesis la Dra. Maribel Plascencia que con su entusiasmo por la ciencia me motivó a seguir con este proyecto de tesis, enamorándome más por esta disciplina que te enseña un mundo totalmente diferente al que conoces.

A mi asesora técnica la Dra. Ana Patricia Martínez, que siempre con mucha paciencia me encaminó en este proyecto y con su conocimiento me ayudó a aprender tanto y a buscar provecho a cada una de las enseñanzas que se me presentan, también por siempre tener energía y mucha disposición cuando se trataba de experimentar.

A mis sinodales y maestras Lucía Castillón y Griselda Moreno, que me acompañaron en mi formación académica siempre de la mejor manera.

A la Universidad de Sonora, por ayudarme a desarrollarme tanto académicamente como personalmente.

DEDICATORIAS

*Dedicada completamente a Dios y a mis padres,
con amor y con todo mí esfuerzo.*

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	13
Objetivo General	13
Objetivos Particulares.....	13
ANTECEDENTES.....	14
El Quitosano.....	14
Mecanismos de Accion Antimicrobiana.....	15
Actividad Antifúngica del Quitosano.....	18
El Quitosano y otros Métodos de Control.....	19
Quitosano y el Estrés Oxidativo	20
Especies Reactivas de Oxigeno	21
La Produccion de Especies Reactivas de Oxigeno y Daño Celular.....	21
Efecto del Estrés Oxidativo	22
Mecanismos de Accion del Estrés Oxidativo.....	23
Estrés Oxidativo y Uso de Fungicidas.....	25
Estres Osmótico	26
Osmoregulacion.....	27
Afectacion del Estrés Osmotico	29
Generalidades del genero <i>Aspergillus spp.</i>	30
METODOLOGÍA	33
Obtención del Inóculo.....	33
Preparación de Soluciones de Quitosano.....	34
Preparación de Agentes Inductores de Estrés.....	34
Preparación de Medios de Cultivo.....	35
Técnicas de Inoculación.....	35
Crecimiento Radial	36

Germinación de Esporas.....	36
Diametro de Esporas e hifas	37
Determinacion de Efecto Sinergico entre Quitosano e Inductores de Estrés	38
Diseño Experimental	39
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
CONCLUSIONES	79
RECOMENDACIONES.....	80
REFERENCIAS	81

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Extensión radial y porcentajes de inhibición promedios de <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Aspergillus niger</i> .	45
2	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la velocidad de extensión radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Aspergillus niger</i> .	51
3	Porcentaje de germinación de esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Aspergillus niger</i> .	53
4	Análisis morfométrico de esporas e hifas en <i>Aspergillus parasiticus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	56
5	Efecto de los pre-tratamientos de quitosano seguido de agentes inductores de estrés sobre la velocidad de extensión radial de <i>Aspergillus niger</i> .	66
6	Efecto de los pre-tratamientos con quitosano seguido de agentes inductores de estrés sobre la velocidad de extensión radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	67
7	Efecto de los pre-tratamientos inductores de estrés seguido de los distintos quitosanos sobre la velocidad de extensión radial de <i>Aspergillus niger</i> .	67
8	Efecto de los pre-tratamientos inductores de estrés seguido de los distintos quitosanos sobre la velocidad de extensión radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	68
9	Sinergismo y efecto de la aplicación de pre-tratamientos con quitosano e inductores de estrés osmótico y oxidativo sobre la inhibición de <i>Aspergillus niger</i>	70
10	Sinergismo y efecto de los pre-tratamientos de quitosano e inductores de estrés osmótico y oxidativo sobre la inhibición de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	73
11	Germinación y análisis morfométrico de esporas de <i>Aspergillus niger</i> desarrollado en tratamientos combinados de quitosano e inductores de estrés.	75
12	Germinación y análisis morfométrico de las esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> desarrolladas en tratamientos combinados de quitosano e inductores de estrés.	77

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Proceso de acetilación de la quitina	15
2	Estructura y carácter catiónico del quitosano en solución ácida.	16
3	Proceso de osmorregulación.	28
4	Estructuramorfológica del género <i>Aspergillus</i> .	32
5	Espora germinada.	37
6	Efecto de los tratamientos inductores de estrés sobre el crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	41
7	Efecto de los tratamientos con quitosano sobre crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	41
8	Efecto de los tratamientos inductores de estrés sobre crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> .	42
9	Efecto de los tratamientos con quitosano sobre crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	43
10	Crecimiento radial en medio sólido de <i>Aspergillus niger</i> a las 168h.	44
11	Crecimiento radial en medio sólido de <i>Aspergillus parasiticus</i> a las 168h.	44
12	Imágenes de microscopia óptica de las esporas de <i>Aspergillus niger</i> .	57
13	Imágenes de microscopia óptica de las esporas de <i>Aspergillus parasiticus</i> .	58
14	Crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en tratamientos combinados de quitosano con agentes inductores de estrés.	59
15	Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en tratamientos combinados de quitosano con agentes inductores de estrés	60
16	Crecimiento radial de <i>Aspergillus parasiticus</i> en tratamientos combinados de agentes inductores de estrés y quitosano.	62
17	Crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en tratamientos combinados de agentes inductores de estrés y quitosano.	63

RESUMEN

El quitosano es un biopolímero lineal formado por unidades de glucosamina y en menor medida de N-acetil D-glucosamina, unidos por enlace β 1-4 obtenido de la desacetilación parcial (60%) de la quitina, que es el polímero más abundante en la naturaleza (Galed y col., 2005). Posee efecto antimicrobiano debido principalmente a los grupos aminos protonados a pH 5.6 del quitosano que pueden formar complejos polielectrolitos con los grupos ácidos y básicos de la superficie celular ocasionando estrés de la membrana, alteraciones en su estructura y funcionalidad, los cuales a su vez pueden provocar la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares (Liu y col., 2004). La inhibición del crecimiento del hongo puede ser total o parcial según la especie microbiana, el grado de polimerización y de N-acetilación del quitosano. Otros agentes causantes de estrés pueden afectar el crecimiento de los hongos, entre estos agentes causantes de estrés oxidativo o de estrés osmótico. El quitosano es un compuesto que causa estrés de membrana, sin embargo también se le ha relacionado con causar estrés oxidativo en diferentes organismos (Mosleh y col., 2007).

En pruebas de crecimiento radial en medio sólido PDA adicionado con quitosano, el quitosano de peso molecular medio 4 g/L tuvo mayor efecto antifúngico sobre la extensión radial de *Aspergillus niger*, mientras que el quitosano de bajo peso molecular a 1g/L tuvo mayor efecto sobre *Aspergillus parasiticus*, mostrando un aumento en el porcentaje de inhibición y reducción en la velocidad de extensión radial. El tratamiento con sorbitol y NaCl 1M ocasionó una mayor inhibición sobre *A. parasiticus* que los demás tratamientos causantes de estrés osmótico u oxidativo, mientras que para *A. niger* el tratamiento más efectivo fue el de NaCl.

Los tratamientos que presentaron un efecto sinérgico al utilizarse de manera consecutiva para el hongo *Aspergillus niger* fueron: el pretratamiento con sorbitol (S) resembrado en quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 4 g/L (QB4) y el pretratamiento con quitosano de medio peso molecular a una concentración de 4 g/L (QM4) resembrado en H₂O₂ (H) los cuales mostraron mayor inhibición de crecimiento que los tratamientos individuales, así mismo una reducción de la velocidad de crecimiento. Para *Aspergillus parasiticus*, los tratamientos consecutivos más efectivos fueron: el pretratamiento con quitosano de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4 g/L con NaCl, y los pretratamientos con sorbitol, metilgioxal y H₂O₂ con quitosano de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4 g/L mostrando una inhibición en el crecimiento del hongo así como una reducción en la velocidad de crecimiento.

INTRODUCCIÓN

Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que son capaces de sobrevivir en condiciones ambientales extraordinarias (García y col., 2005). Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición de estos (Chapman, 2005).

El género de hongos *Aspergillus* suele encontrarse en una gran variedad de productos agrícolas y son los contaminantes más extendidos a nivel mundial en productos agrícolas como el maíz, cacahuates, algodón, frutos secos, arroz, tabaco y especias, entre otros alimentos (Cota y col., 2011); sus metabolitos son altamente tóxicos y se conoce que producen mutaciones (mutágenos), cáncer (cancerígenos), malformaciones en los fetos (teratógenos) e inmunosupresores. Debido a esta gran variedad de efectos tóxicos y a su resistencia al calor (termorresistencia), la presencia de estos hongos y la producción de sus toxinas en alimentos son consideradas de alto riesgo para la salud humana y de los animales (Mandez y Moreno, 2009).

Se han reportado casi 50 especies de *Aspergillus* como productores de metabolitos tóxicos llamadas micotoxinas. Las de mayor importancia son: las denominadas aflatoxinas (producidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*); la ocratoxina A producida por *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. niger*; la sterigmatocistina producida principalmente por *A. versicolor*; el ácido ciclopiazónico producidas por *A. flavus* y *A. tamaritii*; la citrinina, patulina y ácido penicílico también son producidas por especies de *Aspergillus* (Hocking, 2001). Esto ha centrado la atención de los científicos, el mundo político y económico, debido a las grandes pérdidas económicas asociadas con los impactos en la salud humana, la productividad animal y el comercio internacional. Se estima que más del 25% de la producción agrícola está contaminada con micotoxinas (Cota y col., 2011).

Debido a esto, durante varios años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar dichos patógenos, principalmente en productos agrícolas pos-cosecha; sin embargo, se ha evidenciado que estos compuestos han ocasionado resistencia en microorganismos, incluyendo a los hongos y representan un potencial riesgo para la seguridad del medio ambiente y la salud humana (Cordero y col., 2003; Guizzardi y col., 1995).

Actualmente, el uso de agentes químicos para el control de microorganismos fitopatógenos es cuestionado; los graves daños al medio ambiente debido al uso irracional de estos productos sintéticos siguen latentes, lo que ha llevado a considerar otras opciones de control. El uso de compuestos naturales como el quitosano constituye una solución adecuada a esta problemática (Rodríguez y col., 2009).

En la búsqueda de alternativas naturales para el control de pudriciones pos-cosecha se ha valorado el empleo de extractos vegetales, antagonismo microbiano (control biológico) y el uso de compuestos naturales como el quitosano (Cordero y col., 2003; Guizzardi y col., 1995), siendo considerado este último como uno de los productos más prometedores para el control de varios hongos en productos pos-cosecha (El-Ghaouth y col., 1992; Reddy y col., 1998; Ben-Shalom y col., 2003).

El quitosano que es un derivado de la deacetilación de la quitina, comúnmente obtenida del exoesqueleto de crustáceos como camarón y cangrejo (Sandford, 1989); es un polímero biodegradable, no tóxico, bioactivo que ha demostrado tener efectos fungicidas y ser inductor de mecanismos de defensa en tejidos vegetales (Wilson y col., 1994; Terry y Joyce, 2004).

En la naturaleza, los microorganismos no se enfrentan a una sola condición adversa o condición de estrés. En muchas ocasiones los hongos se encuentran en medios o ambientes en donde más de un factor estresante puede causarles daño. Es por ello que en los métodos de control de poblaciones microbianas patógenas se suelen emplear combinaciones de condiciones para asegurarse de la inhibición o eliminación de dichos microorganismos. Sin embargo, los métodos de control de diferentes plagas en cultivos, incluidas las de microorganismos, usualmente involucran un incremento en las dosis y número de aplicaciones (Salgado-Nava y col., 2012), lo que a su vez ejerce un impacto en el aumento de la resistencia microbiana.

La presencia de quitosano en cultivos de hongos filamentosos ha demostrado tener un efecto ya sea fungicida o fungistático, dependiendo mayormente del tipo de hongo, debido a las diferencias en la composición química de las membranas celulares (Palma-Guerrero y col., 2008; Hernández-Lazaurdo y col., 2011). Este efecto se ha probado en el control de hongos fitopatógenos como *Rhizopus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, entre otros (Quintana-Obregón y col., 2010; Hernández-Lazaurdo y col., 2013; Cota-Arriola y col., 2011), encontrando en algunos casos un efecto favorecedor sobre los mecanismos de defensa de las plantas a la

acción de otros agentes causantes de estrés como la salinidad o incluso al ataque de insectos (Mahdavi y Rahimi, 2013). Asimismo se ha encontrado un efecto sinérgico en el control de hongos patógenos al mezclar la aplicación de fungicidas comerciales con el quitosano (Rahman y col., 2014).

El quitosano inhibe multitud de especies de hongos, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares (Roller y Covill, 1999; Allan y Hardwiger, 1979). Los hongos que poseen quitosano como componente de sus paredes celulares deberían ser menos sensibles a la aplicación de dosis razonables de éste por dos razones: (a) la presencia natural de quitosano en las paredes celulares no genera efectos adversos para el microorganismo y (b) las interacciones electrostáticas del quitosano añadido (exógeno), cargado positivamente, deberían verse menos favorecidas con paredes celulares que poseen quitosano endógeno que cuando éstas poseen material con cargas negativas (Velásquez, 2008).

Con respecto a productos alimenticios tratados con quitosanos y procesados con algún otro método de conservación como la refrigeración o atmósferas modificadas, se han observado mejoras en atributos de la calidad organoléptica, además de permitir el aumento del tiempo de vida útil de los mismos al controlar el crecimiento de poblaciones microbianas (Jianglian y Shaoying, 2014).

Basándose en la información presentada anteriormente, es posible esperar alguna alteración en el crecimiento de hongos tratados con factores combinados de estrés incluyendo el quitosano; sin embargo, la respuesta fisiológica de hongos a la presencia de quitosano combinado con otros factores de estrés, tales como estrés osmótico y estrés oxidativo, ha sido poco estudiada.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto pretratamientos de quitosanos y agentes causantes de estrés osmótico u oxidativo sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de agentes causantes de estrés osmótico (Sorbitoly NaCl) y estrés oxidativo (Metilglioxal, Tert-butily H₂O₂) sobre el crecimiento radial, germinación de esporas y morfometría de cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*.
2. Evaluar el efecto de quitosanos de bajo peso molecular (122 kDa, 75-85% DD) y medio peso molecular (153kDa, >75%DD) a una concentración 1 y 4 g/L sobre el crecimiento radial, germinación de esporas y morfometria de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*.
3. Determinar si existe efecto sinérgico entre los quitosanosy los inductores de estrés, sobre el crecimiento radial de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*.

ANTECEDENTES

El Quitosano

El uso de productos bioactivos es uno de los principales retos de la agricultura moderna. En este sentido, el quitosano representa una alternativa muy promisorio debido a su carácter natural, significativa actividad biológica y facilidad de obtención, aunado a su actividad contra un amplio espectro de patógeno, la cual se puede manifestar de dos formas: por inhibición del crecimiento de patógenos y por la inducción de resistencia sistémica a infección de patógenos. La segunda forma es la más importante para las prácticas agrícolas y representa un novedoso método de control de enfermedades, lo cual está basado en la activación de los mecanismos de control de la enfermedad en la planta (Rodríguez y col., 2009).

El quitosano es un biopolímero obtenido de la desacetilación (60%) de la quitina (Figura 1), que es el segundo polímero natural más abundante (Lopez-Mengibar, 2012) después de la celulosa. Su estructura consiste en la repetición de unidades N-acetil-D-glucosamina y N-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos; es soluble en diluciones con ácidos orgánicos, principalmente en ácido acético, debido a la protonación del grupo amino libre a lo largo de la cadena polimérica (Argüelles y col., 2004). La proporción de grupos aminos en su estructura y su peso molecular determinan la mayoría de sus propiedades funcionales (Rabea y col., 2003).

Entre las propiedades funcionales del quitosano están la biodegradabilidad, biocompatibilidad, habilidad para formar varios materiales (geles, membranas, películas, fibras, entre otras), actividad antiviral, inductor de defensa en plantas contra microorganismos patógenos, efecto insecticida y antimicrobiano (Rabea y col., 2003). Además de estas características, el quitosano no es tóxico para humanos y animales, por esta razón, puede ser usado en diferentes áreas del cuidado de la salud del humano, como en la área de farmacéutica, nutrición, entre otros (Simionato y col., 2006).

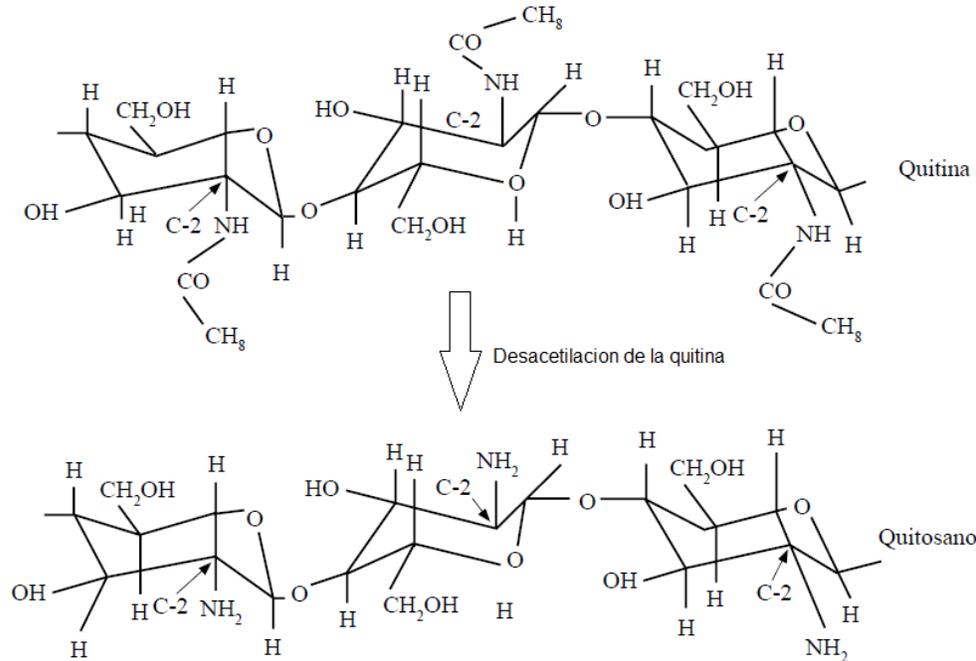


Figura 1. Proceso de desacetilacion de la quitina, para generar quitosano.(Fuente: Camacho-Figueroa, 2010)

Mecanismos de Acción Antimicrobiana del Quitosano

La actividad antimicrobiana del quitosano difiere de acuerdo al tipo de microorganismo. En el caso de los hongos filamentosos, este polímero ejerce un efecto antifúngico inhibiendo la formación de esporas e hifas (Hernández-Lauzardo y col., 2008). En contraste, la actividad antibacteriana del quitosano es más compleja y difiere entre bacterias Gram (+) y Gram (-) debido a las diferencias en cuanto a la composición de la superficie celular de ambos tipos de bacterias. Respecto al mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano, aún existen controversias entre los autores; sin embargo, se han propuesto algunos mecanismos en donde varios investigadores coinciden.

El primer mecanismo se basa en que las cargas positivas del quitosano interactúan con las cargas negativas de las membranas de las células microbianas. Se ha propuesto que la acción del quitosano frente a los hongos filamentosos puede ser explicada por la alteración directa de la membrana funcional (Chung y col., 2003), debido a la presencia de un cambio

sobre el C-2 del monómero de la glucosamina, cuando este polímero se solubiliza en soluciones ácidas con pH menor a su pKa (pH ≈ 6-7) (Valenzuela y Arias, 2012) (Figura 2).

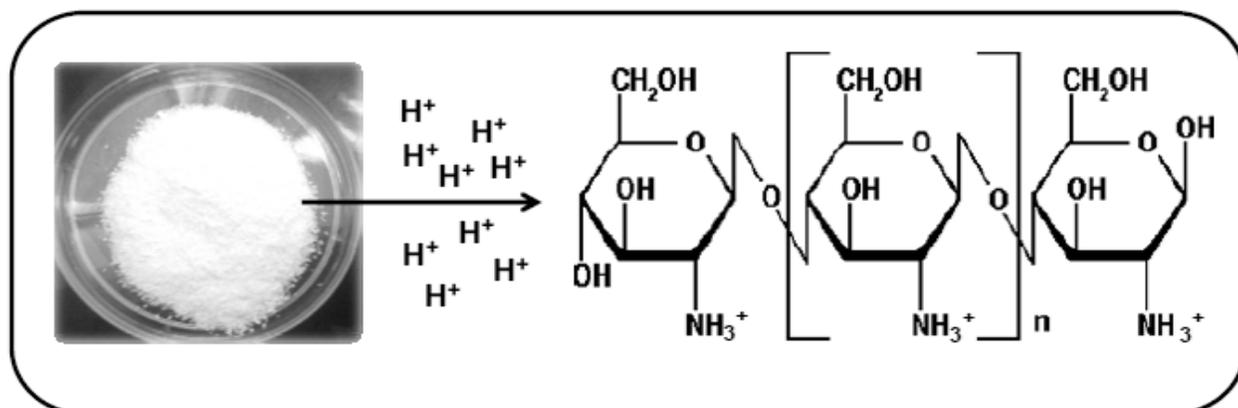


Figura 2. Estructura y carácter catiónico del quitosano en disolución ácida. (Fuente: Valenzuela y Arias, 2012)

Algunos estudios realizados en algunas levaduras han demostrado que la parte externa de la membrana plasmática está enriquecida por esfingolípidos, que están cargados negativamente, los cuales interactúan con los grupos amino del quitosano, generando una desestabilización de la membrana y lisis celular (Zakrzewska y col., 2005). El quitosano forma canales de transporte de moléculas en bicapas lipídicas artificiales, lo que provee evidencia que el quitosano puede desorganizar la membrana celular (Zakrzewska y col., 2007).

Liu y col. (2004) reportaron que la acción antimicrobiana del quitosano consiste en la destrucción de las membranas internas y externas de las bacterias, liberando los componentes intracelulares. Helander y colaboradores (2001) reportaron que el quitosano cambia el estado de la membrana externa y modifica la superficie celular, generando el debilitamiento de la función celular de bacterias Gram (-) tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Typhimurium*. Otro factor que incide en la actividad microbiana del quitosano es la fase de crecimiento en la que se encuentra el microorganismo, ya que la electronegatividad de la membrana cambia en las diferentes etapas del crecimiento bacteriano, lo que puede generar menor o mayor susceptibilidad (Tsai y Su, 1999; Yang y col., 2007).

El segundo mecanismo propuesto implica la actividad quelante de los grupos amino del quitosano en metales traza fuera de las células, principalmente en cationes metálicos tales

como el hierro, cobre, zinc y molibdeno, que son esenciales para el crecimiento de un organismo (Goy y col., 2009) inhibiendo el desarrollo microbiano y la producción de toxinas, derivado de la disponibilidad de micronutrientes esenciales para las actividades celulares vitales de los microorganismos (Rabea y col., 2003). También se ha observado que el quitosano es capaz de quelar cationes divalentes estableciendo interacciones electroestáticas con moléculas aniónicas (fosfato, carboxilato) que forman parte de los lipopolisacáridos, desestabilizando la membrana celular de las bacterias (Helander y col., 1997).

Como tercer mecanismo la actividad fungicida del quitosano propone la interferencia causada en la síntesis de proteínas, lo que podría ser una consecuencia de los daños de la membrana causados por la interacción de carga con quitosano. Este mecanismo implica la capacidad del quitosano para pasar a través de la membrana celular de un microorganismo, y posteriormente unirse al ADN e interferir con la síntesis de proteínas (Je y col., 2006). Como se ha reportado en el caso de *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*), donde se ha observado al microscopio la aparición de vesículas y/o células vacías carentes de citoplasma, después del tratamiento con soluciones acuosas al 1,75% de quitosano (El-Ghaouth y col., 1992) así como la interferencia en la síntesis de proteínas por inhibición de la transformación de ADN en ARNm (Tharanathan y Kittur, 2003).

Otro mecanismo de acción propone que el efecto inhibitorio del biopolímero puede ser mediado por el estrés oxidativo, que resulta de la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células de hongos como *Sapinea sphaeropsis*, en respuesta a tratamientos con quitosanos (Singh, 2008).

Durante el metabolismo normal de las células, los organismos producen ERO, no obstante, su afectación dentro de la célula está estrechamente regulada para que se produzca un crecimiento normal. Sin embargo, cuando la generación de ERO excede la capacidad de la célula (sistema de defensa antioxidante) se genera el llamado estrés oxidativo para neutralizar las ERO (Angelova, 2005). Los efectos de este tipo de estrés incluyen daño a todos los principales componentes de la célula, proteínas, lípidos y ADN (Fridovich, 1998).

La actividad antimicrobiana de quitosano y sus derivados se puede resumir por la siguiente secuencia de sucesos: (1) adsorción del quitosano y/o oligómeros de éste sobre la superficie de la célula bacteriana, (2) difusión a través de la pared celular e interrupción de la función adecuada de ésta, provocando (3) la interrupción de la membrana citoplasmática y (4)

generando finalmente fugas de los constituyentes citoplásmicos y, (6) la muerte de la célula (Ikeda y Tazuke, 1984; Papineau y col., 1991).

Actividad Antifúngica del Quitosano

El quitosano posee también actividad antimicrobiana contra algunos hongos filamentosos, levaduras y virus. Se conoce que existen algunos hongos que contienen en su pared celular quitosano como principal componente, tal es el caso de los *Zygomycetos*, que presentan baja sensibilidad al biopolímero (Rodríguez-Pedrosa y col., 2009).

El quitosano logra su efecto antifúngico mediante diferentes vías en las que parece desempeñar un papel importante su grado de polimerización. Una disminución en el grado de polimerización de la molécula provoca una disminución en el número de especies de hongos inhibidos. Asimismo, algunos autores reportan que el grado de acetilación es de gran importancia en la actividad antifúngica *in vitro* del quitosano, mostrando que biopolímeros de similar grado de polimerización y diferentes grados de acetilación presentan actividad inhibitoria sobre el crecimiento de algunos hongos, encontrando una mayor inhibición a un menor grado de acetilación (El-Ghaouth y col., 1992).

Por otra parte, Chien y Chou (2006) reportaron que el quitosano, dependiendo del tipo y su concentración, puede causar desde un 25 hasta un 90.5% de inhibición del crecimiento de hongos que afectan la calidad de frutos cítricos (*Citrus tankan* Hayata), observando un incremento en la inhibición de los microorganismos al aumentar la concentración. Plascencia-Jatomea y col. (2003) comprobaron que el quitosano inhibe el crecimiento radial y la germinación de esporas del hongo *Aspergillus niger* a la concentración de 3 g/L. De igual forma, Atia y col. (2005) encontraron que el quitosano reduce el crecimiento micelial y producción de esporas del patógeno *Phytophthora infestans*, a la concentración de 1 mg/mL.

Si bien es cierto que el quitosano ejerce un efectivo control sobre el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras, y que el peso molecular, el grado de deacetilación (Tsai y col., 1999) y la sensibilidad del microorganismo son factores determinantes de la actividad, el efecto sobre patógenos puede cambiar de acuerdo a los diferentes estadios del desarrollo microbiano (Liu y col., 2007). En *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que el quitosano retarda la fase de crecimiento (Rodríguez-Pedrosa y col., 2009), mientras que en hongos

filamentosos como *Aspergillus niger*, el efecto es mayor durante la germinación de esporas (Martínez-Camacho y col., 2010).

También, Trotel y col. (2006) observaron que el quitosano inhibe el crecimiento micelial y desarrollo *in vitro* del hongo *Botrytis cinerea*. Por su parte, Bautista-Baños y col. (2003; 2004) lograron la inhibición completa del crecimiento de hongos como *Fusarium oxysporum*, *Rizhopus stolonifer*, *Penicillium digitatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* a concentraciones de 3%, reportando que la forma, la longitud y el área de los conidios fueron afectadas de acuerdo a la especie y el tiempo de incubación en la solución del quitosano.

Estudios ultraestructurales realizados en *Rhizopus stolonifer* mostraron que el quitosano erosiona la pared celular, lo que se relacionó positivamente con el incremento del material proteico que se detectó en el medio. Laflamme y col. (1999) reportaron que el quitosano reduce el crecimiento de *Fusarium acuminatum*, *F. oxysporium*, *Cylindrocladium floridanum* y *Cylindrocarpon destructans*, provocando un aumento de la vacuolización, retractación y alteración de su membrana plasmática, así como el engrosamiento de la pared celular y distorsión de hifas. Igualmente, el quitosano ha demostrado ser activo contra el patógeno *B. Cinerea*, provocando reducción en su desarrollo y alteraciones citológicas (Barka y col., 2004).

Otros autores como Rivero y col. (2004) comprobaron que el quitosano afecta la germinación de los conidios de *Fusarium sp.* a una concentración de 1000 mg/mL, incluso también inhibe la germinación de conidios de *Botrytis cinerea* a la concentración de 50 mg/L (Ben-Shalom y col., 2003).

Uso de Quitosano y otros Métodos de Control

Algunos autores señalan que estudios futuros sobre la evaluación del efecto sinérgico del quitosano con otros métodos naturales de control biológicos o físico-químicos serían de gran utilidad para proveer de otras alternativas de control de las enfermedades postcosecha y la reducción del uso de fungicidas (Bautista-Baños y Col. 2004).

Al evaluar el uso combinado de quitosano con aceites esenciales de clavo, canela y tomillo en condiciones *in vitro* se encontró que esta combinación presenta un efecto aditivo e incluso sinérgico sobre el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer* (Alvarado, 2009).

Por otra parte, el uso de quitosano mezclado con bajas dosis de fungicidas sintéticos mostró un efecto sinérgico sobre la actividad antifúngica tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, en plantas de fresas frente al patógeno *Botrytis cinerea*, observando que el uso combinado aumentó un 90% la efectividad; este efecto sinérgico podría ser el resultado de un aumento general de estrés cuando diferentes procesos celulares son atacados simultáneamente (Rahman y col, 2014).

Quitosano y Estrés Oxidativo

El uso de quitosano sobre hojas de plantas de arroz mostró un efecto de pardeamiento en contraste con el tratamiento control; estos síntomas necróticos visibles pueden estar relacionados con aumentos catalíticos de especies reactivas de oxígeno(ERO), tales como H_2O_2 . Además, la aparición de manchas de color pardusco sugieren fuertemente la producción y acumulación de compuestos fenólicos o metabolitos secundarios generados por quitosano, lo que sugiere que la realización de una herida (por corte) y el tratamiento con el biopolímero pueden causar diferentes respuestas en el arroz; por lo tanto, es posible que el efecto del quitosano se asocie a la producción de H_2O_2 y su acción en la superficie celular (Rakwal y col., 2002).

Un estudio donde se pretendió comprender el (los) mecanismo (s) por el cual el quitosano ejerce su efecto antifúngico contra hongos degradadores de madera como *Sphaeropsis sapinea* (*S. sapinea*) y *Trichoderma harzianum*, se encontró que la exposición a concentraciones crecientes de quitosano causó un aumento en la cantidad de acumulación de H_2O_2 en cultivos axénicos de *S. sapinea*, que fue acompañado por una disminución en la formación de superóxido. Las afectaciones morfológicas proporcionaron evidencia sobre el daño provocado en las hifas de los hongos, la cual es mediada a través de alteraciones en las propiedades de la membrana de plasmática. El aumento de las concentraciones de quitosano provocó una ramificación excesiva, vacuolización y una reducción en el diámetro hifal, lo que sugiere que la membrana plasmática puede ser el objetivo principal del quitosano, y que los dos hongos difieren en la medida en que se ven afectados (Singh y col., 2008).

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Los organismos aerobios utilizan el oxígeno molecular (O_2) como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria para producir energía en forma de ATP. Cerca del 80% del ATP que utilizan las células proviene de las mitocondrias, en donde se consume aproximadamente el 90% del O_2 (Peraza y Hansberg, 2002). Sin embargo, se pueden producir especies reactivas de oxígeno (ERO) y otros radicales libres como subproductos de la cadena respiratoria, así como de otros procesos metabólicos. También se producen ERO en algunas reacciones catalizadas por metales pesados y/o por la exposición a radiaciones UV (Lara, 2012).

Cuando se produce un incremento en la concentración intracelular de ERO, como consecuencia de un aumento en su generación o una disminución en la capacidad para eliminarlas, se genera un estado de estrés oxidativo el cual tiene efectos tóxicos a través de reacciones con diversas moléculas y componentes de la célula, tales como los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, entre otros (Lara, 2012).

Las ERO se producen a partir del O_2 y son más reactivas que éste en su estado basal. Se pueden generar tanto por la excitación del O_2 , del que se forman el oxígeno atómico (O), el oxígeno en singülete ($1O_2$) y el ozono (O_3); asimismo se pueden generar por su reducción parcial, el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el H_2O_2 y el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) (Halliwell, 1990).

Aunque el anión superóxido y el H_2O_2 son compuestos poco reactivos, ambos son tóxicos porque participan en la producción de otras ERO más reactivas. Junto con las ERO existen otras moléculas o radicales conocidas como especies reactivas de nitrógeno (ERN), que se generan a partir del óxido nítrico (NO) cuando reacciona con el oxígeno o con el superóxido. Los efectos de las ERN pueden llegar a sobrelaparse con los efectos de las ERO (Lara, 2012).

La Producción de ERO y el Daño Celular

El estrés oxidativo se produce en el medio natural con la exposición a condiciones aeróbicas y la luz UV. Para hongos patógenos, el estrés oxidativo se manifiesta a través de la producción de la cantidad de especies reactivas del oxígeno, H_2O_2 y radicales hidroxilo por células fagocíticas.

Los radicales de óxido son también consecuencia del metabolismo celular normal. Para evitar daños en las células debido a los radicales de óxido exógenos, la primera línea de defensa en hongos es la pared celular. La célula detecta el estrés oxidativo y las medidas

reactivas son tomadas por las vías de transducción de señales para proteger a la célula del ambiente adverso (Arana y col., 2005). Además se producen un grupo de enzimas para combatir el ataque de óxido, incluyendo superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, y glutatión peroxidasa (Fuchs y Mylonakis, 2009).

En la célula pueden formarse diversas ERO que tienen un papel fisiológico relevante, algunas de estas son:

El superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que puede formarse en la mitocondria, principalmente en el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa), de la cadena respiratoria, cuando hay fugas de electrones que no reducen el O_2 hasta H_2O (Halliwell, 1990).

También se puede formar $O_2^{\bullet-}$ por acción de algunas enzimas como la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa o el citocromo P_{450} (Halliwell, 1990). El superóxido se dismuta, ya sea espontáneamente o mediante la superóxido dismutasa para formar H_2O_2 . El $O_2^{\bullet-}$, en menor medida que el H_2O_2 , puede reaccionar con los centros [Fe-S] de algunas proteínas deshidratasa como la aconitasa B y las fumarasas A y B (Imlay, 2003).

El H_2O_2 se produce principalmente en los peroxisomas (Boveris y col., 1972) o por la actividad de diversas enzimas (Halliwell, 1989; Imlay, 2003), siendo una molécula poco reactiva y puede difundirse a través de los compartimentos celulares. Sin embargo, puede oxidar algunos residuos de aminoácidos como la cisteína, produciendo aductos de ácido sulfénico que pueden formar puentes disulfuro con otras cisteínas o bien hiperoxidar estos residuos de cisteína nuevamente hasta formar aductos de ácido sulfínico y ácido sulfónico (Imlay, 2003).

Aunque el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 son ERO poco reactivas, ambas moléculas pueden generar el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) en presencia de metales de transición, a través de reacciones tipo Fenton y de Haber-Weiss (Ahmad, 2012). El OH^{\bullet} es capaz de reaccionar con prácticamente cualquier molécula presente en una célula e inactivarla (Lara, 2012).

Efecto del Estrés Oxidativo.

La descomposición de H_2O_2 es de importancia primordial para evitar lesiones oxidativas severas de las células, las cuales se piensa generalmente que es debido a su capacidad para dañar las macromoléculas, incluyendo lípidos, ADN y proteínas (Jamieson, 1998).

En comparación con otras ERO, el H_2O_2 es menos tóxico, aunque es capaz de difundirse en diferentes compartimentos de sus sitios originales de producción antes de alcanzar sus objetivos (Branco y col., 2004).

Estudios señalan que el pretratamiento con bajas concentraciones de H_2O_2 impide totalmente el daño celular. Queda demostrado que *A. niger* se adapta a la exposición a H_2O_2 al reducir el crecimiento y la inducción de una serie de actividades enzimáticas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, de las cuales, la inducción de la catalasa es el más pronunciado. Por otra parte, la disminución de la actividad de estas enzimas antioxidantes después de la desintoxicación de H_2O_2 , coincide con reanudación del crecimiento (Li y col., 2008).

Mecanismos de acción del Estrés Oxidativo

La muerte celular a causa de estrés oxidativo podría deberse a la pérdida de potencial de la membrana celular y un aumento de la permeabilidad de la misma (Bracey y col., 1998). Esto es generalmente seguido por autólisis, que es la mejor evidencia de muerte celular (Sigler, 1999).

Entre los diversos factores ambientales nocivos, el ataque de ERO se considera que es la fuente más perjudicial en el ADN donde se han identificado aproximadamente 100 diferentes lesiones inducidas por radicales libres (Dizdaroglu, 1992). Al mismo tiempo los radicales de oxígeno pueden dañar tanto los fosfolípidos de membrana celular como sus proteínas, aunque la oxidación de lípidos se piensa que es más peligrosa para la célula. No sólo causa daños en la membrana como tal, sino una serie de múltiples efectos estresantes primarios mediante la generación de más factores de estrés secundarios.

Peroxidación Lipídica

Las ERO pueden iniciar la peroxidación de lípidos, que comienza por la eliminación del hidrógeno a partir de una cadena de ácido graso insaturado. El radical ácido graso resultante puede reaccionar con el oxígeno para generar radicales lipídicos que propagan la reacción en cadena de la peroxidación lipídica (Halliwell y col., 1993 y Tappel, 1973). Por lo tanto, una sola iniciación puede resultar en la conversión de cientos de ácidos grasos a hidroperóxidos de lípidos (Sevcu y col., 2001).

Ha sido bien establecido que cuando se añade hierro redox activo a la membrana homogeneizada *in vitro*, la peroxidación es mucho más rápida debido a que más radicales se generan a través de la reacción de Fenton. La vulnerabilidad de una membrana a la peroxidación de lípidos se incrementa en lípidos poliinsaturados, especialmente cuando está presente en los cloroplastos (Ledford y col., 2005).

Las membranas que han presentado peroxidación pierden permeabilidad selectiva y, en condiciones extremas, pueden perder su integridad. El producto de la peroxidación lipídica, hidroperóxido de lípidos, se puede descomponer en varias especies de radicales que son capaces de reaccionar con el ADN y causar la formación de una base modificada, lo que puede inducir mutaciones (Yoon y col., 2002). Productos de la peroxidación de lípidos solubles en agua (por ejemplo, aldehídos) pueden difundirse hacia el citosol mediante la membrana y hacia otros compartimentos celulares. En particular, los productos de peroxidación de lípidos pueden inhibir varias enzimas. Por lo tanto, el proceso de peroxidación de lípidos, y sus productos, puede ser seriamente perjudiciales para la viabilidad celular (Sevcu y col., 2011).

Oxidación de Proteínas

Diferentes estudios mostraron que la oxidación de proteínas catalizada por hierro es un proceso de sitio específico, lo que puede ocurrir sólo en los sitios de unión a hierro de la proteína (por ejemplo, en histidina, cisteína, lisina y metionina). El Fe^{2+} resultante de la reducción directa de Fe^{3+} se puede unir a un sitio de unión a metal y reaccionar con H_2O_2 para generar ERO, que reaccionan adicionalmente con las cadenas laterales de residuos de aminoácidos (Stadtman y col., 1991). Este sistema de reacción se llama "sistema de oxidación catalizada por ion metal", donde se implica al H_2O_2 , que puede afectar a proteínas y lípidos en paralelo de la membrana.

Por otra parte, las proteínas pueden entrecruzarse con otras o formar enlaces hidrofóbicos. El daño oxidativo de proteínas también puede afectar a la actividad de las enzimas de reparación del ADN y causar reticulación en DNA-proteína (Shanlin y col., 1997). Además, las ERO pueden conducir a la formación de enlaces disulfuro entre los aminoácidos que contienen azufre, perturbando así la estructura y función de la proteína. Las mitocondrias o cloroplastos expuestos a ERO pierden el equilibrio iónico y de manera similar, las proteínas de la cadena de transporte de electrones podrían dañarse (Sevcu y col., 2011).

La Oxidación del ADN y Mutación

La exposición a ERO a nivel celular ocasiona tanto daño de ADN como de ARN (Sevcu y col., 2011). Se sospecha que el ADN mitocondrial es más sensible que el ADN nuclear al daño oxidativo debido a su proximidad a la principal fuente de generación oxidante. Los más peligrosos son los radicales hidroxilos, que son capaces de atacar el resto de la base del ADN, que conduce a la fragmentación y roturas de la cadena (Sevcu y col., 2011). Estas roturas son más peligrosas y aún más letales para las células que el mismo daño a la base, aunque este último puede dar lugar a diversas mutaciones (Sevcu y col., 2011). El ataque de ERO sobre las bases de ADN conduce a unas 50 alteraciones de base. Por ejemplo, los residuos de ADN de la timina y la guanina pueden ser hidroxilados o degradados oxidativamente (Sevcu y col., 2011). Glicol timina, un producto de la oxidación de timina (residuos de timina son más sensibles que otros residuos), puede bloquear la replicación por la ADN polimerasa y el daño de la transcripción por la ARN polimerasa cerca del sitio de la lesión, o bien puede causar mala interpretación (Sevcu y col., 2011).

Estrés Oxidativo y Uso de Fungicidas

La formación de ERO se relaciona con el estado metabólico de la célula, principalmente en las actividades en relación a la mitocondria, donde las funciones celulares son altamente dependientes del nivel de ERO producido, es decir; mientras más altos sean los niveles de ERO provocan una mayor muerte celular (Orrenius y col., 2007), mientras que si estos niveles son bajos poseen un efecto en las vías de señalización que regulan la proliferación (Storz, 2005 y Sena y col., 2012).

Varias enzimas (NADPH oxidada, Nox1-5 y Duox1-2) producen la formación de radical libre superóxido en la célula, el cual juega un papel importante en la señalización celular, la regulación en la expresión génica, muerte celular así como la diferenciación y el crecimiento (Brown y col., 2009).

En la etapa de crecimiento y desarrollo del hongo interviene una serie de señalizaciones dependientes de las especies reactivas de oxígeno, el uso de fungicidas asocian una respuesta antioxidante con la modificación a la sensibilidad y resistencia a los grupos químicos de los fungicidas que basan su funcionamiento al interrumpir el flujo de electrones en la mitocondria, consumir el poder reductor celular e inducir la muerte celular al generar un estrés de tipo

oxidativo cuando se incrementa el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno, en especial el peróxido de hidrogeno. Los hongos constantemente están expuestos a un estrés oxidativo en el medio ambiente, ya que las toxinas, la limitación de nutrimentos y su propio metabolismo causan un incremento de las condiciones oxidantes que aumentan las ERO. Especies reactivas de oxígeno inducen diversas respuestas celulares asociadas a la diferenciación, muerte y proliferación, de tal forma que en concentraciones adecuadas funcionan como segundos mensajeros (Aguirre y col., 2005).

Hoy en día existe una amplia variedad de agentes químicos en la agricultura y que de forma directa o indirecta forman H_2O_2 u otras ERO que modifican el patrón de crecimiento al inducir la peroxidación de los lípidos o dañando al ADN (Choi y col., 1996; Lee y col., 1998). Estas circunstancias se correlacionan con el efecto de los fungicidas en la salud animal y humana en especial por la inducción de tumores y algunas otras alteraciones importantes (Cereser y col., 2001; Thiruchelvam et al., 2005), lo que ha generado la búsqueda de nuevas alternativas para evitar el uso de fungicidas.

Estrés Osmótico

Durante la evolución, los seres vivos han estado sujetos a la presión de selección debida a un ambiente cambiante. El estrés osmótico, sea como producto de la escasez de agua, de la salinidad de los suelos o de las bajas temperaturas, representa uno de los estreses más severos, limitantes del crecimiento y productividad de las plantas y organismos, los cuales han desarrollado diversas estrategias adaptativas para contrarrestar sus efectos (Solano y col., 2000).

La mayoría de los microorganismos han evolucionado para funcionar sólo dentro de ciertos rangos de actividades acuáticas. La exposición de los microorganismos a la sal y otros solutos provoca una pérdida instantánea de agua, que se acompaña de una disminución en el volumen citoplasmático. Si ocurre un choque hipoosmótico generalmente resulta en cambios menores en el volumen celular. Por otro lado, si ocurre un choque hiperosmótico provoca una contracción considerable del volumen citoplasmático. Si este choque osmótico no es demasiado grave, después de un retraso prolongado, el volumen citoplasmático se incrementará como resultado de los ajustes osmóticos realizados por las células (Csonka, 1989).

Un método utilizado para conservar productos alimenticios es el aumento de la presión osmótica y reducción del agua disponible (a_w), siendo muy importante para el crecimiento de microorganismos, los cuales tienen límites a_w mínimos, por debajo del cual no puede ocurrir el crecimiento. Este valor límite de a_w depende del soluto utilizado para la conservación del producto, tales como sales (por ejemplo, NaCl y KCl), azúcares (por ejemplo, glucosa y sacarosa) o glicerol (Troller, 1980; Sperber, 1983). Dentro de estos límites, cada microorganismo posee cierto rango al cual se puede desarrollar, siendo un límite más bajo el que presentan los hongos, en comparación con las bacterias (Gould, 1989).

La exposición a valores de a_w fuera de este intervalo puede resultar en la afectación de funciones celulares esenciales y en la inhibición de una variedad de procesos fisiológicos tales como la absorción de nutrientes (Roth y col, 1985). Por ejemplo, en *E. coli* se ha observado que el estrés osmótico inhibe drásticamente el transporte activo de hidratos de carbono (Roth y col., 1985) y la replicación de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Meury, 1988).

Osmorregulación

Las bacterias están constantemente en contacto con su entorno; las barreras que rodean a la célula son permeables al agua y así pueden mantener un equilibrio con su entorno (Gutiérrez y col., 1995). Generalmente, la presión osmótica interna en las células bacterianas es mayor que la del medio ambiente circundante y por lo tanto ejerce presión hacia el exterior sobre la pared celular; esta es llamada presión de turgencia (Gutiérrez y col., 1995). Por lo tanto, para sobrevivir a estas variaciones de presión osmótica del medio circundante, las células bacterianas deben mantener esta turgencia. Si la a_w del medio ambiente se reduce, las células pierden agua para garantizar la restauración del equilibrio osmótico a través del gradiente de concentración. Si la a_w reducida debe al aumento de los solutos que no pueden ser transportados a través de la membrana de la célula, entonces se produce una pérdida temporal de la presión de turgencia; una vez ocurrido esto, las bacterias elevan sus niveles de solutos internos (solutos compatibles), resultando en un aumento de la presión osmótica interna y restauración de la presión de turgencia (Figura 3). Esto se denomina osmorregulación (Gutiérrez y col., 1995).

La osmorregulación es necesaria para mantener la turgencia de la célula fúngica, el volumen y el medio ambiente intracelular apropiado para reacciones bioquímicas (Hohman y col., 2007). Por ejemplo, algunos hongos como *Aspergillus spp.* se encuentran en el suelo, un entorno que le permite experimentar un cambio osmótico debido a la sequía, la lluvia, u otras condiciones climáticas. Además, este hongo es capaz de sobrevivir tanto en el ambiente del suelo y dentro de un huésped mamífero, tal como un patógeno humano. Los hongos que hacen esta transición deben ser capaces de compensar los cambios en la osmolaridad del medio ambiente (Fusch y col., 2009).

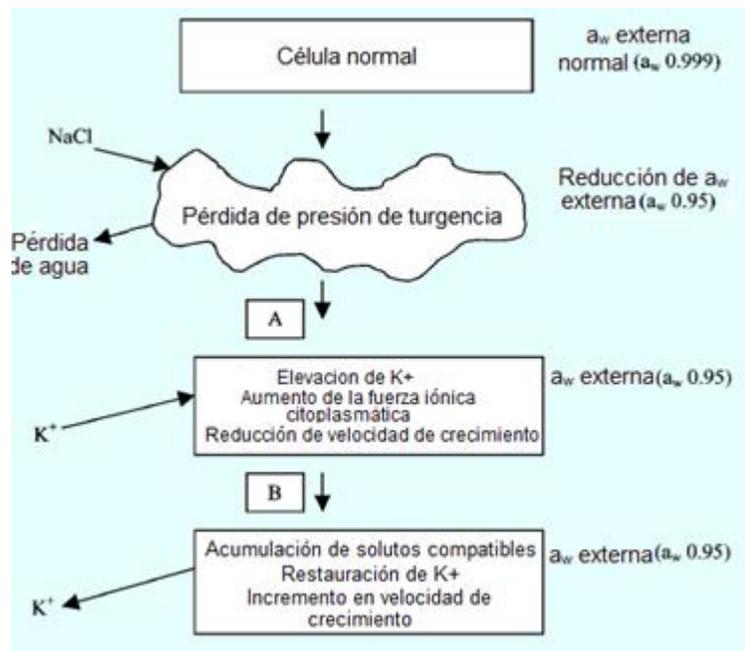


Figura 3. Proceso de osmorregulación. “A” como la bacteria pierde agua, el nivel citoplasmático de K^+ aumenta “B”, lo que desencadena enzimas como glutamato deshidrogenasa para formar glutamato de ketoglutamato. A medida que aumentan los niveles de glutamato, el agua comienza a volver a entrar en la célula y el crecimiento se reanuda. (Fuente: Beales, 2003).

Afectación del Estrés Osmótico

Respuesta de la Membrana Celular frente al Estrés Osmótico

El crecimiento a valores bajos de a_w también conduce a cambios en la composición de lípidos de la membrana, y se ha sugerido que este cambio es parte del mecanismo de detección de la osmorregulación (Russell y col., 1985). En contraste con el efecto de la temperatura sobre la composición de la membrana, el principal cambio en la respuesta a la sal se encuentra en el grupo de cabeza de los lípidos. La alteración más común es el aumento en la proporción de fosfolípidos aniónicos y/o glicolípidos cuando la a_w externa se reduce a través del soluto conservante (Russell y col., 1995). Las razones de estos cambios son para preservar la bicapa lipídica al reducirse la a_w , pudiendo afectar la estabilidad de la membrana, lo cual perjudicaría su función. Estos cambios se han observado en una serie de microorganismos incluyendo los que causan deterioro de los alimentos (Bygraves y col., 1988).

Cambios Inducidos por el Estrés Osmótico en Fosfolípidos

El mayor cambio después de un crecimiento a baja a_w ocurre a nivel de los lípidos aniónicos, tales como difosfatidilglicerol (DPG) y fosfatidilglicerol (PG), lípidos de ión híbrido tales como fosfatidiletanolamina (PE). Estos se han encontrado en bacterias como *E. coli* (McGarrity y Armstrong 1975), *Pseudomonas halosaccharolytica* (Ohno y col., 1976), *Vibrio costicola* (*V. costicola*) (Russell y col., 1985) y *Z. rouxii* (Hosono, 1992). Se ha observado que al añadir NaCl al 2% (p/v) al medio de crecimiento, *Listeria monocytogenes* responde mediante el aumento de la proporción de DPG/PG en comparación con muestras control (Russell y col., 1995). Por lo tanto, la presencia de la sal activa cambios en la composición lipídica de la membrana.

Cambios Inducidos por el Estrés Osmótico en la Composición de Ácidos Grasos

Las sales y otros solutos también pueden alterar la composición de ácidos grasos de los lípidos de la membrana (Beales, 2004). Sutton y col. (1990) encontraron cambios en la composición de ácidos grasos en *V. costicola* cuando se cultiva a una concentración de 3 M de NaCl en comparación con 1 M.

La composición de ácidos grasos de PG en 3 M de NaCl fue más insaturada con la diferencia de un doble enlace en distribución isomérica y una longitud de cadena más corta en

comparación con la concentración de 1 M. Sin embargo, el PE en las células tenía el mismo grado de instauración y longitud cadena en ambas concentraciones (Beales, 2004).

La tolerancia a la sal implica la acción coordinada de muchos genes que llevan a cabo una variedad de funciones, como el secuestro de iones, el ajuste metabólico, ajuste osmótico y la defensa antioxidante. Estudios donde se evaluaron condiciones normales y condiciones de estrés salino en la germinación de semillas de cártamo y girasol en presencia de diferentes concentraciones de quitosano, mostró que el estrés inducido por la salinidad disminuyó significativamente el porcentaje de germinación, la tasa de germinación, longitud y peso de raíces y brotes, y el contenido de proteínas. Bajo condiciones de control no hubo diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre diferentes concentraciones de quitosano.

Con el aumento de estrés salino, bajas concentraciones de quitosano aumentó el porcentaje de germinación, la generación de ERO parece ser inevitable en condiciones normales y la actividad de las enzimas antioxidantes en las plantas varía en función de la generación de ERO bajo estrés salino. Sin embargo, los datos indican que las plantas sometidas a estrés salino inducido por el estrés oxidativo y bajas concentraciones de quitosano mostraron efectos positivos en el alivio de estrés salino a través de la reducción de la actividad de la enzima en ambos cultivos (Lizarrago-Paulin y col., 2011).

Generalidades del genero *Aspergillus spp.*

Aspergillus es un hongo filamentoso hialino, saprofito, perteneciente al filo *Ascomycota*. Se encuentra formado por hifas hialinas septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios), son responsables de la contaminación de muchos alimentos (Abarca y col., 1994 y Katta y col., 1995). Como se mencionó, las clases de hongos de mayor importancia en el almacenamiento de cultivos son los hongos filamentosos y hongos microscópicos, cuya temperatura óptima de desarrollo son unos 20 °C, estos necesitan agua, oxígeno y una temperatura idónea para desarrollarse. Necesitan tomar también sustancias nutritivas de un sustrato; dichas sustancias son disueltas antes de su absorción en el micelio. Si no se toman precauciones, los productos de cultivos almacenados constituyen un sustrato ideal para el desarrollo de hongos.

Desde el punto de vista ecológico, los hongos pueden dividirse en hongos de campo y de almacenamiento. Los hongos de campo, tales como *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* y

Helminthosporium invaden las semillas antes de la cosecha. Estos hongos sólo se desarrollan en semillas que tienen elevado contenido de humedad (22-25 %) y mueren cuando las condiciones de almacenamiento son correctas. Los hongos de almacenamiento, principalmente del género *Aspergillus* y *Penicillium* se desarrollan en semillas que tienen un contenido de humedad del 12-18 % (Stevenson, 1984).

Los hongos del género *Aspergillus* son ubicuos, encontrándose ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos. Debido a la facilidad de suspensión de sus conidios y a su pequeño tamaño, estos pueden permanecer en el ambiente por largo tiempo, por lo que son un vector importante de contaminación de alimentos y de enfermedades del hombre (Kozakiewicz, 1989). Se encuentran presentes generalmente en el suelo, aire, agua, plantas y materia orgánica en descomposición (Razzagh-Abyaneh y col., 2006). El medio ideal para su desarrollo son ambientes oscuros, húmedos y cerrados; dichas características han llevado a clasificarlos como hongos de almacén, sin embargo, también pueden contaminar productos de campo (Kozakiewicz, 1989).

Aspergillus es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originan las esporas asexuales o conidios (Figura 4). El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (Abarca, 2000).

Algunos hongos importantes que se desarrollan después de la cosecha son *Aspergillus flavus*, causando su deterioro. Algunas cepas producen la toxina venenosa llamada anatoxina, sobre todo en semillas oleaginosas y cereales que no se han secado suficientemente. Los hongos, después de los insectos, son los principales causantes de la reducción de la calidad de cereales almacenados a nivel mundial, en donde el género *Aspergillus* representa gran importancia (Pitt y Hockin, 1999).

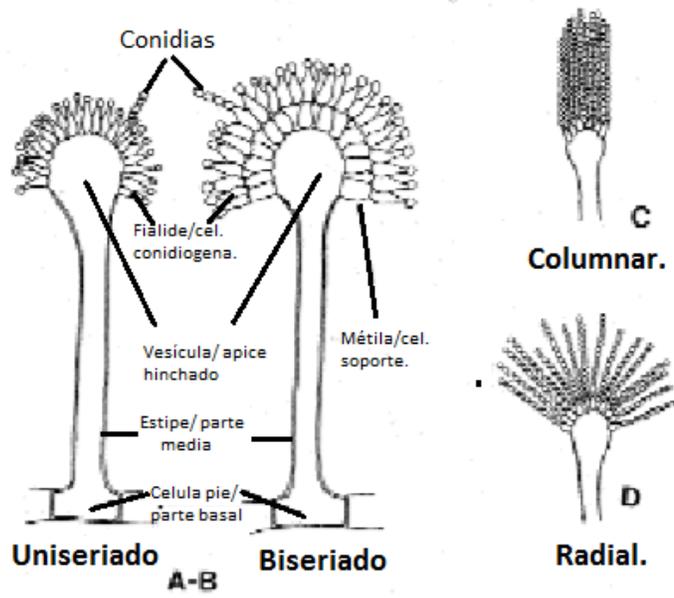


Figura 4. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus* spp. A-B: conidióforos; C-D: cabezas conidiales. (Fuente: Abarca, 2000).

La especie *Aspergillus niger* como hongo saprofito, es capaz de crecer en una amplia gama de sustratos orgánicos y a menudo provoca el deterioro de los alimentos almacenados (Mishra y Dubey, 1994 y Paster y col., 1990), las bodegas de archivos (Roquebert, 1998). También es un hongo oportunista que causa otomicosis y está implicado en algunas infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes inmunodeprimidos y trasplantados. Los productos químicos (fungicidas) se utilizan para combatir el hongo, pero la percepción negativa de conservantes químicos de consumo impulsa la atención hacia alternativas naturales(Rasooli y col., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar el efecto del quitosano y de los agentes inductores de estrés, se realizaron ensayos de crecimiento radial (CR), germinación de esporas (GE) y análisis morfométrico (diámetro promedio de esporas e hifas) de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*, tratados previamente con quitosanos de bajo peso molecular (122 kDa, 75-85% DD) y medio peso molecular (153kDa, >75%DD), a concentraciones de 1 y 4 g/L. Como agentes inductores de estrés se utilizaron: estrés osmótico (sorbitol, NaCl y Tert-Butil) y estrés oxidativo (metilglioxal y H₂O₂) (Martínez-Camacho y col., 2010).

Una vez realizados los ensayos con cada quitosano y cada uno de los agentes inductores de estrés, por separado, posteriormente se realizaron ensayos de crecimiento radial (CR), germinación de esporas (GE) y análisis morfométrico (diámetro promedio de esporas e hifas) de ambos hongos con los tratamientos cruzados post-estrés, es decir, el hongo desarrollado en los tratamientos con quitosano se sembró en medios adicionados con inductores de estrés osmótico u oxidativo; asimismo, el hongo desarrollado en medios con los agentes de estrés se sembró en medios adicionados con quitosano. A partir de los datos experimentales se calculó el sinergismo entre los tratamientos post-estrés, de acuerdo a la ecuación de Limpel (Plascencia-Jatomea y col., 2003). A continuación se describe de manera detallada la metodología de cada uno de los procedimientos antes mencionado.

Obtención del Inóculo

Se utilizaron cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA). Dichos hongos se sometieron a reactivación mediante la siembra del inóculo utilizando matraces Erlenmeyer de 125 mL con agar papa dextrosa (PDA, BDBioxon®) así como en tubos con agar papa dextrosa para reserva del inóculo. Se procedió a incubar a 25±2°C, hasta obtener un crecimiento en toda la superficie, alrededor de 120 h.

Una vez obtenidas las esporas del hongo en toda la superficie, se tomaron 20 mL de agua destilada estéril y se depositaron en el matraz con el inóculo desarrollado, agitando con una barra magnética estéril por 5 minutos para desprender las esporas y obtener una suspensión de esporas. La concentración de esporas en la suspensión fue determinada

mediante conteo en cámara de Neubauer para obtener una concentración final de 1×10^4 esporas/mL (Martínez-Camacho y col., 2010).

Preparación de Soluciones de Quitosano

Se prepararon soluciones stock de quitosanos comerciales de medio y bajo peso molecular (Sigma–Aldrich®, USA), a una concentración de 2% (20 g de quitosano/L), a partir de la cual se obtuvieron soluciones con las concentraciones requeridas (1 y 4 g/L) para su posterior evaluación.

Para obtener esta concentración se tomaron 2 g de cada uno de los quitosanos y se disolvieron en 100 mL de solución de ácido acético a una concentración de 0.1M, manteniéndose en agitación magnética a temperatura ambiente durante 24 h. Una vez obtenidas dichas soluciones stock se procedió a la preparación de las diluciones para obtener una concentración final de 1 y 4 g/L, para cada tipo de quitosano. Los diferentes volúmenes de soluciones de quitosanos fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos, antes de ser añadidos a matraces con medio de cultivo PDA estéril (PDA, BDBioxon®), para su posterior inoculación y análisis correspondiente (Martínez-Camacho y col., 2010).

Preparación de Agentes Inductores de Estrés

Se prepararon soluciones con los inductores de estrés osmótico y oxidativo a diferentes concentraciones según el tratamiento a evaluar, las concentraciones finales fueron llevadas a los medios de cultivo PDA preparados previamente.

Para los agentes inductores de estrés osmótico se utilizó sorbitol a una concentración de 1.2M, cloruro de sodio (NaCl) a 1M y Tert-butil a 1 μ M. Los tratamientos con sorbitol y NaCl fueron añadidos directamente al medio de cultivo para después ser esterilizados. Para el tratamiento con Tert-butil se preparó una solución stock con agua des ionizada, posteriormente se añadió al medio de cultivo una vez que ambos estuvieran esterilizados, teniendo la precaución de añadirlo a temperatura ambiente.

Para los agentes inductores de estrés oxidativo se utilizó peróxido de hidrogeno (H_2O_2) a una concentración de 1mM y metilglioxal a 5mM. Los tratamientos con metilglioxal fueron preparados a partir de una solución stock con agua des ionizada para su posterior adición al

medio de cultivo estéril, para los tratamiento con H₂O₂ se tomó la solución y se agregó al medio de cultivo previamente esterilizado.

Preparación de Medios de Cultivos

Se prepararon medios de cultivo de agar papa dextrosa (PDA, Bioxon, USA), se esterilizaron y se adicionaron con los diferentes agentes inductores de estrés osmótico u oxidativo, por separado, cada uno con concentraciones molares específicas para cada tratamiento, como se describe a continuación.

Estrés osmótico. Placas con PDA adicionado con sorbitol 1.2M y NaCl 1M.

Estrés oxidativo. Placas con PDA adicionado con metilglioxal 5 mM, H₂O₂ 1 mM y tert-butil 1 μM.

Tratamientos controles. Placas con agar PDA (control de inductores de estrés) y PDA adicionado con ácido acético al 0.6 M (control de quitosano).

Tanto los tratamientos con inductores de estrés, como los tratamientos con los quitosanos, fueron preparados previamente a partir de soluciones concentradas, utilizando diluciones con concentraciones previamente descritas en la literatura y mencionados en el apartado anterior.

Técnicas de Inoculación

Se utilizaron 2 técnicas de inoculación según el parámetro a evaluar:

- a) *Inoculación por siembra en placa:* se inoculó la suspensión de esporas a una concentración de 1x10⁴ esporas/mL, depositando una gota del inóculo en el centro de la placa y esparciéndolo sobre toda la superficie del agar, con la ayuda de un asa en triángulo estéril. Los estudios realizados fueron la germinación de esporas y el diámetro de las esporas e hifas (Martínez-Camacho y col., 2010).
- b) *Inoculación en pozo:* se tomaron 25 μl de la suspensión de esporas y se depositaron en el interior de un pozo de 6 mm realizado en el agar con la ayuda de una pipeta *Pasteur* de vidrio estéril. El análisis realizado fue el crecimiento radial (Suárez-Jiménez y col., 2007).

Crecimiento Radial

La determinación de crecimiento radial de *A. niger* y *A. parasiticus* se realizó en cajas petri con agar PDA adicionado con los diferentes tratamientos inductores de estrés (osmótico y oxidativo), y quitosano, inoculadas por *siembra en pozo*. Las placas inoculadas se incubaron a una temperatura de 25°C (Incubadora D.B.O. modelo TE-I45DM) y el diámetro de la colonia fue medido manualmente cada 24 h y comparado con el crecimiento del hongo en el medio control; las mediciones se continuaron hasta que el hongo cubrió toda la superficie. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada tratamiento. Calculando el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de la colonia (ecuación 1):

$$\text{Inhibición radial (\%)} = \frac{(X_c - X_i)}{X_c} \times 100 \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde X_c fue el radio promedio de la colonia control y X_i fue el radio de la colonia en medio con quitosano (Holmes y Eckert, 1999; Plascencia-Jatomea y col., 2003). La velocidad de extensión radial de la colonia fue determinada a partir de la pendiente obtenida de la gráfica del crecimiento radial versus tiempo.

Germinación de Esporas

Cajas petri con agar PDA adicionado con los tratamientos inductores de estrés osmótico u oxidativo y quitosano, fueron inoculadas con la suspensión de esporas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* respectivamente, con una concentración de 1×10^4 esporas/mL, utilizando la técnica de *inoculación por siembra en placa* descrita anteriormente; posteriormente las placas fueron incubadas a una temperatura de 25°C (Incubadora D.B.O. modelo TE-I45DM), realizando mediciones a diferentes intervalos de tiempos.

A continuación, utilizando un microscopio óptico, de cada placa se contaron al azar 200 esporas (germinadas y no germinadas), determinando el número de esporas germinadas por placa a las 8h y 14 horas de incubación. Se considera una espora germinada aquella que presente el tubo germinativo de buen tamaño o por lo menos mayor al tamaño de la espora. (Paul y Col., 1993, Plascencia-Jatomea y col., 2003). (Figura 5). Cada tratamiento se realizó por duplicado.

Se determinó el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas con respecto al control con la siguiente formula (Suárez-Jimenez., 2007):

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{Y_c - Y_i}{Y_c} \times 100 \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde Y_c fue el porcentaje de esporas germinadas en el control y Y_i fue el porcentaje de esporas germinadas en los diferentes tratamientos.

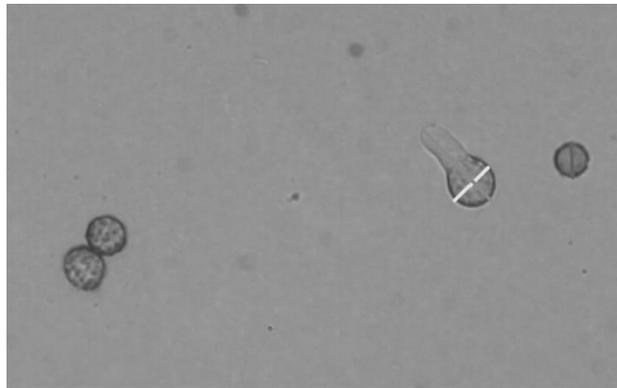


Fig. 5. Espora germinada, mostrando cómo el tubo germinal supera la longitud de la espora.

Diámetro de las Esporas e Hifas

Cajas petri con agar PDA adicionado con los tratamientos inductores de estrés osmótico u oxidativo y quitosanos, fueron inoculadas con la suspensión de esporas de *A. niger* y *A. parasiticus*, respectivamente, con una concentración de 1×10^4 esporas/ml, utilizando la técnica de *inoculación por siembra en placa* descrita anteriormente; posteriormente las placas fueron incubadas a una temperatura de 25°C (Incubadora D.B.O. modelo TE-I45DM).

Las determinaciones de los diámetros de las esporas e hifas (a 40x) se llevaron a cabo mediante el uso de un microscopio (Olympus CX31, USA) equipado con cámara Infinity-1 (Media Cybernetics, USA) para procesamiento de imágenes, utilizando el programa Image-Pro

Plus versión 6.3 (Media Cybernetics, Inc.). Los intervalos de tiempos para las mediciones del diámetro promedio de las esporas fueron a las 8 h de incubación, mientras que para el diámetro de las hifas fue a las 14 h. Como control se utilizó el hongo desarrollado en los tratamientos individuales a evaluar.

Determinación del Efecto Sinérgico entre Quitosano e Inductores de Estrés

La inhibición obtenida del pre-tratamiento con quitosano seguido de la aplicación de los agentes inductores de estrés sobre el crecimiento radial fue determinado mediante la ecuación de Limpel,

$$Ea = X + Y - \frac{(XY)}{100} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde Ea es la respuesta aditiva esperada al combinar el quitosano con los agentes inductores de estrés, y X y Y son los porcentajes obtenidos para el quitosano y el agente inductor, respectivamente. La existencia de sinergismo se consideró cuando la combinación de los dos factores inhibitorios produjo cualquier valor de inhibición mayor que Ea (Lorito y col., 1994). Donde la relación entre el efecto esperado (%) y la inhibición de la mezcla (%) tiene una relación >1 se considera un efecto sinérgico (Rahman y col., 2014).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar el efecto fungistático de los dos quitosanos sobre las esporas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en medio de cultivo sólido PDA, se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro fuentes de variación:

1^{era} Fuente de variación: tipo de quitosano o peso molecular (PM), con dos niveles.

2^{da} Fuente de variación: concentración de quitosano, con dos niveles.

3^{era} Fuente de variación: tipo de hongo, con 2 niveles

4^{ta} Fuente de variación: Agentes causante de estrés, con 5 niveles.

Variabes respuesta: crecimiento radial de las colonias, porcentaje de esporas germinadas y diámetro promedio de esporas e hifas.

El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza, ANOVA, de una vía, a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$. La comparación de grupos homogéneos se llevó a cabo mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, a un intervalo de confianza de 95%. El programa estadístico utilizado fue el SPSS versión estándar 17.0 (SPSS, Inc., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferentes estudios han demostrado el efecto antifúngico que posee el quitosano sobre el crecimiento de ciertos hongos, sin embargo, es poca la información disponible en relación al uso de quitosano en combinación con otros tratamientos antimicrobianos y de cómo interactúan (Ramos-García y col., 2010). Es por ello que en este trabajo se analizó el efecto de tratamientos de quitosano en conjunto con agentes causales de estrés osmótico y oxidativo sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*, dos hongos filamentosos saprófitos productores de micotoxinas y que pueden producir enfermedades en los seres humanos. Los resultados obtenidos en este trabajo se presentan en 2 diferentes etapas:

1. Estudio de la actividad antimicrobiana de quitosanos de diferente peso molecular (122 kDA y 153 kDA) y de compuestos inductores de estrés osmótico (Sorbitol y NaCl) y oxidativo (Metilgloxal, tert-butyl y peróxido de hidrógeno) sobre el crecimiento radial, germinación de esporas y morfometría de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en medio de cultivo sólido.
2. Estudio del efecto antimicrobiano del pre-tratamiento con quitosano seguido de la aplicación de inductores de estrés osmótico y oxidativo; así como, el pre-tratamiento con inductores de estrés osmótico y oxidativo seguido del tratamiento con quitosano; sobre el crecimiento radial, germinación de esporas y morfometría de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en medio de cultivo sólido.

Etapas 1. Actividad Antimicrobiana del Quitosano de Diferente Peso Molecular y de compuestos Inductores de Estrés Osmótico y Oxidativo sobre el Crecimiento Radial, Germinación de Esporas y Análisis Morfométrico de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en Medio de Cultivo Sólido.

A) Crecimiento radial de *Aspergillus niger* y *A. parasiticus* en medio sólido adicionado con quitosano de diferente peso molecular e inductores de estrés osmótico y oxidativo.

En las figuras 6-9 se presentan las cinéticas de crecimiento radial de *A. niger* y *A. parasiticus* en los tratamientos con quitosano y con los agentes inductores de estrés oxidativo y osmótico.

Los resultados de la evaluación para *A. parasiticus* mostraron que los quitosanos de bajo y medio peso molecular, a una concentración de 1 g/L, inhibieron el crecimiento radial del hongo con respecto al control (PDA acidificado) ($P < 0.05$), retrasando el aumento del diámetro de las colonias con respecto al tiempo de incubación (Figura 6).

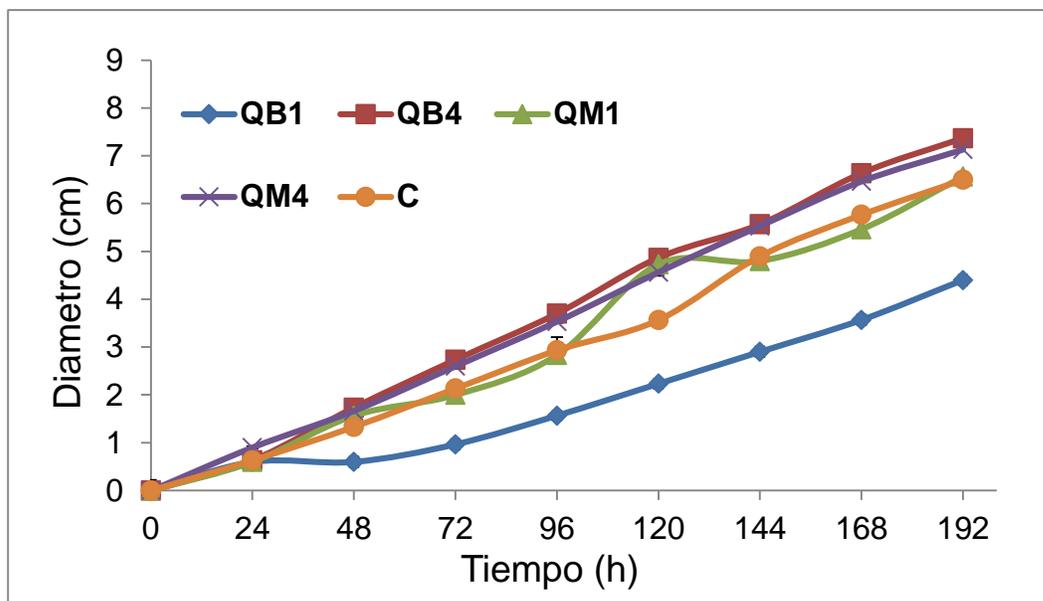


Figura 6. Cinéticas de crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio adicionado con quitosanos de diferente peso molecular. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente; QM1 y QM4: quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente; C: control (PDA).

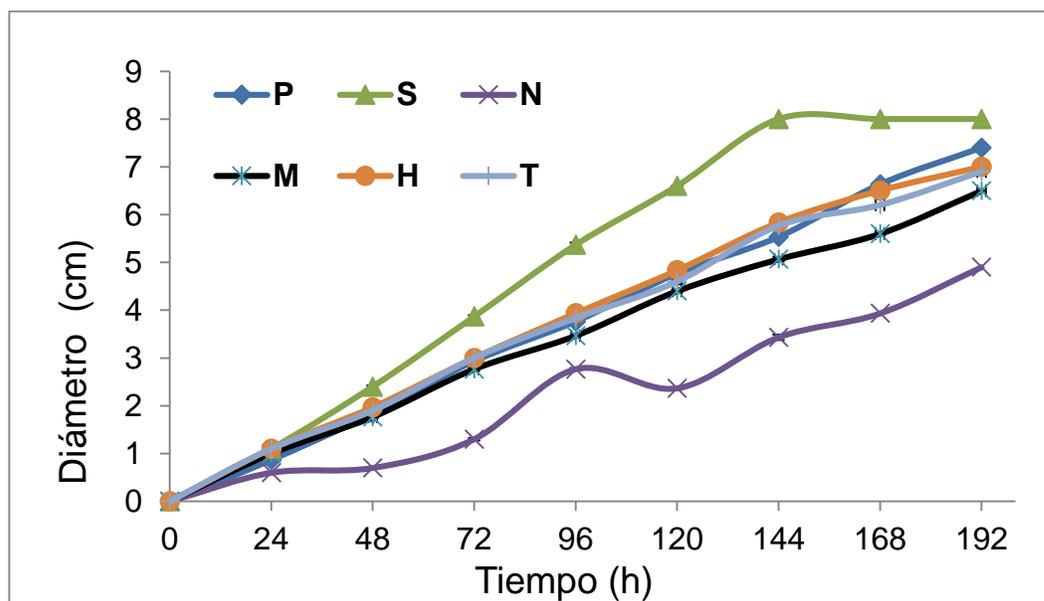


Figura 7. Cinéticas de crecimiento radial de *Aspergillus parasiticus* en medio adicionado con agentes inductores de estrés. P: control (PDA), M: metilglioxal, T: tertbutil hidroperóxido, H: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), S: sorbitol y N: NaCl.

En el caso de los medios adicionados con los inductores de estrés se observó que el NaCl, que induce estrés de tipo osmótico, ocasionó la mayor ($P < 0.05$) inhibición de crecimiento radial sobre *A. parasiticus* (Figura 8). Por su parte, al evaluar el efecto sobre el hongo *A. niger* se observó que los tratamientos con quitosano no inhibieron ($P > 0.05$) (Figura 9) el crecimiento radial con respecto al control, siendo NaCl el único tratamiento efectivo ($P < 0.05$) (figura 9).

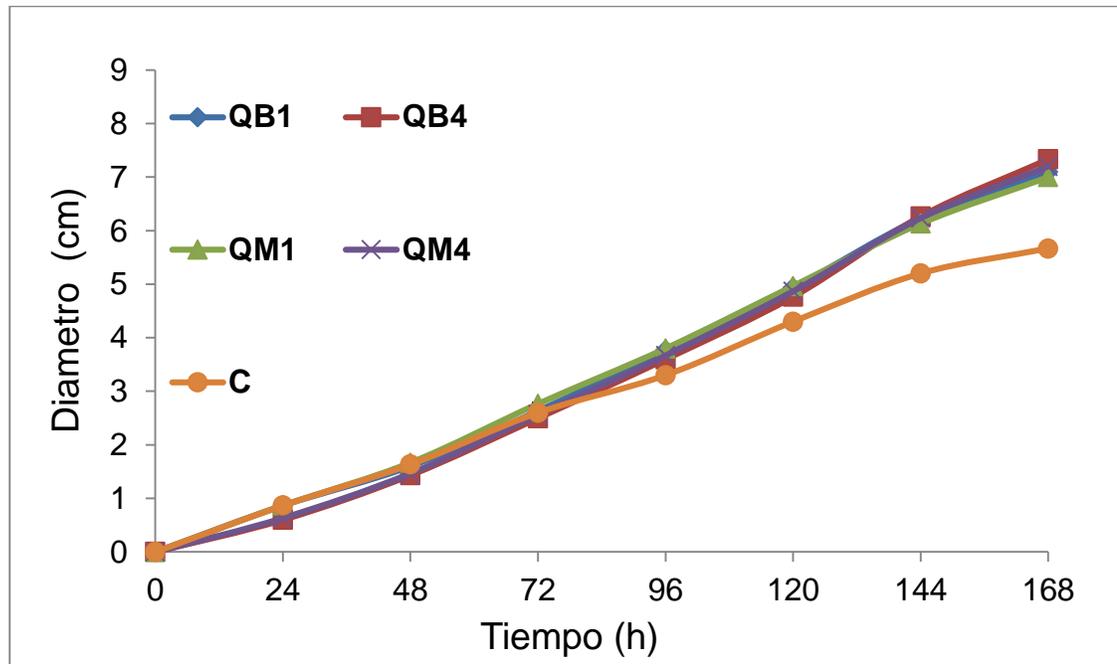


Figura 8. Cinética de crecimiento radial de *Aspergillus niger* en medio adicionado con quitosanos de diferente peso molecular. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente; QM1 y QM4: quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente; C: control (PDA).

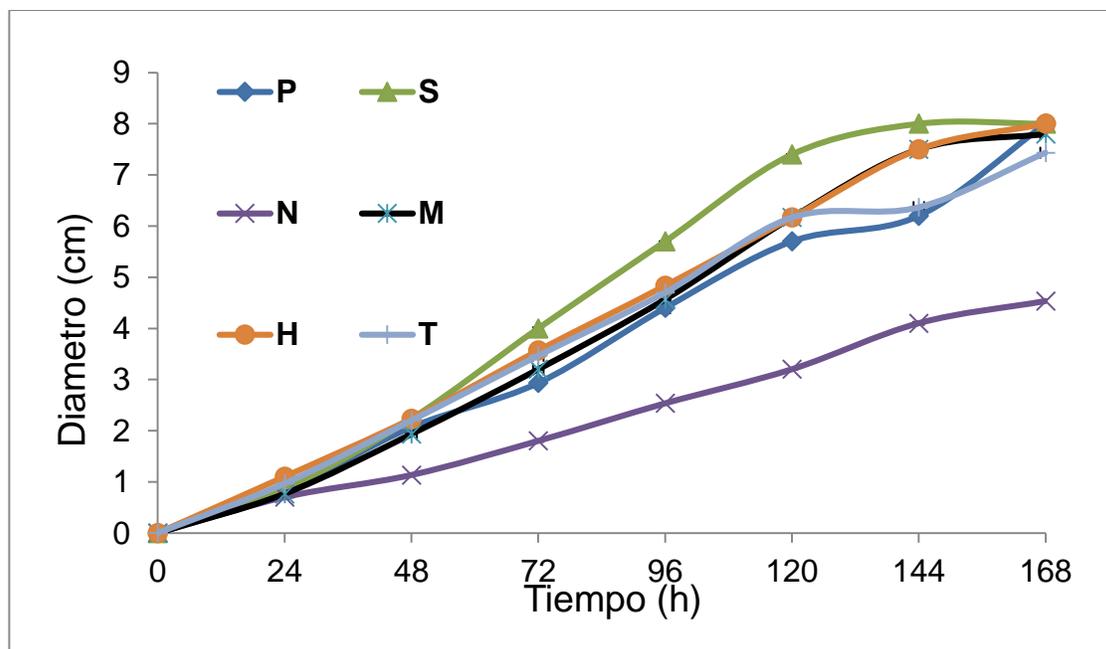


Figura 9. Cinética de crecimiento radial de *Aspergillus niger* en medio adicionado con compuestos inductores de estrés. P: control (PDA), M: metilglioxal, T: tert-butil hidroperóxido, H: peróxido de hidrógeno (H₂O₂), S: sorbitol y N: NaCl.

En la figuras 10 y 11 se muestran el crecimiento micelial de *A. niger* y *A. parasiticus* en los diferentes tratamientos, a las 168 h de incubación a 25°C, respectivamente, pudiéndose observar el efecto en la reducción del diámetro de la colonia en relación al tratamiento implicado en comparación con el control. Se encontró que tanto el quitosano como los agentes inductores de estrés osmótico y oxidativo no presentaron un efecto fungicida sobre *A. parasiticus* y *A. niger*, sino fungistático. Para *A. parasiticus*, el tratamiento con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 1 g/L (QB1) fue el que presentó un mayor efecto inhibitorio en comparación con el tratamiento control, así mismo, el tratamiento con NaCl a una concentración de 0.1 M presentó una reducción significativa ($P < 0.05$) en el crecimiento con respecto al control.

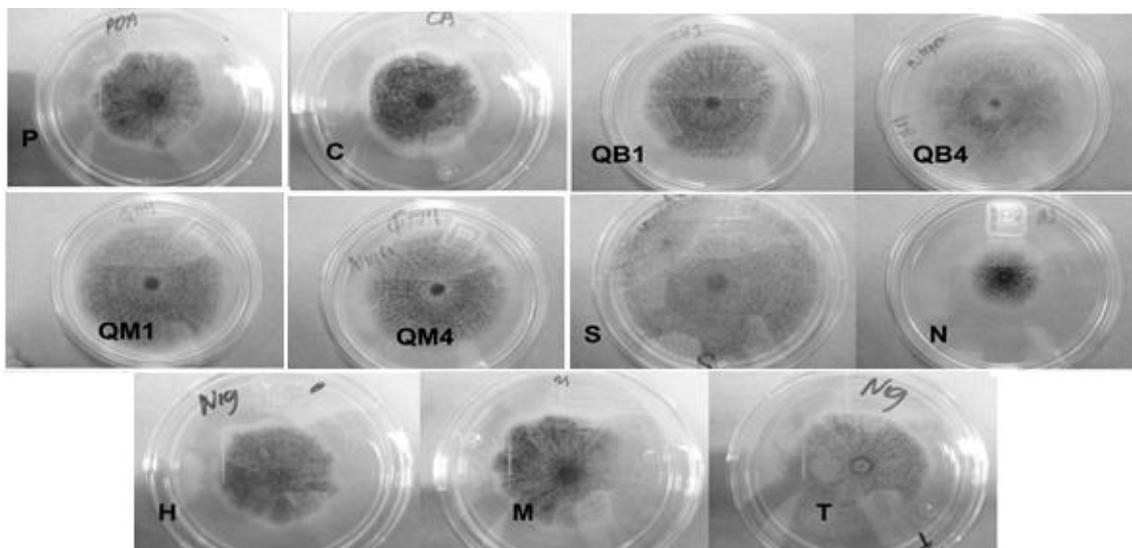


Figura 10. Crecimiento radial de *A. niger* a las 168 h. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a 1 y 4 g/L, QM1 y QM4: quitosano de medio peso molecular a 1 y 4 g/L, S: sorbitol, N: NaCl, P: Control PDA, C: control PDA acidificado, H: Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), M: Metilglioxal y T: Tertbutil hidropoxido.

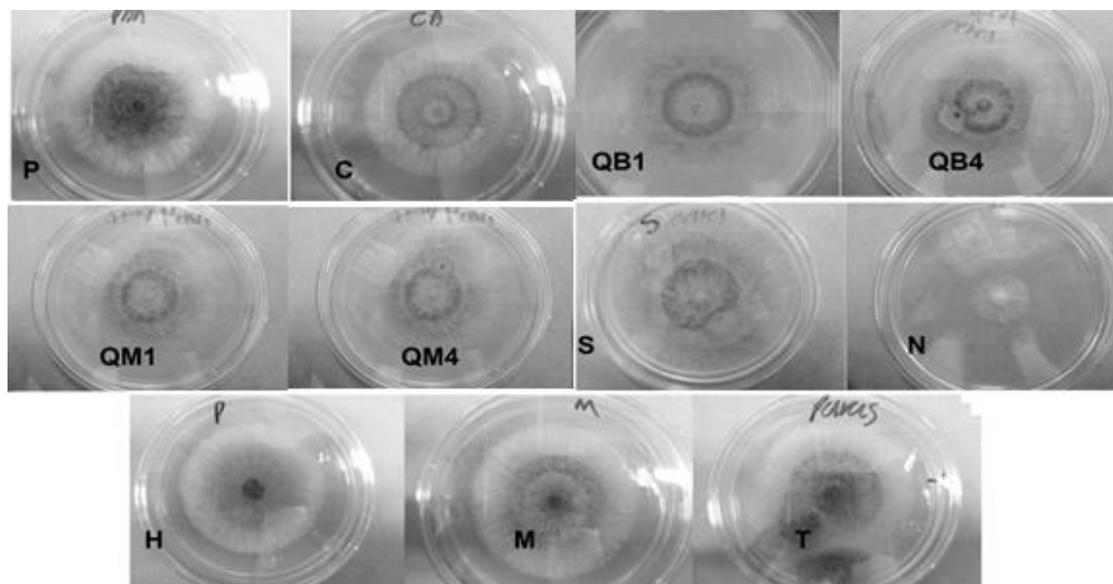


Figura 11. Crecimiento radial de *A. parasiticus* a las 168 h. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a 1 y 4 g/L, QM1 y QM4: quitosano de medio peso molecular a 1 y 4 g/L, S: sorbitol, N: NaCl, P: Control PDA, C: control PDA acidificado, H: Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2), M: Metilglioxal y T: Tertbutil hidropoxido.

Por su parte, para *A. niger*, los tratamientos más efectivos fueron el quitosano de medio peso molecular a una concentración de 1 g/L (QM1) y el tratamiento con NaCl (Tabla 1). Se ha reportado que la actividad antifúngica del quitosano se relaciona con su peso molecular y su concentración (Bautista y col., 2005). Estudios donde se evaluaron distintos pesos moleculares y diferentes concentraciones de quitosano mostraron que la actividad antifúngica del quitosano aumenta cuando el peso molecular es menor de 50 kDa, lo cual se atribuye a los grupos NH₂; conforme aumenta el peso molecular, los grupos amino pueden ser demasiados e interaccionar entre sí, dejando indisponibles la interacciones entre el polímero y los compuestos presentes sobre la superficie celular de *Aspergillus niger*. Por lo tanto, la actividad antifúngica del quitosano disminuyó conforme aumentó su peso molecular (Li y col., 2008).

Tabla 1. Extensión radial y porcentajes de inhibición de *A. niger* y *A. parasiticus* inoculados en medio de cultivo PDA adicionado con diferentes concentraciones de quitosano y agentes causantes de estrés osmótico y oxidativo.

Tratamiento	Crecimiento radial (cm) a 168 h		Porcentaje de inhibición de CR (%)	
	<i>A. niger</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. parasiticus</i>
QB1	7.1±0.01d	3.56±0.05g	11.25±0.00bc	38.15±0.38a
QB4	7.33±0.05bc	6.63±0.05b	8.33±0.72de	0±0.00d
QM1	7±0.00d	5.46±0.05e	12.5±0.00b	5.20±0.05c
QM4	7.2±0.17cd	6.46±0.11b	10±2.16cd	0±0.00d
Control ácido	5.66±0.05e	5.76±0.05d	0.29±0.00fe	0±0.00d
Sorbitol	8±0.00a	8±0.00a	0±0.00g	0±0.00d
NaCl	4.5±0.11f	3.93±0.11f	43.33±1.44a	31.80±1.32b
Metilgloxal	7.8±0.00a	5.60±0.10de	2.5±0.00f	2.87±2.63c
H₂O₂	8±0.00a	6.50±0.00b	0±0.00g	0±0.00d
Tertbutil	7.43±0.05b	6.2±0.10c	7.08±0.72e	0±0.00d
PDA	8±0.00a	6.63±0.05b	-	-

Valores reportados como la media ± la desviación estándar. QB1= quitosano de bajo peso molecular (1 g/L), QB4= quitosano de bajo peso molecular (4 g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1 g/L), QM4 = quitosano medio peso molecular (4 g/L). Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05).

La actividad antifúngica del quitosano sobre *A. niger* es dependiente de la concentración y el peso molecular del biopolímero, pudiéndose concluir que dicha actividad antifúngica se ve disminuida con el aumento del peso molecular y la concentración (Li y col., 2008), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otra parte, algunos autores reportan que el grado de acetilación del polímero es de gran importancia sobre la actividad antifúngica *in vitro*. El Ghaouth y col. (1992) demostraron que quitosanos de similar grado de polimerización y diferentes grados de acetilación presentaron diferentes actividades inhibitorias sobre el crecimiento de *Rhizopus stolonifer*, observando una mayor inhibición en aquellos quitosanos con menor grado de acetilación. Díaz (2001) comprobó que el quitosano de 99% de desacetilación y de elevado carácter poliatómico mostró mayor efecto inhibitorio sobre el hongo *Phytophthora parasitica* comparado con un quitosano de 75% de desacetilación.

Así mismo, al aumentar la concentración también se ve afectada la viscosidad de la solución, reduciendo la interacción biopolímero/microorganismo sobre la superficie celular (Li y col., 2008). Con base a lo anterior, es posible que la actividad inhibitoria de los quitosanos de bajo y medio peso molecular a concentraciones bajas (QB1 y QM1, respectivamente), fueran las más efectivas para disminuir el crecimiento radial de los hongos *Aspergillus niger* y *A. parasiticus*, efecto similar al reportado por Martínez-Camacho y col. (2010) para *A. niger*. Un efecto ligeramente diferente fue reportado por Cota-Arriola y col. (2010), en donde los quitosanos de mayor peso molecular (306 y 171 (mol L⁻¹)) presentaron un mayor efecto fungistático sobre *A. parasiticus*; dichos quitosanos, a demás, tenían un grado de desacetilación mayor (80.9 y 89.7 %DD).

El grado de desacetilación corresponde a la proporción de grupos amino en la cadena polimérica de quitosano; entre mayor sea el porcentaje de desacetilación, mayor es la proporción de grupos amino en la cadena del polímero (Sánchez y col., 2007). Por ello, en general los quitosanos que tienen un mayor grado de desacetilación suelen tener un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Vibrio choleare*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, etc. (Tsai y col., 2002). Estudios previos han mostrado que el quitosano altera la estabilidad de la membrana celular de ciertos tipos de hongos y levaduras, afectando fuertemente su crecimiento y desarrollo; además, es capaz de provocar la inducción de la respuesta al estrés ambiental y también de importantes respuestas

transcripcionales en *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans* y *Candida glabrata* (Zakrzewska y col., 2005).

En relación a los diferentes tratamientos con los compuestos inductores de estrés, el mayor efecto antifúngico se observó en los tratamientos adicionados con los compuestos causantes de estrés osmótico, siendo el tratamiento con NaCl el que presentó el mayor porcentaje de inhibición para ambos hongos (Tabla 1). La reducción del crecimiento producido por el NaCl sobre ambos hongos puede atribuirse a los cambios inducidos en la pared celular del hongo, asociados a desequilibrios en el transporte de agua a través de la célula y a la modificación de la turgencia de la misma, alterando la permeabilidad de la pared celular así como sus mecanismos homeostáticos (Beales, 2004). La presencia del NaCl reduce significativamente el crecimiento in vitro de *Macrophobina phaseolina* (Cervantes-Garcia y col., 2003; Goudarzi y col. 2008; Zhang y col., 2011) en comparación con el testigo, lo que sugiere que el hongo no es capaz de mantener la turgencia en el micelio y contrarrestar el efecto del NaCl. La concentración de solutos modifica y limita la disponibilidad de agua para el crecimiento del hongo (Harris, 1981), lo que explica el uso de salación o salmueras para la conservación de los alimentos a nivel industrial.

En hongos ubicuos como lo es *Aspergillus* sp, la capacidad de sobrevivir a diferentes ambientes como son el suelo (donde las condiciones osmóticas cambian durante la lluvia), la sequía u otras condiciones climáticas, y dentro de los huéspedes que infecta, le confiere una habilidad para compensar los cambios en la osmoralidad de los diferentes ambientes a los que se enfrenta (Fusch y Mylonakis, 2009). Esta capacidad de adaptación se debe a la rápida respuesta del hongo a condiciones osmóticas adversas mediante la activación de cascadas enzimáticas que tienen como principal objetivo el fortalecimiento de la pared celular del hongo mediante la biosíntesis, la organización de la actina y otros eventos necesarios para mantener o reparar la integridad de la pared celular (Fusch y Mylonakis, 2009).

En este estudio, como se puede observar en la Tabla 1, el tratamiento con sorbitol (otro inductor del estrés osmótico) no inhibió el crecimiento de ambos hongos, lo que sugiere que los microorganismos pueden estar utilizando este compuesto como una fuente de carbono y energía mediante su metabolización, favoreciendo el desarrollo y crecimiento de los mismos (Aro y col., 2005).

En células eucariontes, el catabolismo de sorbitol depende de las enzimas sorbitol deshidrogenasa, D-sorbitol oxidasa y D-fructosa oxidasa, enzimas que son activadas o producidas en mayor cantidad por *A. niger* cuando se suplementa el medio de crecimiento con D-sorbitol (Koivistoinen y col., 2012). La fuente de carbono puede afectar el crecimiento y la estabilidad de la pared celular de hongos patógenos (Ene y col., 2012), por lo que es posible que el hongo sea capaz de utilizar el sorbitol como fuente de carbono si éste no causa alteraciones en su morfología o metabolismo.

Las condiciones de estrés osmótico, que reducen la cantidad de agua disponible (A_w) para la célula, ocasionan cambios en la composición lipídica de la membrana celular, incrementándose los niveles de lípidos aniónicos (difosfatidilglicerol y fosfatidilglicerol) y cambiando la composición de ácidos grasos en la membrana (Beales, 2004). Se ha observado que el estrés osmótico causado por la adición de NaCl a los medios de crecimiento de hongos halofílicos y halotolerantes similares a las levaduras (*Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis* y *Aureobasidium pullulans*), ocasionó un incremento en la insaturación de los ácidos grasos de una de las cepas halofílicas y en la halotolerante, observando que la proporción de esteroides/fosfolípidos fue más baja en los hongos halofílicos y mucho mayor en la levadura halosensible *S. cerevisiae* (Turk y col., 2004). Un aumento en la insaturación de los ácidos grasos resulta en una mayor fluidez de la membrana celular, por lo que los hongos halofílicos tienen una mayor fluidez de la membrana (Turk y col., 2004).

Por otro lado, en lo que respecta al tratamiento con compuestos asociados a estrés oxidativo, se observó que el tratamiento con H_2O_2 no inhibió el crecimiento de ninguno de los dos hongos estudiados. Lo anterior se puede deber a que la producción de H_2O_2 por parte de estos hongos puede ser endógena o exógena y presentarse bajo diferentes condiciones, es posible que estos hongos estén adaptados a la presencia del peróxido en el medio (Beltrán-García, 2006).

Se ha reportado que *A. niger* tratado con diferentes cantidades de H_2O_2 demostró tener capacidad de adaptación mediante la disminución de su crecimiento y el aumento en la producción de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, también se ha observado que *A. niger* es capaz de soportar concentraciones de H_2O_2 exógenas por arriba de 100 mM y adaptarse a 20 mM después de haber sido pretratado con H_2O_2 (Li y col., 2008). Además, la actividad de sus enzimas

antioxidantes tienen su máximo a las 4 h de incubación en presencia de peróxido, después de lo cual el crecimiento del hongo continúa y la producción de las enzimas baja (Li y col., 2008).

Resultados similares se han encontrado para *Sphaeropsis sapinea* y *Trichoderma harzianum*, ambos hongos ligninolíticos, cuando fueron tratados con quitosano de bajo peso molecular y H_2O_2 , observando que el quitosano tiene un mayor efecto inhibitorio que el peróxido para el caso de *S. sapinea* pero no así para *T. harzianum* (Singh y col., 2008); esto podría ser indicador de un efecto en la sensibilidad de la especie al tratamiento con H_2O_2 , como ocurre en el caso del quitosano (Palma-Guerrero y col., 2008). Dicha sensibilidad al efecto del quitosano depende principalmente de la composición de la pared celular, la primera línea de defensa de la célula contra los agentes oxidantes del medio o producidos por el huésped infectado. La célula fúngica es capaz de sentir diferentes estímulos externos, entre ellos los agentes oxidantes, y responder mediante una vía de trasducción de señales y de tal forma protegerse de los agentes oxidantes del medio (Fusch y Mylonakis, 2009; Bahn y col., 2007).

En el caso de tratamiento con tertbutil hidroperóxido (un peróxido orgánico), se observó un comportamiento similar al encontrado en los tratamientos con quitosanos de medio y bajo peso molecular a las concentraciones más altas probadas, para el hongo *A. niger* (Tabla 1). Ciertos hongos, como *Fusarium solani*, tienen la capacidad de transformar el metil tertbutil éter y el tertbutil alcohol (derivados de la gasolina) en productos menos tóxicos mediante acción enzimática e incluso pueden llegar a ser utilizados como fuente de carbono y energía (Magaña-Reyes y col., 2005).

Al evaluar el efecto del metilglioxal se encontró un porcentaje de inhibición ligeramente mayor al presentado por el H_2O_2 . El metilglioxal puede resultar tóxico incluso a concentraciones bajas (dosis milimolares) ya que es altamente reactivo con proteínas, ADN, entre otros compuestos, causando estrés oxidativo en la célula. Sin embargo, este compuesto puede ser biosintetizado vía metilglioxal sintasa por diferentes especies de microorganismos (Aguilera y Prieto, 2001). Además se ha reportado que las condiciones de estrés osmótico pueden aumentar la producción endógena de metilglioxal en células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Considerando lo anterior, es posible que en los hongos *Aspergillus* tratados en este trabajo exista un mecanismo similar para lograr la adaptación a concentraciones de metilglioxal extracelular que proteja a la célula de daño o muerte.

Estudios posteriores sobre la composición de la membrana celular de los hongos tratados con quitosano y con agentes oxidantes podrían ser útiles para proporcionar más información sobre los mecanismos de acción al usar compuestos antifúngicos combinados. Esta información impactará positivamente en aplicaciones diversas, tanto en el campo y en los sistemas de desarrollo de empaques o de conservación de alimentos contra hongos fitopatógenos, como en el tratamiento de hongos patógenos de humanos.

Velocidad de Crecimiento

Las velocidades de crecimiento se estimaron a partir de las pendientes de las rectas de las cinéticas de crecimiento radial de la colonia *versus* tiempo. Para *Aspergillus parasiticus*, los tratamientos que presentaron mayor inhibición sobre la velocidad de extensión radial fue el quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 1g/L (QB1) y el tratamiento con cloruro de sodio (NaCl), ambos comparados con el tratamiento control. Para *Aspergillus niger*, el único tratamiento que logró reducir la velocidad de crecimiento con respecto al control fue NaCl (Tabla 2). Los demás tratamientos no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) sobre la velocidad de extensión radial.

En estudios previos han reportado que el peso molecular y la concentración son factores claves para explicar la actividad antifúngica del quitosano contra diferentes hongos, incluyendo *A. niger* (Li y col., 2008). Observaciones utilizando quitosano marcado con isotiocianato de fluoresceína mostraron que la actividad antifúngica sobre *A. niger* puede ser causada principalmente por la inhibición de la transcripción de ADN a ARN, ya que dicho quitosano marcado se observó dentro de la célula (Li y col., 2008). Este mecanismo implica la muerte de las células y por ende la disminución o total inhibición del crecimiento observado a simple vista mediante la extensión radial de las colonias. Cota-Arriola (2010) reportó que tratamientos con quitosano reducen la velocidad de crecimiento radial de *A. parasiticus* un 50% en comparación con el control.

La velocidad de extensión radial de ambos hongos inoculados en los medios con sorbitol se vio aumentada en comparación con los controles, lo cual sugiere que ambas especies son capaces de utilizar sorbitol como fuente de carbono, ocasionando un aumento en el crecimiento. Estudios realizados en 4 diferentes especies de hongos (*Wallemia sebi*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium amstelodami* y *Penicillium chrysogenum*) mostraron que la velocidad de crecimiento es mayor en un medio adicionado con sorbitol; además se observó que a diferentes condiciones

de temperatura y humedad sólo existe crecimiento en presencia de sorbitol (Patriarca y col., 2006).

Tabla 2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la velocidad de extensión radial de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*.

Tratamiento	<i>A. parasiticus</i>		<i>A. niger</i>	
	Velocidad (cm/h)	R ²	Velocidad (cm/h)	R ²
Control ácido	0.035±0.000d	0.993	0.034±0.000f	0.996
QB1	0.023±0.000g	0.964	0.045±0.000e	0.994
QB4	0.040±0.001b	0.997	0.047±0.000c	0.988
QM1	0.035±0.000d	0.980	0.044±0.000e	0.997
QM4	0.038±0.000bc	0.998	0.047±0.001cd	0.991
Control	0.038±0.000b	0.999	0.048±0.000c	0.992
Sorbitol	0.044±0.000a	0.953	0.054±0.000a	0.964
NaCl	0.025±0.000f	0.962	0.028±0.000g	0.995
Metilglioxal	0.032±0.000e	0.995	0.052±0.000a	0.088
H ₂ O ₂	0.036±0.000cd	0.993	0.050±0.000b	0.994
Tert-butil	0.035±0.000d	0.993	0.045±0.001de	0.986

QB1= quitosano de bajo peso molecular (1 g/L), QB4= quitosano de bajo peso molecular (4 g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1 g/L), QM4 = quitosano medio peso molecular (4 g/L). Los datos representan el promedio de tres réplicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P<0.05).

Un estudio donde se evaluaron diferentes parámetros de crecimiento de *R. oryzae* mostró que la reducción de la velocidad de crecimiento fue mayor al emplear NaCl en comparación con el uso de sacarosa y glicerol (Carrillo-Inungaray, 2006), obteniendo resultados similares al utilizar NaCl sobre *A. niger* y *A. parasiticus*, logrando reducir la velocidad de crecimiento.

Los resultados obtenidos en los medios con los tratamientos los inductores de estrés oxidativo; metilglioxal y H₂O₂ (M y H) mostraron diferencias significativas (p<0.05) con respecto

al control; estos resultados son coherentes con los conceptos y definiciones de fase de latencia y de crecimiento, pues se espera que el bajo metabolismo inducido por las condiciones de estrés afecte sólo a la fase de latencia y que, una vez que el desarrollo inicie, la velocidad de crecimiento permanezca invariable (Baranyi y col., 1993).

B) Germinación de esporas de *A. niger* y *A. parasiticus* en medio sólido adicionado con quitosano de diferente peso molecular e inductores de estrés osmótico y oxidativo.

El análisis de la germinación de esporas se llevó a cabo mediante el conteo de las esporas germinadas en microscopio óptico, en dos intervalos de tiempo, a las 8 y 14 horas. Para *A. niger*, los tratamientos que ocasionaron la germinación de un menor porcentaje de esporas fueron el quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 1g/L (QB1), el quitosano de medio peso molecular a una concentración de 1 y 4 g/L, y los tratamientos con NaCl y metilglioxal, los cuales mostraron un porcentaje de germinación del 0% en comparación con su respectivo control, a las 8 h de incubación (Tabla 3). Para *A. parasiticus*, los tratamientos en donde se observó un menor porcentaje de germinación de esporas fueron QB1, QM1, NaCl y metilglioxal, con un 0% de germinación con respecto al control (Tabla 3), a las 8 horas.

Sin embargo, a las 14 horas de incubación se encontró un 100% de germinación de esporas en la mayoría de los tratamientos. A este tiempo se observó que los tratamientos QB1 y NaCl resultaron ser más efectivos para retardar el crecimiento de *Aspergillus niger*, al encontrar valores de germinación de esporas por debajo del 50% en comparación con los demás tratamientos, mientras que en *A. parasiticus* se observó un porcentaje mayor a 80% de germinación de esporas (Tabla 3).

En los tratamientos con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 1 g/L (QB1) se encontró un menor porcentaje de germinación debido posiblemente a una mayor interacción con la pared celular del hongo en comparación con el quitosano a mayor concentración (QB4), ya que por tener mayor cantidad de grupos amino, estos pueden interactuar entre ellos dejando menos grupos libres para interactuar con las cargas superficiales de la membrana celular.

Tabla 3. Porcentaje de germinación de esporas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* inoculados en medio PDA adicionado con diferentes tratamientos, a 25±2°C.

Tratamiento	Germinación de esporas (%) a las 8 h		Germinación de esporas (%) a las 14 h	
	<i>A. niger</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. parasiticus</i>
QB1	0±0.00e	0±0.00d	23.5±2.12d	79.0±5.65c
QB4	7.02±1.09d	53.0±5.65b	69.0±8.48bc	92.0±4.24ab
QM1	0±0.00d	0±0.00d	49.5±9.19c	88.5±2.12b
QM4	0±0.00d	11.5±4.94cd	80.5±7.77ab	97.5±0.70ab
Control Ácido	59.5±3.53b	60.0±8.48b	91.5±9.19ab	100±0.00a
Sorbitol	10.0±2.82cd	10.0±4.24cd	100±0.00a	100±0.00a
NaCl	0±0.00d	0±0.00d	49.0±7.07c	6.5±2.12d
Metilglioxal	0±0.00d	0±0.00d	92.0±4.24ab	100±0.00a
H₂O₂	5.5±2.12d	27.5±9.19c	100±0.00a	100±0.00a
Tertbutil	18.5±6.36c	14.0±7.07cd	100±0.00a	100±0.00a
PDA	89.5±2.12a	87.5±3.53 ^a	100±0.00a	100±0.00a

Valores reportados como la media ± la desviación estándar. QB1= quitosano de bajo peso molecular (1 g/L), QB4= quitosano de bajo peso molecular (4 g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1 g/L), QM4= quitosano medio peso molecular (4 g/L). Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0,05).

Se han propuesto diferentes mecanismos por los que el quitosano puede actuar sobre los microorganismos e inhibir su crecimiento y desarrollo. Se plantea la permeabilidad de la membrana citoplasmática mediante la interacción de sus grupos NH³⁺ con componentes fosfolipídicos cargados negativamente en las membranas, con lo que se altera el intercambio con el medio, además de la formación de quelatos con los metales de transición y la inhibición de algunas enzimas. El biopolímero puede actuar a nivel molecular, sobre los ácidos nucleicos y alterar sus funciones, mediante cambios transcripcionales específicos, o inducir alteraciones estructurales de las células fungosas tales como la presencia de vesículas en el micelio, células sin contenido citoplasmático, otras desorganizaciones celulares que abarcan la excesiva

ramificación y ensanchamiento de la pared celular, la pérdida de la misma y hasta la desintegración del citoplasma (Ayala y col., 2014).

El tratamiento con NaCl redujo el porcentaje de germinación, lo que se puede atribuir a los cambios que produce en la permeabilidad de la membrana celular así como la modificación en el intercambio de iones esenciales para el metabolismo del hongo, modificando las vías bioquímicas implicadas en el transporte de agua en la célula (Cook, 1981; Gonzalez-Hernández, 2002). Por otra parte, la germinación de esporas de algunos hongos micorrizas (*Gigaspora decipiens*) se puede inhibir por concentraciones crecientes de NaCl, que se puede deber a efectos osmóticos o de toxicidad (McMillen y col. 1998).

En cuanto a los tratamientos inductores de estrés oxidativo, el tratamiento con metilglioxal fue el más efectivo al reducir a 0% la germinación de esporas de ambos hongos, a las 8 h de incubación. Las proteínas mitocondriales (esenciales para la producción de energía) pueden ser modificadas por reacciones de glicación inducidas por compuestos dicarbonilo procedentes del metabolismo, tales como el glioxal y el metilglioxal. Estas modificaciones provocan cambios estructurales y funcionales en las proteínas implicadas. A su vez, la modificación del proteoma mitocondrial por estos compuestos dicarbonilo puede inducir disfunción mitocondrial y acentuar un estado de estrés oxidativo (Naudí y col., 2010), lo que podría haber ocasionado la reducción en la germinación de esporas de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger* (Tabla 3).

El tratamiento con sorbitol añadido al medio favoreció la germinación de esporas de los hongos *Wallemia sebi*, *Eurotium chevalieri*, *Eurotium amstelodami* y *Penicillium chrysogenum* al reducir el tiempo necesario para su germinación, lo que a su vez puede verse expresado en una mayor velocidad de extensión radial de la colonia (Patriarca y col. 2006). En las primeras horas de incubación se observó una reducción de la germinación de las esporas comparada con el control, lo cual es similar a lo observado en los tratamientos con quitosano y con terbutil hidroperóxido para las dos especies de *Aspergillus* analizadas en este estudio. Sin embargo, a un mayor tiempo de germinación, dicho comportamiento cambió llegando a presentar valores de 100% de germinación.

C) Análisis morfométrico de esporas e hifas de *A. niger* y *A. parasiticus* en medio sólido adicionado con quitosano de diferente peso molecular e inductores de estrés osmótico y oxidativo.

El análisis morfométrico de las esporas de ambas especies no mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos con los quitosanos de diferente peso molecular, a las diferentes concentraciones probadas. Sin embargo, se encontró un aumento en el diámetro de las esporas en comparación con el control, indicando que la presencia de quitosano provoca un hinchamiento en las esporas (Tabla 4). Plascencia-Jatomea (2004) reportó que la presencia de quitosano aumenta el diámetro promedio de las esporas de *Aspergillus niger* en medio adicionado con soluciones de quitosano.

El efecto fungistático del biopolímero puede deberse a modificaciones morfológicas de las células fúngicas, como lo han demostrado varios estudios en diversos hongos y observados mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Plascencia-Jatomea y col. (2003) encontraron que el quitosano indujo la agregación de las esporas de *A. niger* y cambios morfológicos en las mismas. De manera similar, un estudio realizado por Hernandez-Lazaurdo y col. (2008) sobre *Rhizopus stolonifer* mostró que las esporas tratadas con quitosano presentaron un aumento en el número y profundidad de los surcos de las esporas, modificando por lo tanto la estructura de la espora. Esto podría traer como consecuencias modificaciones en el tiempo de germinación (Plascencia-Jatomea y col. 2003).

Plascencia-Jatomea (2004) reportó que el quitosano en solución, añadido al medio de cultivo, provoca un incremento drástico del diámetro de las hifas conforme incrementa la concentración de quitosano. Dicho aumento puede deberse a una afección de la pared celular o a cambios en la presión y tensión de la pared (Martínez-Camacho, 2009). Muzzarelli y col. (2001) realizaron estudios de SEM con quitosanos químicamente modificados evaluando el efecto sobre el crecimiento de *Sapolegnia parasitica*, encontrando modificaciones estructurales como distorsión y retracción de las hifas, alteraciones en el contenido citoplasmático y disociación o daño en la pared y la membrana celular. Plascencia-Jatomea (2004) encontró también deformaciones de las hifas y daños en la superficie de las mismas en *A. niger* inoculado en medio con quitosano.

Tabla 4. Análisis morfométrico de esporas e hifas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* inoculado en medio adicionado con los diferentes tratamientos, en medio sólido.

Tratamiento	Diámetro de esporas (μm) a 8 h		Longitud de hifas (μm) a 14 h	
	<i>A. niger</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. parasiticus</i>
QB1	58.5 \pm 12bc	61.4 \pm 8.9bc	61.0 \pm 9.1abc	68.3 \pm 8.9ab
QB4	59.3 \pm 8.3bc	61.0 \pm 8.9bc	67.6 \pm 10.8a	66.0 \pm 9.9abc
QM1	61.0 \pm 13.1bc	63.5 \pm 11.2bc	59.2 \pm 10abc	69.6 \pm 8.8abc
QM4	65.0 \pm 10.2bc	64.5 \pm 10.8b	61.7 \pm 9.5ab	68.2 \pm 10ab
Control ácido	47.0 \pm 8.7d	47.1 \pm 11.5d	54.7 \pm 5.1bc	55.4 \pm 6.4abcd
Sorbitol	27.3 \pm 5.2e	27.4 \pm 5.23e	54.4 \pm 19.4bc	62.2 \pm 9.7bcd
NaCl	46.6 \pm 5.9d	48.7 \pm 6.75	53.6 \pm 5.7c	-
Metilglioxal	60.2 \pm bc	57.6 \pm 16.6c	62.7 \pm 8.7ab	56.9 \pm 7.8d
H₂O₂	72.2 \pm 8.8a	74.2 \pm 11.2a	61.5 \pm 10abc	65.0 \pm 13abc
Tertbutil	63.7 \pm 19bc	72.6 \pm 9.6a	56.9 \pm 5.6bc	71.5 \pm 14a
PDA	65.2 \pm 15.3b	66.9 \pm 12.9b	58.5 \pm 9.9abc	59.9 \pm 8.8cd

Valores reportados como la media \pm la desviación estándar. QB1= quitosano de bajo peso molecular (1 g/L), QB4= quitosano de bajo peso molecular (4 g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1 g/L), QM4 = quitosano medio peso molecular (4 g/L). Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Al evaluar el efecto de los compuestos inductores de estrés osmótico sorbitol y NaCl (S y N) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al tratamiento control (P). Los compuestos redujeron significativamente el diámetro de las esporas, lo cual afecta la germinación de la misma (Patriarca y col., 2006). Hongos como *Aspergillus spp.* poseen la capacidad de compensar cambios en la osmolaridad del medio ambiente para mantener la turgencia de la célula fúngica, el volumen y el medio ambiente intracelular apropiado para reacciones bioquímicas esenciales asociadas al metabolismo del hongo (Hohmann y col., 2007; Fuchs y Mylonakis, 2009). En este trabajo, al analizar la longitud promedio de las hifas de ambos hongos, a las 14 h, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) y sus respectivos controles (Tabla 4).

En las figuras 12 y 13 se observan imágenes obtenidas por microscopía óptica de las estructuras de los hongos, desarrolladas en presencia de los diferentes tratamientos aplicados. Es posible evidenciar el efecto en los diámetros, así como las alteraciones en la membrana celular. Tal es el caso de *A. niger* desarrollado en el tratamiento con sorbitol, donde se observa una desorganización en la membrana celular provocando ensanchamiento y modificación en la forma de las esporas en comparación con el tratamiento control.

En los tratamientos con los diferentes quitosanos no se encontraron alteraciones a simple vista en comparación con el control. Sin embargo, herramientas más sensibles como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) han mostrado que el uso de quitosano de 50 kDa provoca alteraciones en la membrana celular de *A. niger*, pudiendo penetrar en el interior de la célula provocando la destrucción incluso del nucleolo en la célula. Por otra parte se ha observado el ensanchamiento de la membrana celular externa, reduciendo principalmente la germinación de esporas. El quitosano con un peso molecular de 1000 kDa promueve el crecimiento de *A. niger* y acelera su división celular. Todas las observaciones anteriores demuestran claramente que el quitosano inhibe el crecimiento de *A. niger* (Li y col., 2008).

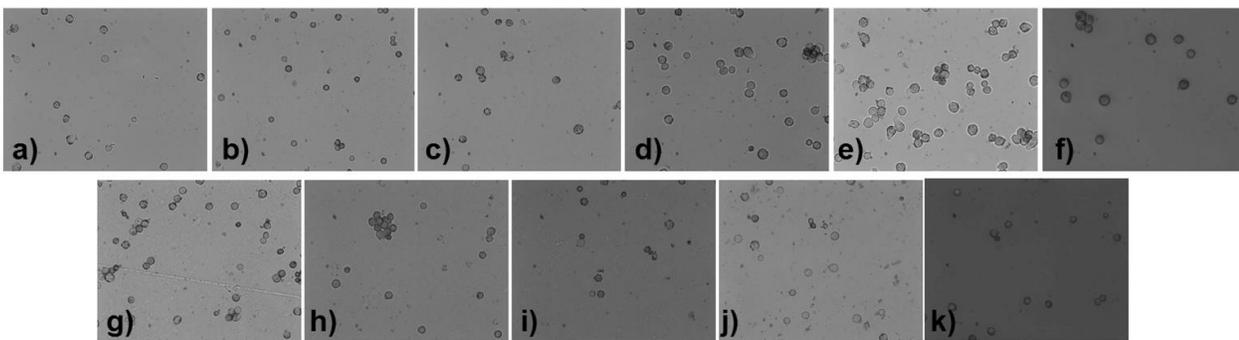


Figura 12. Esporas de *A. niger* inoculado en diferentes tratamientos inductores de estrés y quitosano, a las 8 horas, a 25°C, a 40X. a) PDA b) NaCl; c) Metilglioxal; d) H₂O₂; e) Tertbutil; f) SorbitolA; g) QB1; h) QB4; i) QM1; j) QM4 y k) Control acidificado

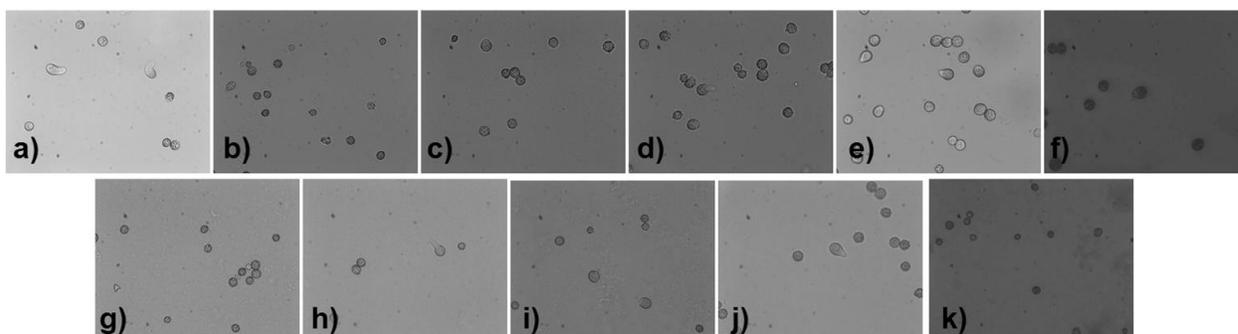


Figura 13. Esporas de *A. parasiticus* inoculado en diferentes tratamientos inductores de estrés y quitosano, a las 8 horas, a 25°C a 40X. a) Sorbitol; b) NaCl; c) Metilglioxal; d) H₂O₂; e) Tertbutil; f) PDA; g) QB1; h) QB4; i) QM1; j) QM4 y k) Control ácido.

Etapla 2. Estudio del efecto antimicrobiano del pre-tratamiento con quitosano seguido de la aplicación de inductores de estrés osmótico y oxidativo, así como el pre-tratamiento con inductores de estrés osmótico y oxidativo seguido del tratamiento con quitosano sobre el crecimiento radial, germinación de esporas y morfometría de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en medio de cultivo sólido.

A) Crecimiento radial de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en medio sólido pre-tratado con quitosano seguido de tratamientos inductores de estrés osmótico y oxidativo.

En las figuras 14 y 15 se presentan las cinéticas de crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger* pre-tratados con quitosano seguido de la aplicación de inductores de estrés. Al inocular el hongo previamente desarrollado en los medios con sólo quitosano, en los medios con los agentes inductores de estrés, se observó que el pre-tratamiento de quitosano seguido con NaCl presentó un mejor efecto en la reducción del crecimiento radial de *A. parasiticus* con respecto a los demás tratamientos (Figura 14). Para *A. niger*, el tratamiento que presentó mayor reducción del crecimiento radial fue el tratamiento con quitosano seguido con metilglioxal y con NaCl, presentando éste último una mayor reducción en la cinética de crecimiento comparado con el tratamiento individual (sólo NaCl) (Figura 15).

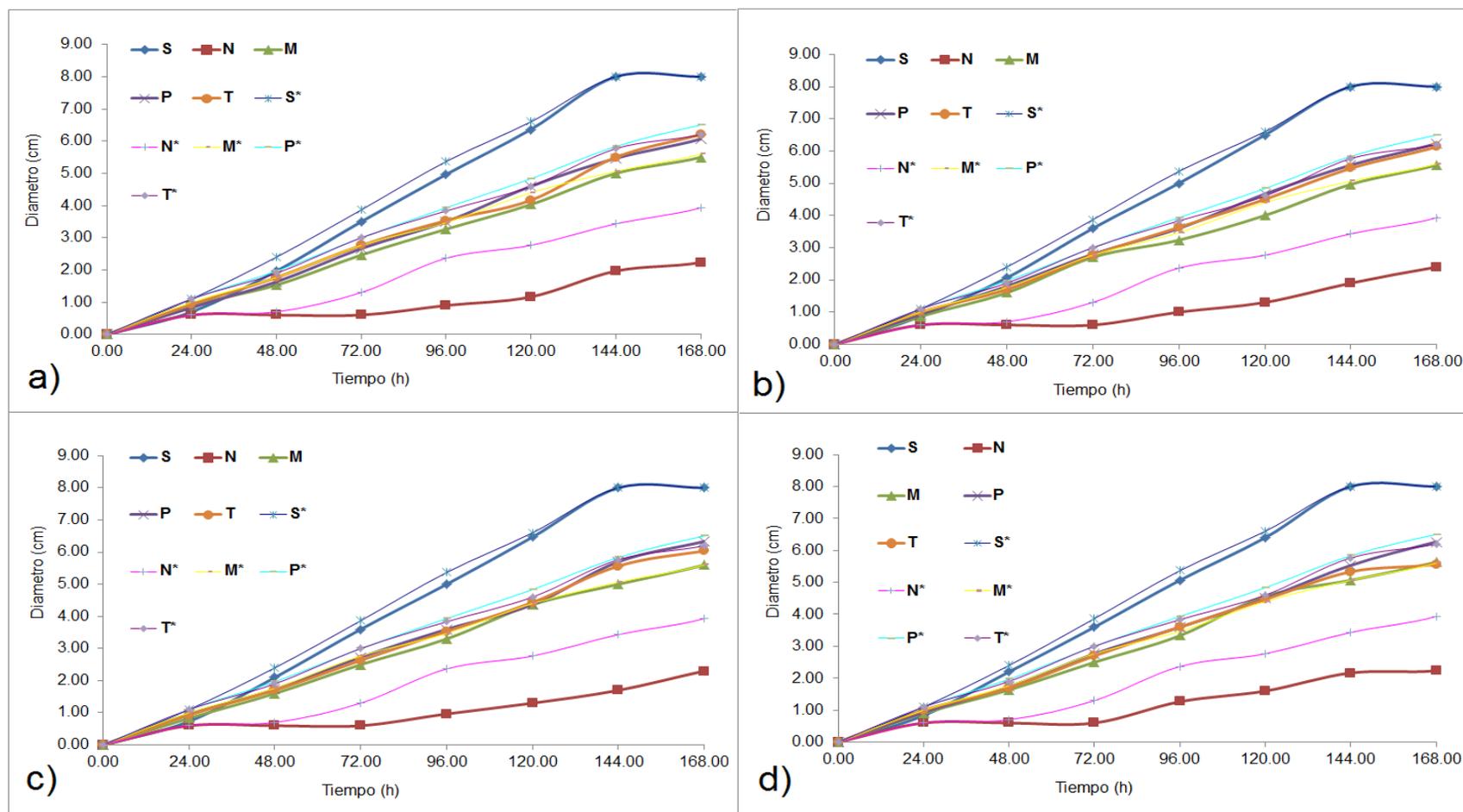


Figura 14. Crecimiento radial de *A. parasiticus* en tratamientos combinados. Desarrollo previo del hongo en medios con quitosano: a) QB1, b) QB4, c) QM1 y d) QM4, sembrado posteriormente en medios adicionados con los agentes inductores de estrés osmótico y oxidativo. M: metilglioxal, T: tert-butil hidroperóxido, H: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), N: NaCl. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. QM1 y QM4: quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. *Tratamiento individual.

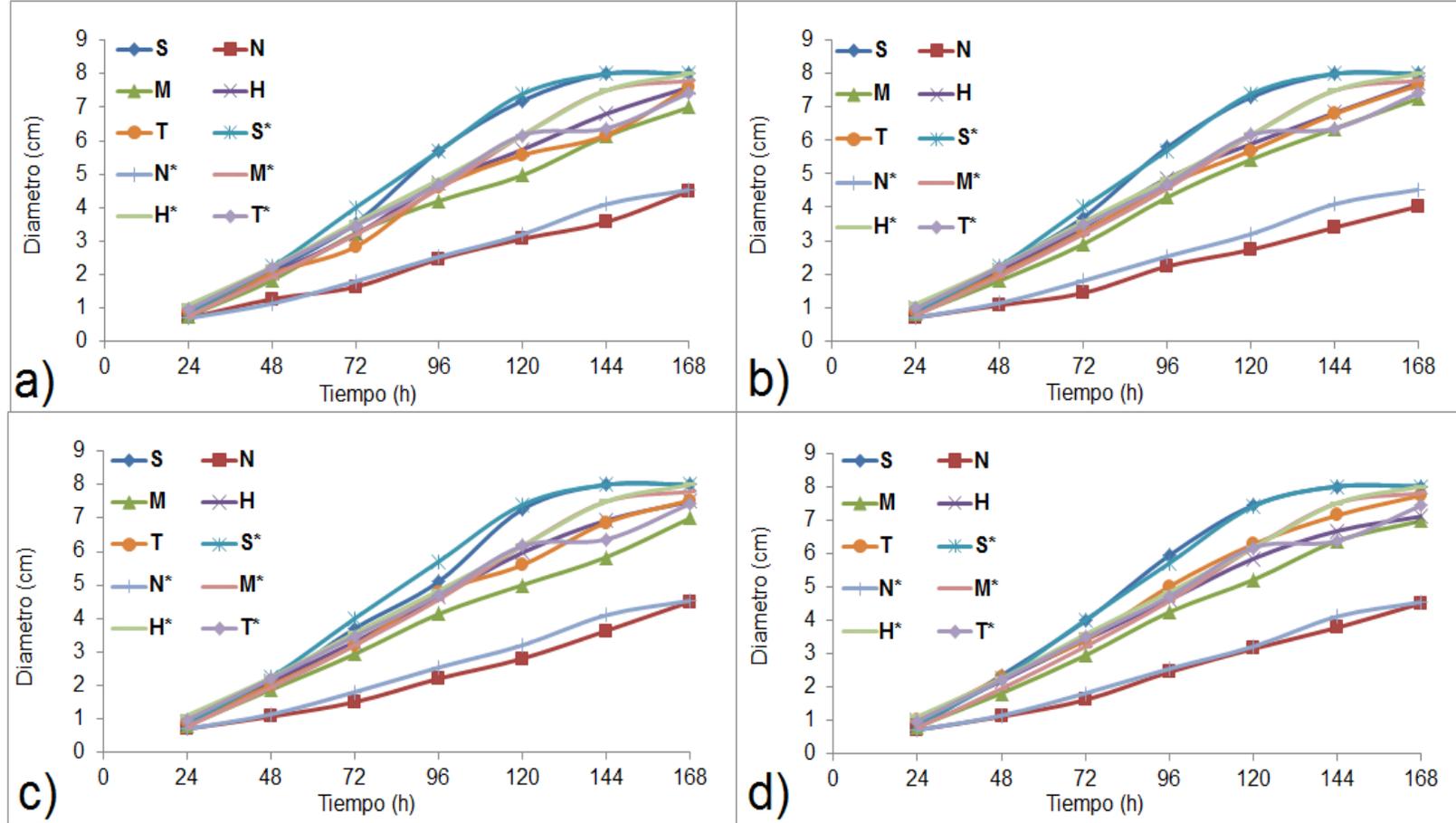


Figura 15. Crecimiento radial de *A. niger* en tratamientos combinados. Desarrollo previo del hongo en medios con quitosano: a) QB1, b) QB4, c) QM1 y d) QM4, sembrado posteriormente en medios adicionados con los agentes inductores de estrés osmótico y oxidativo. M: metilglioxal, T: tert-butil hidroperóxido, H: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), N: NaCl. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. QM1 y QM4: quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. *Tratamiento individual.

En las figuras 16 y 17 se presentan las cinéticas de crecimiento de *A. parasiticus* y *A. niger*, donde el hongo previamente desarrollado en los medios con agentes inductores de estrés osmótico (NaCl y sorbitol) y oxidativo (tert-butil, metilglioxal y peróxido de hidrogeno) fue resembrado en los medios adicionados con los diferentes tipos de quitosano (QB1, QB4, QM1 y QM4). En combinación con los quitosanos de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4 g/L (QB4 y QM4), todos los agentes inductores de estrés osmótico y oxidativo resultaron ser efectivos para reducir el crecimiento radial de *A. parasiticus*, con respecto a los tratamientos individuales (Figura 15). Para el hongo *A. niger* se observó un efecto similar sobre el crecimiento micelial, a excepción de la combinación de peróxido de hidrogeno y quitosanos, donde el crecimiento fue prácticamente igual al tratamiento individual (Figura 17).

El efecto antifúngico del quitosano ha sido reportado en diferentes estudios. El quitosano de medio peso molecular, a una concentración de 3 y 5 g/L, mostró un 73% de inhibición sobre el crecimiento radial de *A. niger* en comparación con el control (Plascencia-Jatomea y col., 2003). Por otra parte, estudios en suelos mostraron que el crecimiento de los hongos *Mericilla nidulans*, *Penicillium canescens*, *Syncephalastrum racemosum* y *Aspergillus parasiticus* se reduce al aumentar la concentración de NaCl (Al-Tamie, 2014). Con base a lo anterior, es posible que los hongos evaluados en este estudio, al exponerse a concentraciones de NaCl, no pudieran mantener una estabilidad en la membrana celular al aumentar la concentración de solutos, limitando el agua disponible para el crecimiento del hongo (Harris, 1981).

En el presente trabajo se observó que el efecto del pre-tratamiento con quitosano seguido con sorbitol no presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en ambos hongos, lo que se puede atribuir a que el sorbitol actúa como un intermediario o subproducto de la utilización de la glucosa para la obtención de energía, lo cual ha sido reportado por Maclean y Scoot (1976) en el hongo *Puccinia graminis*. Rhoades y Roller (2000) reportaron que el crecimiento de *Candida sp.* se redujo al tratarse con quitosano, sin embargo se observó que el crecimiento se reanudó, lo que se puede deber a la resistencia adquirida de la levadura al biopolímero, bien a que gran parte del quitosano se había eliminado de la solución, incluso por la unión de este con otras células levaduriformes. Es posible que al utilizar la combinación de quitosano con sorbitol, los grupos amino funcionales del quitosano presente en el medio de cultivo no interactúen con la membrana celular del hongo, evitando la inhibición del crecimiento de ambos hongos.

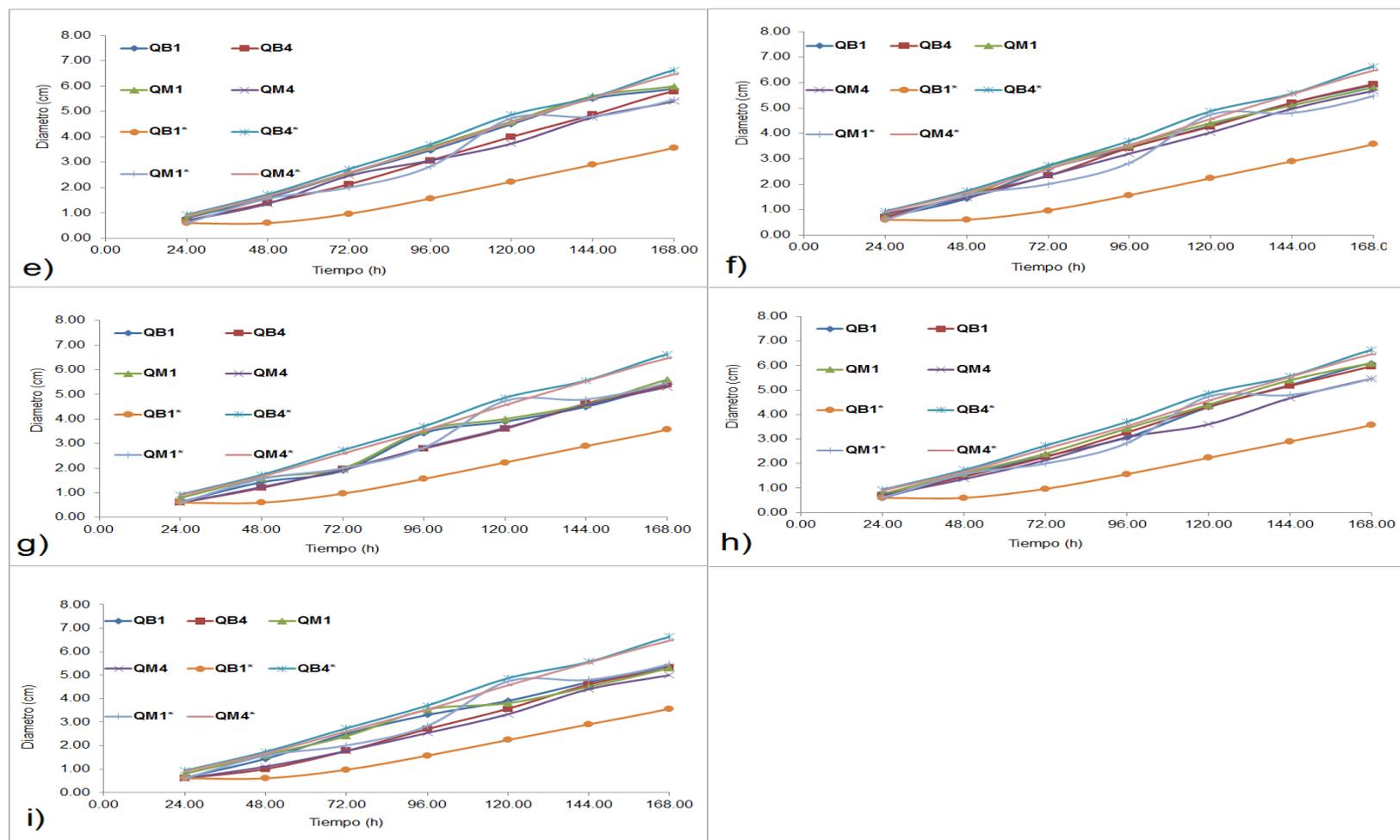


Figura 16. Crecimiento radial de *A. parasiticus* en tratamientos combinados. Desarrollo previo del hongo en medios con: e) sorbitol, f) NaCl, g) metilglioxal, h) H_2O_2 y i) tert-Butil, sembrado posteriormente en medios adicionados con los quitosanos. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. QM1 y QM4 quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. *Tratamiento individual.

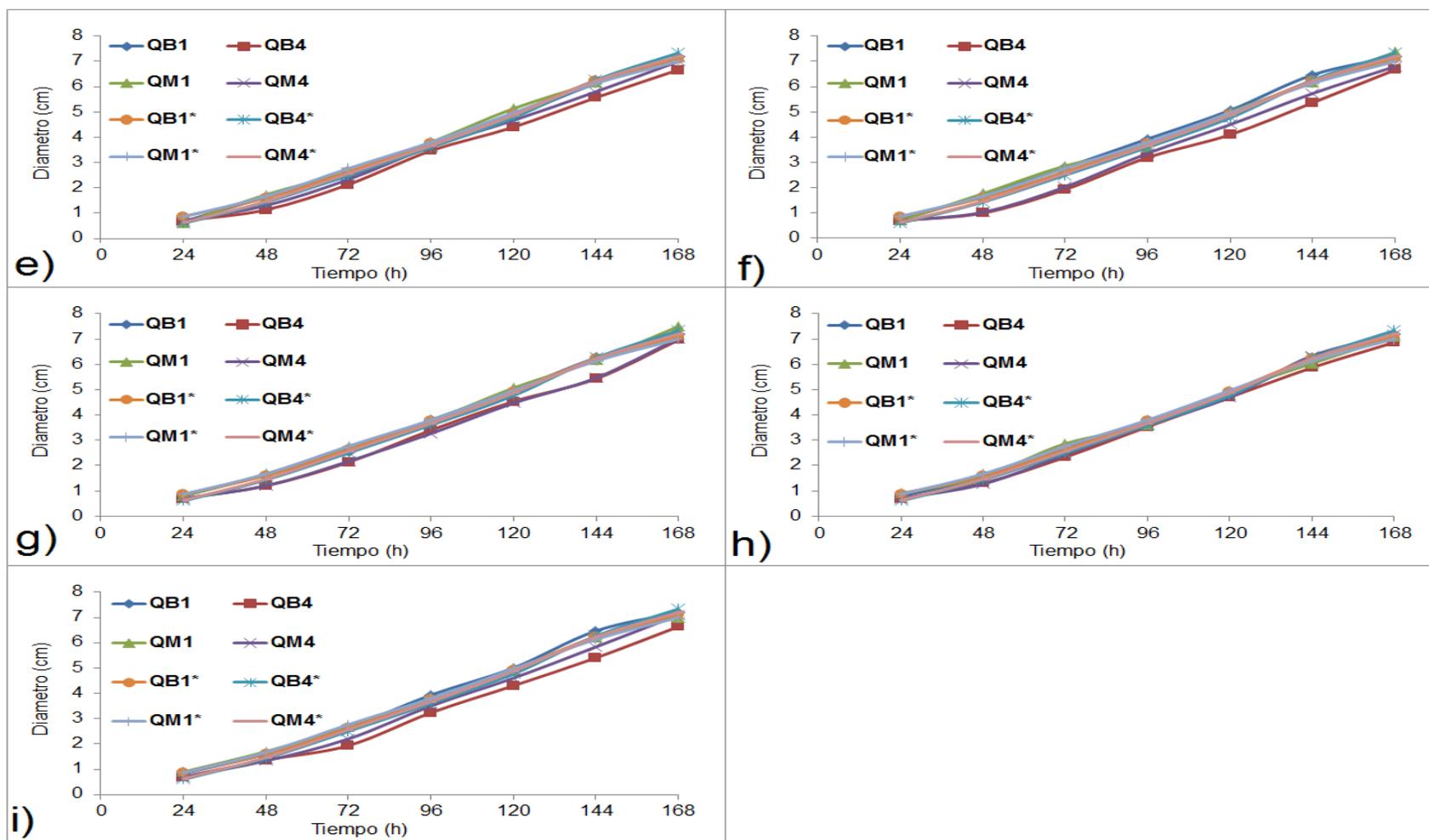


Figura 17. Crecimiento radial de *A. niger* en tratamientos combinados. Desarrollo previo del hongo en medios con: e) sorbitol, f) NaCl, g) metilglioxal, h) H₂O₂ y i) tert-Butil, sembrado posteriormente en medios adicionados con los quitosanos. QB1 y QB4: quitosano de bajo peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. QM1 y QM4 quitosano de medio peso molecular a concentraciones de 1 y 4 g/L, respectivamente. *Tratamiento individual.

Se ha reportado que el uso de tratamientos con quitosano producen un efecto de tipo fungistático sobre *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*, provocando una reducción en la tasa de crecimiento de ambos hongos (Cota-Arriola y col., 2011; Li y col., 2008). Sin embargo, al utilizar los tratamientos combinados de quitosano con agentes inductores de estrés oxidativo (metilgloxal, Tertbutil y peróxido de hidrogeno), no se presentó dicha reducción de crecimiento, pudiendo ser que el metabolismo normal del hongo contrarrestara, a través de enzimas antioxidantes, los daños que el estrés oxidativo pudiera causarle a la célula (Beltrán-García y col., 2006).

Por otra parte, los tratamientos combinados de los quitosanos con cada uno de los agentes causantes de estrés oxidativo y osmótico no mostraron un efecto distinto a los tratamientos control en *A. niger*, donde el crecimiento se presentó de forma similar a los tratamientos individuales. Esto puede ser debido una tasa rápida de recuperación del microorganismo extraído del medio de cultivo con quitosano, lo cual ha sido reportado previamente por Gomez-Rivas y col. (2004) y Li y col. (2008); es posible que exista una interacción irreversible del quitosano con los compuestos cargados negativamente presentes en el medio de cultivo, provocando que las cargas positivas del quitosano no se encuentren disponibles para interactuar con las células del hongo y así permitir su crecimiento (Raafat y Sahl, 2009, Rhoades y Roller, 2008, Jarry y col., 2001 y Rafat y col., 2008).

Con respecto a *A. parasiticus*, este presentó una reducción en el crecimiento en comparación con los tratamientos individuales, siendo los quitosanos de bajo y medio peso molecular (4 g/L) los más efectivos al combinarse con los agentes inductores de estrés. Estudios donde se evaluó el efecto del quitosano a diferentes concentraciones sobre hongos que afectan la calidad de frutos cítricos (*Citrus tankan Hayata*), mostraron una inhibición de crecimiento del 25% hasta un 90.5% dependiendo de la concentración del biopolímero; la inhibición se incrementó al aumentar la concentración (Chien y Chou, 2006).

Aunado a la posible adaptación que los microorganismos presentan frente a la presencia de quitosanos, se ha reportado que a concentraciones adecuadas de peróxido de hidrógeno es posible retardar la germinación de esporas de hongos y células bacterianas, aunque el crecimiento micelial puede ser capaz de mantener su tasa de crecimiento (Zharare y col., 2010). Estos resultados pudiesen explicar porque el uso combinado de peróxido de hidrogeno con quitosano, solo afectan la etapa de germinación de esporas en el hongo.

Estudios realizados sobre *Fusarium solani* y *F. oxysporum* tratados con diferentes solutos (NaCl, KCl y sacarosa) mostraron que los efectos negativos del crecimiento fueron mayores al utilizar NaCl o KCl en comparación con la sacarosa. La reducción en el potencial osmótico afectó el crecimiento *in vitro* de *Fusarium*, aunque para *F. solani* se observó un menor efecto en condiciones de estrés osmótico. Estos datos sugieren que posiblemente dichos aislamientos fueron capaces de mantener potenciales de turgencia positivos en las hifas, de modo que se mantuvo el crecimiento radial de la colonia (Lira-Mendez y col., 2006).

B) Velocidad de crecimiento de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* en medio sólido pre-tratado con quitosano seguido de tratamientos inductores de estrés osmótico y oxidativo.

Al analizar las velocidades de crecimiento de la combinación de tratamientos sobre *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($P < 0.05$), (Tablas 5 y 6). Para *A. niger*, el tratamiento que redujo significativamente la velocidad de crecimiento fue la combinación de los diferentes quitosanos con metilglioxal (Tabla 5), mientras que para *A. parasiticus* la mejor combinación fueron los diferentes quitosanos con NaCl (Tabla 9); la velocidad de crecimiento de ambos hongos se redujo en comparación con los controles ($P < 0.05$) (Tabla 7 y 8).

Estudios donde se evaluó la acción del quitosano en los hongos *A. padwickii*, *B. oryzae*, *C. lunata*, *F. verticillioides* y *S. oryzae*, mostraron una acción sobre la velocidad de crecimiento, la cual fue la posible causa de la reducción final del crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos del estudio, lo que evidencia el efecto fungistático de este compuesto (Rivero-Gonzales y col., 2009). Otros autores han reportado que al exponer a *Fusarium* sp. a altas concentraciones de NaCl, el crecimiento se reduce de manera significativa en comparación con el control, lo que sugiere que la energía que el hongo gasta para obtener moléculas de agua del medio y equilibrar el potencial hídrico del citoplasma respecto al ambiente circundante, se incrementa en la medida que se incrementa la concentración de solutos en el mismo. Así, el hongo se ve obligado a reducir la tasa de crecimiento de la colonia en condiciones *in vitro*, manteniendo el funcionamiento de sus sistemas enzimáticos (Lira-Mendez y col., 2006). Esto puede explicar el efecto que se obtuvo al combinar quitosano con NaCl sobre *A. niger*.

Tabla 5. Efecto de los pre-tratamientos de quitosano seguido de agentes inductores de estrés sobre la velocidad de extensión radial de *Aspergillus niger*.

Tratamiento aplicado	Crecimiento de <i>A. niger</i> en:			
	QB1	QB4	QM1	QM4
Sorbitol	0.055±0.00a	0.054±0.00a	0.055±0.00a	0.054±0.00a
NaCl	0.025±0.00h	0.023±0.00g	0.026±0.00g	0.027±0.00e
Metilglioxal	0.043±0.00f	0.046±0.00e	0.042±0.00f	0.044±0.00d
H₂O₂	0.047±0.00d	0.047±0.00d	0.047±0.00d	0.044±0.00d
Tertbutil	0.046±0.00de	0.048±0.00d	0.047±0.00d	0.048±0.00c
Sorbitol*	0.054±0.00ab	0.054±0.00a	0.054±0.00ab	0.054±0.00a
NaCl*	0.028±0.00g	0.028±0.00f	0.028±0.00g	0.028±0.00e
Metilglioxal*	0.052±0.00b	0.052±0.00b	0.052±0.00b	0.052±0.00b
H₂O₂*	0.050±0.00c	0.050±0.00c	0.050±0.00c	0.050±0.00c
Tertbutil*	0.045±0.00b	0.045±0.00e	0.045±0.00e	0.045±0.00d

QB1= quitosano de bajo peso molecular (1g/L), QB4= Quitosano de bajo peso molecular (4g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1g/L), QM4 = Quitosano medio peso molecular (4g/L). Los datos representan el promedio de tres réplicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05). *Tratamiento individual

El efecto del quitosano sobre la velocidad de crecimiento ha sido reportado sobre varias especies de hongos (Rivero-Gonzales y col., 2009), así mismo el efecto que provoca metilglioxal ha sido reportado en *E. coli* donde se conoce que inhibe su crecimiento, provocando una inhibición en la síntesis proteica incluso a concentraciones de 0.1 mM (Sánchez-Feliz, 1981). Resultando que el uso combinado de quitosano con metilglioxal provoca una reducción en la velocidad de crecimiento de *A. niger*.

Tabla 6. Efecto de los pre-tratamientos con quitosano seguido de agentes inductores de estrés sobre la velocidad de extensión radial de *Aspergillus parasiticus*.

Tratamiento aplicado	Crecimiento de <i>A. parasiticus</i> en:			
	QB1	QB4	QM1	QM4
Sorbitol	0.047±0.00a	0.046±0.00a	0.047±0.00a	0.046±0.00a
NaCl	0.014±0.00g	0.014±0.00g	0.013±0.00g	0.013±0.00g
Metilglioxal	0.032±0.00e	0.032±0.00e	0.033±0.00de	0.033±0.00d
H₂O₂	0.036±0.00c	0.037±0.00c	0.037±0.00c	0.036±0.00c
Tertbutil	0.035±0.00cd	0.035±0.00cf	0.034±0.00de	0.031±0.00e
Sorbitol*	0.044±0.00b	0.044±0.00b	0.044±0.00b	0.044±0.00a
NaCl*	0.025±0.0h	0.025±0.00g	0.025±0.00f	0.025±0.00f
Metilglioxal*	0.032±0.00e	0.032±0.00e	0.032±0.00e	0.032±0.00de
H₂O₂*	0.036±0.00cd	0.036±0.00cd	0.036±0.00c	0.036±0.00c
Tertbutil*	0.035±0.00d	0.035±0.00d	0.035±0.00cd	0.035±0.00c

QB1= quitosano de bajo peso molecular (1g/L), QB4= Quitosano de bajo peso molecular (4g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1g/L), QM4 = Quitosano medio peso molecular (4g/L). Los datos representan el promedio de tres réplicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05). *Tratamiento individual.

Tabla 7. Efecto de los pre-tratamientos inductores de estrés seguido de los distintos quitosanos sobre la velocidad de extensión radial de *Aspergillus niger*

Tratamiento aplicado	Crecimiento de <i>A. niger</i> en:				
	Sorbitol	NaCl	Metilglioxal	H ₂ O ₂	Tertbutil
QB1	0.046±0.00abc	0.046±0.00abc	0.045±0.00abc	0.045±0.00abc	0.046±0.00ab
QB4	0.043±0.00d	0.042±0.00d	0.044±0.00d	0.044±0.00bc	0.042±0.00d
QM1	0.046±0.00ab	0.046±0.00abc	0.046±0.00ab	0.044±0.00c	0.043±0.00cd
QM4	0.045±0.00bcd	0.044±0.00bcd	0.044±0.00cd	0.047±0.00ab	0.045±0.00bc
QB1*	0.045±0.00bcd	0.045±0.00bcd	0.045±0.00bcd	0.045±0.00abc	0.045±0.00bc
QB4*	0.047±0.00a	0.047±0.00a	0.047±0.00a	0.047±0.00a	0.047±0.00a
QM1*	0.043±0.00cd	0.043±0.00cd	0.043±0.00d	0.043±0.00c	0.043±0.00cd
QM4*	0.046±0.00ab	0.046±0.00ab	0.046±0.00a	0.046±0.00ab	0.046±0.00ab

QB1= quitosano de bajo peso molecular (1g/L), QB4= Quitosano de bajo peso molecular (4g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1g/L), QM4 = Quitosano medio peso molecular (4g/L). Los datos representan el promedio de tres réplicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05). *Tratamiento individual.

Tabla 8. Efecto de los pre-tratamientos inductores de estrés seguido de los distintos quitosanos sobre la velocidad de extensión radial de *Aspergillus parasiticus*.

Tratamiento aplicado	Velocidad de crecimiento de <i>A. parasiticus</i> en:				
	Sorbitol	NaCl	Metilglioxal	H ₂ O ₂	Tertbutil
QB1	0.040±0.00a	0.039±0.00ab	0.041±0.00a	0.037±0.00bc	0.039±0.00a
QB4	0.035±0.00b	0.037±0.00bcd	0.034±0.00b	0.037±0.00bc	0.034±0.00b
QM1	0.039±0.00a	0.037±0.00bc	0.040±0.00a	0.037±0.00bc	0.039±0.00a
QM4	0.032±0.00c	0.034±0.00d	0.033±0.00b	0.033±0.00d	0.031±0.00c
QB1*	0.021±0.00a	0.021±0.00e	0.021±0.00c	0.021±0.00e	0.021±0.00d
QB4*	0.041±0.00a	0.041±0.00a	0.041±0.00a	0.041±0.00a	0.041±0.00a
QM1*	0.035±0.00bc	0.035±0.00cd	0.0365±0.00b	0.035±0.00cd	0.035±0.00b
QM4*	0.039±0.00a	0.039±0.00ab	0.039±0.00b	0.039±0.00ab	0.039±0.00a

QB1= quitosano de bajo peso molecular (1g/L), QB4= Quitosano de bajo peso molecular (4g/L), QM1= quitosano de medio peso molecular (1g/L), QM4 = Quitosano medio peso molecular (4g/L). Los datos representan el promedio de tres réplicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05). *Tratamiento individual.

C) Porcentaje de inhibición y sinergismo de *A. niger* y *A. parasiticus* en medio sólido con la aplicación de pre-tratamientos de quitosano de diferente peso molecular con inductores de estrés osmótico y oxidativo.

Para *A. niger*, el tratamiento que presentó un efecto sinérgico al combinar el quitosano con los agentes inductores de estrés fuesorbitol (S) con quitosano de bajo peso molecular a una concentración de 4 g/L (QB4), donde el porcentaje de inhibición de la combinación fue mayor a la de los tratamientos individuales. Otro tratamiento que presentó un efecto favorable al utilizarse en combinación fue el quitosano de medio peso molecular (4 g/L) con peróxido de hidrogeno, el cual presentó un mayor porcentaje de inhibición en comparación con los tratamientos individuales; dicho tratamiento (H₂O₂) no presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. niger* al utilizarse de manera individual. Lo anterior se puede atribuir a que el quitosano promueve la formación de peróxido de hidrógeno en el hongo (Singh, 2008),

aumentando la generación de ERO y excediendo la capacidad antioxidante de la célula, ocasionando una reducción del crecimiento del hongo.

En relación a los tratamientos restantes de *A. niger*, en la tabla 9 se observa que la utilización de pre-tratamiento con quitosano seguido de inductores de estrés y viceversa no presentan un efecto favorable al utilizarse en combinación, incluso en algunos casos el uso de tratamientos individuales fue más favorecedor que la combinación en sí. Por ejemplo, el tratamiento combinado de QM1+NaCl no presentó inhibición sobre el crecimiento de *A. niger*, sin embargo, los componentes evaluados de forma individual presentaron un porcentaje de inhibición considerable (Tabla 1). El tratamiento con sólo NaCl presentó un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. niger*, sin embargo, contrario a lo que se observó al utilizarlo en combinación con los diferentes tipos de quitosanos (Tabla 9). De igual manera la exposición previa del hongo al tratamiento inductor de estrés, ya sea osmótico u oxidativo, no favorece el efecto inhibitorio de los diferentes quitosanos (QB1, QB4, QM1 y QM4).

Estudios del efecto del quitosano en combinación con diferentes tratamientos han sido reportados por algunos autores. Lira-Saldivar y col. (2006) encontraron un efecto sinérgico al utilizar mezclas de quitosano con extractos de *L. tridentata* a partir de las concentraciones de 500/2000 ppm de los extractos metanólico y etanólico, respectivamente. El efecto fue más potente al mezclar los biocompuestos, en comparación con el efecto inhibitorio del quitosano sólo a una concentración de 12,000 ppm. Otros autores han reportado el sinergismo generado por la interacción entre el quitosano y diversos antibióticos como tetraciclina, ceftriaxona y sulfametoxazol contra bacterias como *Staphylococcus aureus*, donde la combinación de quitosano con sulfametoxazol resultó ser la más efectiva (Tin y col., 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa 1 de este trabajo, el uso de sorbitol como tratamiento fungicida es poco efectivo debido a que este compuesto puede ser utilizado como fuente de energía por parte de los microorganismos, lo cual ha sido previamente reportado (Aro y col., 2005). Al usarse en combinación con quitosano (QB4), el efecto inhibitorio sobre *A. niger* (Tabla 9) puede estar relacionado solamente con el inhibitorio del biopolímero. Este efecto ha sido ampliamente observado en diferentes estudios (Cota y col., 2008).

Tabla 9. Sinergismo y efecto de la aplicación de pre-tratamientos con quitosano e inductores de estrés osmótico y oxidativo sobre la inhibición de *Aspergillus niger*.

Tratamientos	Inhibición %		Efecto esperado (%)	Inhibición (%) de la mezcla	Proporción de sinergismo
	Tratamiento A	Tratamiento B			
Sorbitol+QB1	0.00	11.30	11.30	0.00	0.00
QB1+Sorbitol	11.30	0.00	11.30	0.00	0.00
NaCl+QB1	43.00	11.30	49.40	0.00	0.00
QB1+NaCl	11.30	43.00	49.40	1.00	0.00
Metilglioxal+QB1	2.50	11.30	13.50	0.00	0.00
QB1+Metilglioxa	11.30	2.50	13.50	10.30	0.80
H ₂ O ₂ +QB1	0.00	11.30	11.30	0.00	0.00
QB1+ H ₂ O ₂	11.30	0.00	11.30	5.00	0.40
Tertbutil+QB1	7.00	11.30	17.50	0.00	0.00
QB1+Tertbutil	11.30	7.00	17.50	0.00	0.00
Sorbitol+QB4	0.00	8.30	8.30	9.00	1.08
QB4+Sorbitol	8.30	0.00	8.30	0.00	0.00
NaCl+QB4	43.00	8.30	47.70	9.00	0.19
QB4+NaCl	8.30	43.00	47.70	11.00	0.23
Metilglioxal+QB4	2.50	8.30	10.60	5.00	0.47
QB4+Metilglioxa	8.30	2.50	10.60	6.80	0.64
H ₂ O ₂ +QB4	0.00	8.30	8.30	6.30	0.76
QB4+ H ₂ O ₂	8.30	0.00	8.30	3.30	0.40
Tertbutil+QB4	7.00	8.30	14.70	9.50	0.65
QB4+Tertbutil	8.30	7.00	14.70	0.00	0.00
Sorbitol+QM1	0.00	12.50	12.50	0.00	0.00
QM1+Sorbitol	12.50	0.00	12.50	0.00	0.00
NaCl+QM1	43.00	12.50	50.10	0.00	0.00
QM1+NaCl	12.50	43.00	50.10	0.60	0.01
Metilglioxal+QM1	2.50	12.50	14.70	0.00	0.00
QM1+Metilglioxa	12.50	2.50	14.70	10.25	0.70
H ₂ O ₂ +QM1	0.00	12.50	12.50	0.00	0.00
QM1+ H ₂ O ₂	12.50	0.00	12.50	6.25	0.50
Tertbutil+QM1	7.00	12.50	18.60	0.00	0.00
QM1+Tertbutil	12.50	7.00	18.60	0.00	0.00
Sorbitol+QM4	0.00	10.00	10.00	2.70	0.27
QM4+Sorbitol	10.00	0.00	10.00	0.00	0.00
NaCl+QM4	43.00	10.00	48.70	5.50	0.11
QM4+NaCl	10.00	43.00	48.70	0.69	0.01
Metilglioxal+QM4	2.50	10.00	12.30	2.30	0.19
QM4+Metilglioxa	10.00	2.50	12.30	10.68	0.87
H ₂ O ₂ +QM4	0.00	10.00	10.00	0.40	0.04
QM4+ H ₂ O ₂	10.00	0.00	10.00	11.25	1.13
Tertbutil+QM4	7.00	10.00	16.30	1.35	0.08
QM4+Tertbutil	10.00	7.00	16.30	0.00	0.00

Tratamiento A: es aquel donde el hongo se ha desarrollado, tratamiento B: tratamiento donde fue inoculado el crecimiento del hongo en el tratamiento A.

Malerba y col. (2012) reportaron que el tratamiento con quitosano de células cultivadas de la planta sicómoro (*Acer pseudoplatanus L.*) provocó una serie de respuestas de defensa y estrés, como la producción de H₂O₂ y óxido nítrico (NO); dicho efecto no provocó una apoptosis directa inducida por quitosano sobre la planta, pero sí una afectación a través de la peroxidación lipídica. Otro estudio donde se investigaron las defensas antioxidantes en *A. niger* frente a bajas concentraciones de H₂O₂ mostraron que *A. niger* se adapta a la exposición de H₂O₂ al reducir el crecimiento y al inducir una serie de actividades enzimáticas antioxidantes (incluyendo la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa) (Li y col., 2008). Con base a lo anterior, es factible que el uso del quitosano (posible inductor de la producción de H₂O₂) junto con H₂O₂ favorezca el incremento en la acción enzimática antioxidante debido a la sobreexposición de la célula al H₂O₂, provocando un estrés oxidativo el cual a su vez reduce el crecimiento del hongo, que se observó en nuestros resultados.

Por otra parte, el tratamiento individual con NaCl (Tabla 1) resultó ser el más efectivo al reducir el crecimiento en ambos hongos, efecto que no se incrementó al utilizar mezclas de los quitosanos con dicho agente sobre el crecimiento de *A. niger* (Tabla 9). Al utilizar quitosanos (QB1, QB4, QM1 y QM4) con NaCl, la inhibición resultó casi nula. Se ha reportado que hongos y bacterias muestran cierto grado de resistencia al quitosano debido a la adaptación fisiológica inducida por el estrés, así como al aumento en la producción de quitinasas y quitosanasas (enzimas que degradan quitosano), permitiéndole usarlos como fuente de energía por ciertos microorganismos (Gómez-rivas y col., 2004). Basándonos en lo anterior, se podría suponer que el tratamiento posterior con NaCl no provocó efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. niger* debido a que la exposición previa con quitosano creó una protección contra el estrés salino, además de generar una fuente de energía adicional que le permite conservar la turgencia. Mahadavi y Rahimi (2013) reportaron que el uso de recubrimientos con quitosano en semillas de ajwain (*Carum copticum*) contrarrestó los efectos del estrés inducido por la salinidad, mejorando la germinación y el crecimiento de la planta. Además, se ha reportado que la inhibición del crecimiento ocasionado por el NaCl se asocia a la toxicidad de los iones o por efectos del estrés osmótico, los cuales dependen del mantenimiento de la turgencia, proceso por el cual se requiere un gasto energético (Coke y Whipps, 1993).

En el caso del hongo *A. parasiticus*, los tratamientos que presentaron mayor efecto inhibitorio al usarse en combinación, fueron las combinaciones de QB4 y QM4 con NaCl, observando que un efecto sinérgico entre el NaCl y ambos tipos de quitosano (Tabla 10). Además de los resultados anteriormente mencionados, los tratamientos donde se combinaron

los agentes inductores de estrés osmótico y oxidativo con los quitosanos favorecieron el efecto inhibitorio. Al combinar metilglioxal con quitosano de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4 g/L (QB4 y QM4), el efecto inhibitorio se vió favorecido presentando un efecto sinérgico (Tabla 10). Al combinar sorbitol con quitosano de bajo y medio peso molecular (4 g/L), el tratamiento redujo la inhibición de crecimiento del hongo en comparación con los tratamientos de forma individual. Esto indica que el tratamiento previo con sorbitol favorece el efecto fungistático del quitosano de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4 g/L. Otros tratamientos que presentaron un efecto inhibitorio considerable al usarse en combinación fueron los tratamientos de tert-butil y peróxido de hidrogeno en combinación con quitosano de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4g/L. Ambos tratamientos de forma individual no presentan un efecto inhibitorio.

Cota y col. (2011) reportaron que el efecto fungistático que el quitosano ejerce sobre *A. parasiticus* podría deberse a la presencia de los grupos amino de esta molécula, los cuales pueden interactuar con las cargas negativas presentes en la membrana celular del hongo, afectando principalmente la permeabilidad de la membrana. Si tomamos este mecanismo de acción del quitosano y le aunamos el efecto que produce el tratamiento con NaCl, el cual ha sido reportado mostrando retardar la capacidad de crecimiento de las hifas debido a la alteración en el equilibrio iónico y alteración de la turgencia, ocupando así un mayor requerimiento de energía (Cook y Whipps, 1993), ambos mecanismos podría explicar el efecto que obtuvimos en el presente trabajo, ya que la combinación de diferentes quitosanos junto con NaCl mostró un mayor efecto inhibitorio así como un posible sinergismo (Tabla 10).

Por otra parte, se ha reportado el metilglioxal (8 mM) retrasa el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, provocando un posible aumento intracelular de este metabolito (Aguilera y Prieto, 2001). Al utilizar la combinación de metilglioxal con quitosano de bajo y medio peso molecular a una concentración de 4 g/L, el efecto inhibitorio se vió favorecido posiblemente debido a la suma de los mecanismos de acción de cada tratamiento. El uso combinado de ambos tratamientos tuvo un mayor efecto en el crecimiento sólo cuando se usó mayor concentración de los quitosanos, lo cual es similar a los resultados reportados por Chien y Chou (2006). Los autores encontraron que el quitosano, dependiendo del tipo y concentración, puede causar desde un 25 hasta un 90.5% de inhibición del crecimiento de *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Botrydiplozia lecanidion* y *Botrytis cinerea*; así mismo se encontró que al aumentar la concentración, se aumenta la inhibición sobre los microorganismos.

Tabla 10. Sinergismo y efecto de los pre-tratamientos de quitosano e inductores de estrés osmótico y oxidativo sobre la inhibición de *Aspergillus parasiticus*.

Tratamientos	Inhibición %		Efecto esperado (%)	Inhibición (%) de la mezcla	Proporción de sinergismo
	Tratamiento A	Tratamiento B			
Sorbitol+QB1	0.00	38.20	38.20	0.00	0.00
QB1+Sorbitol	38.20	0.00	38.20	0.00	0.00
NaCl+QB1	31.80	38.20	57.80	0.00	0.00
QB1+NaCl	38.20	31.80	57.80	43.00	0.70
Metilglioxal+QB1	2.90	38.20	39.90	0.00	0.00
QB1+Metilglioxa	38.20	2.90	39.90	1.70	0.00
H ₂ O ₂ +QB1	0.00	38.20	38.20	0.00	0.00
QB1+ H ₂ O ₂	38.20	0.00	38.20	6.60	0.20
Tertbutil+QB1	0.00	38.20	38.20	0.00	0.00
QB1+Tertbutil	38.20	0.00	38.20	0.00	0.00
Sorbitol+QB4	0.00	0.00	0.00	12.54	>1.00
QB4+Sorbitol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
NaCl+QB4	31.80	0.00	31.80	10.56	0.33
QB4+NaCl	0.00	31.8	31.80	38.9	1.22
Metilglioxal+QB4	2.90	0.00	2.90	18.58	6.41
QB4+Metilglioxa	0.00	2.9	2.90	0.56	0.19
H ₂ O ₂ +QB4	0.00	0.00	0.00	10.05	>1.00
QB4+ H ₂ O ₂	0.00	0.00	0.00	4.10	>1.00
Tertbutil+QB4	0.00	0.00	0.00	20.09	>1.00
QB4+Tertbutil	0.00	0.00	0.00	1.05	>1.00
Sorbitol+QM1	0.00	15.61	15.60	0.00	0.00
QM1+Sorbitol	15.61	0.00	15.60	0.00	0.00
NaCl+QM1	31.80	15.60	42.40	0.00	0.00
QM1+NaCl	15.60	31.80	42.40	41.50	0.98
Metilglioxal+QM1	2.87	15.60	18.00	0.00	0.00
QM1+Metilglioxa	15.6	2.87	18.00	0.00	0.00
H ₂ O ₂ +QM1	0.00	15.60	15.60	0.00	0.00
QM1+ H ₂ O ₂	15.60	0.00	15.60	2.50	0.16
Tertbutil+QM1	0.00	15.6	15.60	0.00	0.00
QM1+Tertbutil	15.60	0.00	15.60	2.60	0.17
Sorbitol+QM4	0.00	0.00	0.00	16.47	>1.00
QM4+Sorbitol	0.00	0.00	0.00	0.00	>1.00
NaCl+QM4	31.80	0.00	31.80	12.35	0.39
QM4+NaCl	0.00	31.80	31.80	43.00	1.35
Metilglioxal+QM4	2.87	0.00	2.90	18.02	6.28
QM4+Metilglioxa	0.00	2.87	2.90	0.00	0.00
H ₂ O ₂ +QM4	0.00	0.00	0.00	15.43	>1.00
QM4+ H ₂ O ₂	0.00	0.00	0.00	3.58	>1.00
Tertbutil+QM4	0.00	0.00	0.00	22.60	>1.00
QM4+Tertbutil	0.00	0.00	0.00	10.20	>1.00

Tratamiento A: es aquel donde el hongo se ha desarrollado, tratamiento B: tratamiento donde fue inoculado el crecimiento del hongo en el tratamiento A.

Estudios realizados con el hongo filamentoso *Penicillium chrysogenum* mostraron que existe una adaptación a condiciones de estrés oxidativo inducido por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (0.35-0.70 M) e hidroperóxido de ter-butyl (0.5-2 mM), donde los niveles enzimáticos de antioxidantes (glutación y catalasa) se encontraron en concentraciones elevadas (Emri y col., 1997). Al comparar estos resultados con los obtenidos al utilizar H₂O₂ y tertbutil combinado con quitosano, es posible deducir que el efecto favorable sobre la inhibición se puede asociar con la adaptación del hongo al estrés oxidativo. Resultados similares han sido reportados en la literatura donde altas concentraciones de quitosano provocan una disminución del crecimiento micelial en hongos como *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* (Liu et al., 2007).

D) Germinación y morfometría de esporas de *A. niger* y *A. parasiticus* en medio sólido adicionado con tratamientos combinados de quitosano de diferente peso molecular con inductores de estrés osmótico y oxidativo.

En las tablas 11 y 12 se muestran los resultados de la morfometría y germinación de esporas de los hongos en los distintos tratamientos. El análisis morfométrico de las esporas, a las 8 h, mostró un aumento en el diámetro con diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al control, para ambos hongos. Únicamente el tratamiento con peróxido de hidrógeno provocó una reducción del tamaño de las esporas de *A. niger* (Tabla 11). Con respecto a las hifas, a las 14 h, se observó que la combinación de los diferentes quitosanos con tertbutil redujo el diámetro de las hifas de *A. parasiticus*, mientras que la combinación de quitosano de bajo peso molecular (1 g/L) con peróxido de hidrógeno provocó una reducción en el diámetro de las hifas de *A. niger* (Tabla 12).

Estudios recientes han demostrado que las clamidosporas de *P. chlamydosporia* son ligeramente menos sensibles que los conidios a concentraciones de NaCl, siendo los conidios estructuras resistentes (Kerry y col., 2011) y de vital importancia para la adaptabilidad natural del hongo a las condiciones de estrés por salinidad (Ceiro y col., 2013). Esto se puede relacionar con el efecto que provocó el NaCl al aumentar el diámetro de las esporas. Además, el hongo es capaz de mantener un equilibrio osmótico el cual evita la deshidratación celular, ayudando a mantener la presión de turgencia y las funciones celulares vitales (Yaday y col., 2011).

Tabla 11. Germinación y análisis morfométrico de esporas de *Aspergillus niger* desarrollado en tratamientos combinados de quitosano e inductores de estrés.

Tratamiento	Diámetro de esporas (μm) 8 h	Diámetro de hifas (μm) 14 h	Germinación de esporas (%) a 8 h	Germinación de esporas (%) a 14 h
QB1+NaCl	59.2 \pm 7.7d	44.1 \pm 23.6ef	0 \pm 0f	36.5 \pm 2.13c
QB4+NaCl	64.0 \pm 8.3d	50.3 \pm 16.8def	0 \pm 0f	40.5 \pm 7.7c
QM1+NaCl	59.9 \pm 5.8d	49.6 \pm 9.51ef	0 \pm 0f	40.0 \pm 11.31c
QM4+NaCl	62.9 \pm 5.9d	56.5 \pm 7.22cdef	0 \pm 0f	66.0 \pm 4.21b
Control	46.6 \pm 5.9a	53.6 \pm 5.7	0 \pm 0.00	49.0 \pm 7.07
QB1+M	109.7 \pm 14.9a	64.6 \pm 3.59abcd	59.7 \pm 2.1b	100 \pm 0.00a
QB4+M	108.8 \pm 14.4a	77.6 \pm 17.95ab	14.5 \pm 1.4e	100 \pm 0.00a
QM4+M	104.4 \pm 12.6ab	68.3 \pm 13.2abcd	32.6 \pm 3.3c	100 \pm 0.00a
QM1+M	102.3 \pm 13.0b	65.5 \pm 9.29abcd	22.3 \pm 0.9d	100 \pm 0.00a
Control	60.2 \pm 11.1	62.7 \pm 8.7	0 \pm 0.00	92.0 \pm 4.24
QB1+H ₂ O ₂	49.8 \pm 6.1e	34.9 \pm 4.9f	0 \pm 0f	100 \pm 0.00a
QB4+ H ₂ O ₂	46.4 \pm 6.5e	69.0 \pm 8.89abc	0 \pm 0f	82.5 \pm 9.1ab
QM1+ H ₂ O ₂	46.8 \pm 4.9e	60.7 \pm 3.4bcde	0 \pm 0f	93.5 \pm 3.53
QM4+ H ₂ O ₂	47.7 \pm 4.7e	67.3 \pm 12.12abcd	0 \pm 0f	100 \pm 0.00a
Control	72.2 \pm 8.8	61.5 \pm 10	5.5 \pm 2.12	100 \pm 0.00
Sor+QB4	86.0 \pm 15.5c	64.3 \pm 11.52bcde	77.8 \pm 1.6a	100 \pm 0.00a
NaCl+QB4	85.9 \pm 17.8c	63.5 \pm 8.96bcde	63.5 \pm 3.5b	100 \pm 0.00a
Control	59.3 \pm 8.4	67.6 \pm 10.8	7.02 \pm 1.09	69.0 \pm 8.48
NaCl+QM4	93.1 \pm 10.4c	68.5 \pm 6.79abcd	76.1 \pm 1.55a	100 \pm 0.00a
Sor+QM4	86.6 \pm 7.7c	71.6 \pm 8.21abc	11.8 \pm 4.4e	100 \pm 0.00a
Control	65 \pm 10.2	61.7 \pm 9.5	0 \pm 0.00	80.5 \pm 7.77

Tratamiento control: tratamiento evaluado de forma individual. Los datos representan el promedio de dos replicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05).

Estudios previos han mostrado que el quitosano induce cambios morfológicos por alteraciones moleculares y por desorganización celular (Ait-Barka y col., 2004). Plascencia-Jatomea (2004) reporta que la presencia de quitosano ocasionó hinchamiento en el diámetro y

la longitud promedio de esporas e hifas de *A. niger* a las 72 h, ocasionando mayor hinchamiento a mayor concentración de quitosano. Esto es similar a lo encontrado en el presente estudio para los tratamientos con quitosano.

Estudios ultraestructurales han evidenciado que el quitosano induce alteraciones en la pared celular y excesiva ramificación en hifas de *R. stolonifer*, incrementando su diámetro y ocasionando hifas hinchadas y con una menor longitud con respecto al control (Bautista-Baños y col., 2006). Deacon (1993) reportó que la longitud de las hifas es muy variable dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, y que el diámetro es relativamente constante; esto explica la alta desviación estándar observada en la longitud promedio de las hifas, lo que no permitió encontrar diferencias significativas entre los tratamientos analizados en este trabajo.

En general, al evaluar la germinación de las esporas de *A. parasiticus*, las 8 h de incubación, desarrolladas en los medios adicionados con los distintos tratamientos, no se encontró una reducción significativa en comparación con los tratamientos individuales. No obstante, en el tratamiento combinado de quitosanos (QB1, QB4 y QM4) con H₂O₂ se observó una reducción del 100% de la germinación de esporas (Tabla 12). Para *A. niger*, la mayoría de las combinaciones ocasionaron un incremento en la germinación de esporas en comparación con el control, con excepción del peróxido de hidrógeno, el cual redujo la germinación de esporas (Tabla 11). De igual forma, la combinación de quitosanos con NaCl favoreció el crecimiento de *A. parasiticus*, mostrando una mayor germinación de esporas en relación a los tratamientos individuales.

Al evaluar el efecto del quitosano sobre la germinación de esporas de *A. niger* se observó un retardo en la fase de crecimiento inicial, a las 10 horas (Plascencia-Jatomea y col., 2011). En este estudio no se observó un efecto similar al inocular el hongo en medio con quitosano después de haber estado expuesto a NaCl y sorbitol, los cuales pueden provocar un cambio en la presión de turgencia y generar daños debido al estrés. Para contrarrestar estos cambios, las células han desarrollado respuestas moleculares rápidas para evitar los daños y protegerse de las diferentes formas de estrés (Gonzales-Hernandez y Peña, 2002).

Tabla 12. Germinación y análisis morfométrico de las esporas de *Aspergillus parasiticus* desarrolladas en tratamientos combinados de quitosano e inductores de estrés.

Tratamiento	Diámetro de esporas (µm) 8 h	Diámetro de hifas (µm) 14 h	Germinación de esporas (%) a 8 h	Germinación de esporas (%) a 14 h
QB1+NaCl	83.5±11g	83.0±15.6abc	54.5±4.8c	89.5±3.53abc
QB4+NaCl	82.6±10.2g	70.7±13.29bcdef	69.5±2.1b	100±0.00a
QM1+NaCl	80.6±13.0g	73.4±9.07abcdef	49.6±1.9c	80.0±8.48cd
QM4+NaCl	97.6±13.5f	83.1±15.62abcde	67.5±3.5b	100±0.00a
Control	48.7±6.75	NA	0±0.00	NA
QB1+ H ₂ O ₂	61.7±7.7h	65.8±11.51def	0±0d	84.0±7.07bcd
QB4+ H ₂ O ₂	60.3±11.3h	92.9±3.5ab	0±0d	99.0±1.41a
QM1+ H ₂ O ₂	122.3±cde	68.1±10.76cdef	100±0a	100±0
QM4+ H ₂ O ₂	63.4±6.49h	67.6±3.54abc	0±0d	96.5±2.12ab
Control	74.2±11.2	65.0±13	27.5±9.19	100±0.00
QB4+Tert	124.8±15.0bcd	58.6±3.54ef	100±0a	100±0.00a
QM1+Tert	63.0±6.9h	64.9±10.21cdef	0±0d	72.5±4.9d
QM4+Tert	115.5±15.0e	47.6±4.56ef	100±0a	100±0.00a
Control	72.6±9.6	71.5±14.0	14.0±7.07	100±0.00
Sor+QM4	127.7±14.2bc	55.5±4.22f	95.9±2.9a	100±0.00a
NaCl+QM4	143.1±15.2a	67.5±5.6abcd	100±0a	100±0.00a
Control	64.5±10.8	68.2±10.0	11.5±4.94	97.5±0.7
Sor+QB4	127.0±13.8bc	92.5±13.09a	97.3±3.8	100±0.00a
NaCl+QB4	133.7±12.3ab	83.03±4.5abc	100±0a	100±0.00a
Control	61±8.9	66.0±9.9	53.0±5.65	92.0±4.24
QB1+M	118.4±13.6de	78.1±10.06abcde	76.3±5.16b	100±0.00a
Control	57.6±16.6	56.9±7.8	0±0.00	100±0.00

Tratamiento control: tratamiento evaluado de forma individual. Los datos representan el promedio de dos replicas. Las medias de cada tratamiento se separaron usando la prueba de Tukey (P< 0.05). NA: no hubo germinación.

Con base a los resultados obtenidos, el uso combinado de quitosano de diferentes pesos moleculares con los agentes inductores de estrés osmótico y oxidativo constituye un método potencial para incrementar el efecto antifúngico del quitosano, mostrando un efecto sinérgico al utilizarlos en combinación. Este método alternativo podría incrementar la vida de anaquel de diversos productos alimenticios y evitar la podredumbre de productos agrícolas en almacenamiento post-cosecha. Asimismo, el uso de quitosano puede favorecer métodos antimicrobianos utilizados en la conservación de productos alimenticios tales como la salación, mostrando un efecto sinérgico al combinar quitosano con NaCl.

CONCLUSIONES

1. El aumento en la concentración de quitosano favorece el efecto antifúngico sobre crecimiento de *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus* al utilizarse como pre-tratamiento, seguido de tratamiento con los diferentes agentes inductores de estrés oxidativo y osmótico.
2. El uso de pre-tratamientos con quitosano favorece el efecto inhibitorio del sorbitol y H₂O₂ sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*, logrando un efecto sinérgico.
3. La aplicación de agentes causantes de estrés (sorbitol, metilglioxal y H₂O₂) como pre-tratamiento favorece el efecto fungicida del quitosano sobre el crecimiento de *Aspergillus parasiticus*.
4. El efecto del quitosano sobre hongos pre-tratados con agentes inductores de estrés (metilglioxal y H₂O₂) favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando un mayor estado de estrés oxidativo sobre *Aspergillus parasiticus*.
5. La aplicación de pre-tratamientos con agentes inductores de estrés seguido de uso del quitosano constituye una nueva alternativa para la conservación de alimentos agrícolas, permitiendo reducir el crecimiento de hongos filamentosos de importancia en alimentos tales como *Aspergillus parasiticus* y *A. niger*.

RECOMENDACIONES

Las pérdidas económicas que produce la contaminación por hongos en alimentos agrícolas y productos de anaquel es un problema actual de suma importancia a nivel mundial. Aunado a lo anterior, el intento por contrarrestar el deterioro y la contaminación de origen microbiano genera al mismo tiempo efectos tóxicos en la salud de humanos y animales debido al creciente uso de plaguicidas. Por tal motivo, es sumamente importante continuar con la investigación en torno al área de compuestos naturales que presenten una alternativa natural para contrarrestar la contaminación que provocan dichos microorganismos.

Es necesario evaluar e innovar los procesos tecnológicos existentes a fin de establecer nuevas estrategias y métodos de control que sean accesibles y factibles de usar hoy en día. Ello permitirá reducir al máximo el uso de compuestos químicos de uso común.

Es necesario realizar una investigación detallada para lograr elucidar los mecanismos de acción del quitosano y sus posibles interacciones con otros tratamientos antifúngicos.

Se recomienda evaluar el uso combinado de quitosano y los agentes utilizados a nivel *in vivo*, a fin de tener una visión de mercado para la elaboración de un producto novedoso creado a base de quitosano, en el cual se aprovechen sus características antifúngicas.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca, M. L. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17: S79-S84.

Abarca, M. L., Bragulat, M. R., Castella, G., & Cabanes, F. J. 1994. A research note: Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *Journal of Food Protection*®, 57(3): 256-258.

Aguilera, J., & Prieto, J. 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* aldose reductase is implied in the metabolism of methylglyoxal in response to stress conditions. *Current genetics*, 39(5-6): 273-283.

Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in microbiology*, 13(3): 111-118.

Ahmad, S. 2012. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Springer Science & Business Media. 262 p.

Ait Barka E, Eullaffroy P, Clément C & Vernet G. 2004. Chitosan improves development and protects *Vitis vinifera* L. against *Botritis cinerea*. *Plant Cell Report*. 22:608-614.

Al Tamie, M. S. 2014. Effect of salinity on the fungal occurrence in Al-Shega area at Al-Qassim, Saudi Arabia. *Research Journal of Microbiology*, 9(6): 287.

Allan, C. R., & Hadwiger, L. A. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental mycology*, 3(3): 285-287.

Alvarado Hernández, A. M., Barrera Necha, L. L., Hernández Lauzardo, A. N., & Velázquez del Valle, M. G. 2011. Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2): 127-134.

Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., & Slokoska, L. S. 2005. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological research*, 109(02): 150-158.

Arana, D. M., Nombela, C., Alonso-Monge, R., & Pla, J. 2005. The Pbs2 MAP kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Microbiology*, 151(4): 1033-1049.

Argüelles, W., Heras Caballero, A., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., & Miralles, B. 2004. Caracterización de quitina y quitosano. *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*, 195-197 p.

Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 29(4): 719-739.

Atia, M. M. M., Buchenauer, H., Aly, A. Z., & Abou-Zaid, M. I. 2005. Antifungal activity of chitosan against *Phytophthora infestans* and activation of defence mechanisms in tomato to late blight. *Biological agriculture & horticulture*, 23(2): 175-197.

Ayala, A., Colina, M., Molina, J., Vargas, J., Rincón, D., Medina, J. & Cárdenas, H. 2014. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet que produce la Sigatoka negra que ataca el plátano. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 15(6):, 312-338.

Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1): 57-69.

Baños, S. B., López, M. H., & Molina, E. B. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de fitopatología*, 22(2): 178-186.

Baranyi, J., Roberts, T. A., & McClure, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10(1): 43-59.

Barka, E. A., Eullaffroy, P., Clément, C., & Vernet, G. 2004. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22(8): 608-614.

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(3): 281-288.

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., del Valle, M. V., Bosquez-Molina, E., & Sánchez-Domínguez, D. 2005. Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha*, 7(1): 1-6.

Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2): 108-118.

Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22(9): 1087-1092.

Beales, N. 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food science and Food safety*, 3(1): 1-20.

Beltrán-García, M. J., Ogura-Fujii, T., Manzo-Sánchez, G., & Arias-Castro, C. 2006. Catalasas de hongos fitopatógenos: Factores de virulencia y resistencia a los fungicidas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1): 50-58.

Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., & Fallik, E. 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22(2): 285-290.

Bracey, D., Holyoak, C. D., Nebe-von Caron, G., & Coote, P. J. 1998. Determination of the intracellular pH (pH_i) of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of reduced-expression of the membrane H⁺-ATPase. *Journal of Microbiological Methods*, 31(3): 113-125.

Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. 2004. Decrease of H₂O₂ plasma membrane permeability during adaptation to H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8): 6501-6506.

Brown, D. I., & Griendling, K. K. 2009. Nox proteins in signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(9): 1239-1253.

Bygraves, J. A., & Russell, N. J. 1988. Solute tolerance and membrane lipid composition in some halotolerant food-spoilage bacteria. *Food Microbiology*, 5(2): 109-116.

Camacho Figueroa, Vianney. 2010. *Obtencion de quitosano por desacetilacion de quitina via enzimática* (Doctoral dissertation).

Carrillo-Inungaray, M. L., Ramírez-Zapata, M. R., & Martínez-Castilleja, J. C. 2006. Efecto de solutos sobre el crecimiento de hongos deteriorativos de alimentos. *CYTA-Journal of Food*, 5(2): 142-146.

Ceiro, W. G., Arévalo, J., Puertas, A. L., & Hidalgo-Díaz, L. 2014. Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. *Revista de Protección Vegetal*, 29(2): 122-127.

Ceiro, W. G., Arévalo, J., Puertas, A. L., & Hidalgo-Díaz, L. 2013. Tolerancia de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y W. Gams a diferentes niveles de cloruro de sodio. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1): 70-73.

Cereser, C., Boget, S., Parvaz, P., & Revol, A. 2001. Thiram-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic oxidation of reduced glutathione with consecutive lipid peroxidation and cell death. *Toxicology*, 163(2): 153-162.

Cervantes-García, D., Saúl Padilla-Ramírez, J., Simpson, J., & Mayek-Pérez, N. 2003. Osmotic potential effects on in vitro growth, morphology and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Phytopathology*, 151(7-8): 456-462.

Chapman & Hall. 2nd ed. International Commission on Microbiological. Specifications of Foods (2005) "*Microorganisms in Foods 6*"

Cheah, L. H., Page, B. B. C., & Shepherd, R. 1997. Chitosan coating for inhibition of *Sclerotinia rot* of carrots. 89-92 p

Chien, P. J., & Chou, C. C. 2006. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of *Tankan citrus* fruit (*Citrus tankan* Hayata). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12): 1964-1969.

Choi, G. J., Lee, H. J., & Cho, K. Y. 1996. Lipid peroxidation and membrane disruption by vinclozolin in dicarboximide-susceptible and-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 55(1): 29-39.

Chung, Y. C., Wang, H. L., Chen, Y. M., & Li, S. L. 2003. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource technology*, 88(3): 179-184.

Cooke, R. C., & Whipps, J. M. 1993. *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publications.

Cordero, M. D. L. F., Morales, M. D. J. Y., Angel, D. N., & Gálvez, G. V. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 285-291.

Cota-Arriola O. 2010. Elaboración de quitosano a partir de desechos de camarón y evaluación de sus propiedades antifúngicas ante *Aspergillus parasiticus* y su producción de aflatoxina B1. Tesis de maestría. Universidad de Sonora, Unidad Centro, Hermosillo, Sonora, México.

Cota-Arriola, O., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., López-Franco, Y. L., & Plascencia-Jatomea, M. 2011. Antifungal effect of chitosan on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin B1. *Polymer International*, 60(6): 937-944.

Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews*, 53(1): 121-147.

Deacon, J. W. 1993. Introducción a la micología moderna. Ed Limusa, Notiega editores, Segunda reimpression. Mexico. 11-199 p.

Díaz, D. 2001. Potencialidades biológicas de la quitosana y sus hidrolizados enzimáticos. Trabajo de Diploma, Universidad de La Habana, Facultad de Biología, La Habana.

Dizdaroglu, M. 1992. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6): 331-342.

El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., & Asselin, A. 1992. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology*, 82(4): 398-402.

Emri, T., Pócsi, I., & Szentirmai, A. 1997. Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(5): 809-814.

Ene, I. V., Adya, A. K., Wehmeier, S., Brand, A. C., MacCallum, D. M., Gow, N. A., & Brown, A. J. 2012. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cellular microbiology*, 14(9): 1319-1335.

Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201(8): 1203-1209.

Fuchs, B. B., & Mylonakis, E. 2009. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryotic cell*, 8(11): 1616-1625.

Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., & Heras, Á. 2005. N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate polymers*, 62(4): 316-320.

García Agudo, R., & García-Martos, P. 2009. Aspectos clínicos y microbiológicos de la peritonitis fúngica en diálisis peritoneal. *Nefrología (Madrid)*, 29(6): 506-517.

Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., & Ramírez, M. 2004. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(1): 16-22.

González-Hernández, J. C., & Peña, A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Rev Latinoam Microbiol*, 44(3): 137-156.

Goudarzi, A., Banihashemi, Z., & Maftoun, M. 2008. Effect of water potential on sclerotial germination and mycelial growth of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(2): 107-114.

Gould, G. W. 1989. Drying, raised osmotic pressure and low water activity. *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*, 97 p.

Goy, R. C., Britto, D. D., & Assis, O. B. 2009. A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19(3): 241-247.

Guizzardi, M., Elad, Y., & Ari, M. 1995. Treatments against postharvest fruit diseases using trichodex (*Trichoderma harzianum*). In *Proceedings of the V International Trichoderma/Gliocladium Workshop (Belsville, MD, USA)* 39 p.

Gutierrez, C., Abee, T., & Booth, I. R. 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International journal of food microbiology*, 28(2): 233-244.

Halliwell, B., & Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57(5): 715S-724S.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 186, 1-85 p.

Harris, R.F., 1981. Effect of water potential on microbial growth and activity. In; Par, J.F., W.R. Gardner, L.F. Elliot (eds.), *Water potential relations in soil microbiology*. Special Publication No. 9. *Soil Science Society of America. Madison*, 23-25 p.

Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. 2001. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International journal of food microbiology*, 71(2): 235-244.

Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velazquez-Del Valle, M. G., Méndez-Montevalvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Perez, L. A. 2008. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73(4): 541-547.

Hocking, A. D., Doyle, M. P., & Beuchat, L. R. 2007. Toxigenic *Aspergillus* species. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, 537-550 p.

Hohmann, S., Krantz, M., & Nordlander, B. 2007. Chapter Two-Yeast Osmoregulation. *Methods in enzymology*, 428: 29-45.

Holmes, G.J., and Eckert, J.W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Phytopathology* 89: 716-721.

Hosono, K. 1992. Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salttolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Microbiology*, 138(1): 91-96.

Ikeda, T., Yamaguchi, H., & Tazuke, S. 1984. New polymeric biocides: synthesis and antibacterial activities of polycations with pendant biguanide groups. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 26(2): 139-144.

Imlay, J. A. 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 395-418.

Jamieson, D. J. 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16): 1511-1527.

Jarry, C., Chaput, C., Chenite, A., Renaud, M. A., Buschmann, M., & Leroux, J. C. 2001. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. *Journal of biomedical materials research*, 58(1): 127-135.

Je, J. Y., & Kim, S. K. 2006. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18): 6629-6633.

Jianglian, D., & Shaoying, Z. 2013. Application of chitosan based coating in fruit and vegetable preservation: a review. *Journal of Food Processing & Technology*, 2013.

Katta, S. K., Eskridge, K. M., & Bullerman, L. B. 1995. Mold content of commercial popcorn. *Journal of Food Protection*®, 58(9): 1014-1017.

Kerry, B. R., & Hirsch, P. R. 2011. Ecology of *Pochonia chlamydosporia* in the rhizosphere at the population, whole organism and molecular scales. In *Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes*. Springer Netherlands. 171-182 p.

Koivistoinen, O. M., Richard, P., Penttilä, M., Ruohonen, L., & Mojzita, D. 2012. Sorbitol dehydrogenase of *Aspergillus niger*, SdhA, is part of the oxido-reductive d-galactose pathway and essential for d-sorbitol catabolism. *FEMS letters*, 586(4): 378-383.

Kong, M., Chen, X. G., Liu, C. S., Liu, C. G., Meng, X. H., & Yu, L. J. 2008. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(2): 197-202.

Laflamme, P., Benhamou, N., Bussi eres, G., & Dessureault, M. 2000. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany*, 77(10): 1460-1468.

Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., & Aguirre, J. 2011. *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular microbiology*, 80(2): 436-454.

Ledford, H. K., & Niyogi, K. K. 2005. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell & Environment*, 28(8): 1037-1045.

Lee, H. J., Choi, G. J., & Cho, K. Y. 1998. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2): 737-741.

Li, Q., McNeil, B., & Harvey, L. M. 2008. Adaptive response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3): 394-402.

Lira-Méndez, K., & Mayek-Pérez, N. 200). Potencial Osmótico Variable en el Crecimiento in vitro y la Patogenicidad en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de *Fusarium spp.* *Revista Mexicana de Fitopatolog a*, 24(2).

Lira-Saldivar, R. H., Hernández-Suárez, M., & Hernández-Castillo, F. D. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (DC) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2): 211-216.

Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International journal of food microbiology*, 95(2): 147-155.

Liu, J., Tian, S., Meng, X., & Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3): 300-306.

Lizárraga-Paulín, E. G., Torres-Pacheco, I., Moreno-Martínez, E., & Miranda-Castro, S. P. 2011. Protección contra estrés biótico inducida por quitosán en plántulas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 2(6): 813-827.

López Mengíbar, M. Á. 2012. Obtención y caracterización de quitosanos modificados: Ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria.

Lorito, M, Peterbauer, C., Hayes, C.K. y Harman, G.E. 1994 Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 140(3): 623-629

Maclean, D. J., & Scott, K. J. 1976. Identification of glucitol (sorbitol) and ribitol in a rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. tritici. *Microbiology*, 97(1): 83-89.

Magana-Reyes, M., Morales, M., & Revah, S. 2005. Methyl tert-butyl ether and tert-butyl alcohol degradation by *Fusarium solani*. *Biotechnology letters*, 27(22): 1797-1801.

Mahdavi, B., & Rahimi, A. 2013. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *EurAsian Journal of BioSciences*, 7: 69-76.

Malerba, M., Crosti, P., & Cerana, R. 2012. Defense/stress responses activated by chitosan in sycamore cultured cells. *Protoplasma*, 249(1): 89-98.

Martínez-Camacho, A. P. 2009. Propiedades estructurales y fungistáticas de biopelículas de quitosano obtenido de ensilados de desecho de camarón. Tesis de maestría. Universidad de Sonora, Unidad Centro, Hermosillo, Sonora, Mexico. 10-60 p.

Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M. & Plascencia-Jatomea, M. 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2): 305-315.

McGarrity, J. T., & Armstrong, J. B. 1975. The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 398(2): 258-264.

McMillen, B. G., Juniper, S., & Abbott, L. K. 1998. Inhibition of hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil containing sodium chloride limits the spread of infection from spores. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13): 1639-1646.

Méndez, A. A., & Moreno, M. E. 2009. Las micotoxinas, contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia*, 61: 1-7.

Meury, J. (1988). Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology*, 149(3): 232-239.

Mishra, A. K., & Dubey, N. K. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and environmental microbiology*, 60(4): 1101-1105.

Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Ahmed, M. T., Mahmoud, F. M., Osman, M. A., & Biagianti-Risbourg, S. 2007. Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (*Oligochaeta*, *Tubificidae*). *Chemosphere*, 67(1): 167-175.

Muzzarelli, R. A., Muzzarelli, C., Tarsi, R., Miliani, M., Gabbanelli, F., & Cartolari, M. 2001. Fungistatic activity of modified chitosans against *Saprolegnia parasitica*. *Biomacromolecules*, 2(1): 165-169.

Naudí, A., Jové, M., Ayala, V., Portero-Otín, M., & Pamplona, R. 2010. Glicación de proteínas mitocondriales, estrés oxidativo y envejecimiento. *Revista Española de Geriatría y Gerontología*, 45(3): 156-166.

Ohno, Y., Yano, I., Hiramatsu, T., & Masui, M. 1976. Lipids and fatty acids of a moderately halophilic bacterium, no. 101. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 424(3): 337-350.

Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47: 143-183.

Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., & Lopez-Llorca, L. V. 2008. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of applied Microbiology*, 104(2): 541-553.

Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., & Farkas, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 5(1), 45-57.

Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., & Ravid, U. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 11(1): 33-37.

Patriarca A., Larumbe G., Buera P. y Vaamonde G. 2006 Efecto del sorbitol sobre el crecimiento de hongos xerófilos, Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tercer Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos.

Paul, G. C., Kent, C. A., & Thomas, C. R. 1993. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnology and bioengineering*, 42(1): 11-23.

Peraza, L., & Hansberg, W. 2002. Neurospora crassa catalases, singlet oxygen and cell differentiation. *Biological chemistry*, 383(3-4): 569-575.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. 2009. *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.

Plascencia-Jatomea, M. 2004. Estudios de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, D. F, 160p

Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., & Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*, 3(10): 582-586.

Quintana-Obregón, E. A., Plascencia-Jatomea, M., Burgos-Hernández, A., Guerrero-Ruiz, J. C., Parra-Vergara, N. V., & Cortez-Rocha, M. O. 2010. Extracto metanólico de *Datura stramonium* para el control in vitro e in vivo de *Ramularia cercosporelloides*, agente causal de la falsa cenicilla del cártamo (*Carthamus tinctorius*). *Revista mexicana de micología*, 31: 19-27.

Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. 2008. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology*, 74(12): 3764-3773.

Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6): 1457-1465.

Rahman, M. H., Shovan, L. R., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Eijsink, V. G., Sørli, M., & Tronsmo, A. 2014. Inhibition of fungal plant pathogens by synergistic action of chito-oligosaccharides and commercially available fungicides. *PloS one*, 9(4): e93192.

Rahman, M. H., Shovan, L. R., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Eijsink, V. G., Sørli, M., & Tronsmo, A. 2014. Inhibition of fungal plant pathogens by synergistic action of chito-oligosaccharides and commercially available fungicides. *PloS one*, 9(4): e93192.

Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G. K., & Iwahashi, H. 2002. Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(5): 1041-1045.

Ramos-García, M. D. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejacal, I., & Estrada-Carrillo, M. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1): 44-57.

Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17(5): 359-364.

Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Eslamifar, A., Schmidt, O. J., Gharebaghi, R., Karimian, M. & Sheikhi, M. 2006. Inhibitory effects of Akacid® plus on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 161(4): 245-249.

Reddy, M. B., Angers, P., Gosselin, A., & Arul, J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. *Phytochemistry*, 47(8): 1515-1520.

Rehman, A., Ullah, N., Ullah, H., & Ahmad, I. 2014. Antibacterial and antifungal study of *Cichorium intybus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4: S943-S945.

Rhoades, J., & Roller, S. 2000. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. *Applied and environmental microbiology*, 66(1): 80-86.

Rivero González, D., Cruz Triana, A., Martínez Coca, B., Ramírez Arrebato, M. Á., & Rodríguez Pedroso, A. T. 2009. Actividad antifúngica in vitro de la quitosana Sigma frente a hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Fitosanidad*, 13(2): 101-108.

Rivero, D., del Río, P., Cruz, A., del Río, P., Martínez, B., Ramírez, M. A., ... & del Río, P. 2004. Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium sp.* (No. 2132).

Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. 2009. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(3): 307-317.

Roller, S., & Covill, N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1): 67-77.

Roquebert, M. F. 1998. Les moisissures aiment l'art. *Biofutur*, 1998(180): 26-28.

Roth, W. G., Leckie, M. P., & Dietzler, D. N. 1985. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichiacoli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 126(1): 434-441.

Russell, N. J., Evans, R. I., Ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food microbiology*, 28(2): 255-261.

Russell, N. J., Evans, R. I., Ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. 1995. Membranes as a target for stress adaptation. *International journal of food microbiology*, 28(2): 255-261.

Russell, N. J., Kogut, M., & Kates, M. 1985. Phospholipid biosynthesis in the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola* during adaptation to changing salt concentrations. *Microbiology*, 131(4): 781-789.

Salgado-Nava, A. A., & Jimenez-Munguía, M. T. 2012 Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 6 (2): 160-172

Sánchez, A., Sibaja, M., Vega-Baudrit, J., & Madrigal, S. 2007. Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano. *Revista iberoamericana de Polímeros*, 8: .

Sánchez, F. S. *Solemne Sesión Inaugural Curso 1981. Glioxales con Significado Biológico y sus Mecanismos de Actividad*. Real Academia Nac. Medicina.

Sandford, P. A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications. *Chitin and chitosan*, 253 p.

Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Pantiez, A., Grelier, S., & Coma, V. 2005. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science*, 70(2): M100-M104.

Sena, L. A., & Chandel, N. S. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, 48(2): 158-167.

Ševců, A., El-Temseh, Y. S., Joner, E. J., & Černík, M. 2011. Oxidative stress induced in microorganisms by zero-valent iron nanoparticles. *Microbes and Environments*, 26(4): 271-281.

Shanlin, F. U., STOCKER, R., & DAVIES, M. J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal*, 324(1): 1-18.

Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanova, J., Stadler, N., & Höfer, M. 1999. Oxidative stress in microorganisms—I. *Folia microbiologica*, 44(6): 587-624.

Simionato, J. I., Villalobos, L. D., Bulla, M. K., Coró, F. A. G., & Garcia, J. C. 2014. Application of chitin and chitosan extracted from silkworm chrysalides in the treatment of textile effluents contaminated with remazol dyes. *Acta Scientiarum. Technology*, 36(4): 693-698.

Singh, T., Vesentini, D., Singh, A. P., & Daniel, G. 2008. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2): 116-124.

Solano, J. L., Romero, G. P., & Orozco, A. M. 2000. Efecto del estrés osmótico sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y amaranto (*Amaranthus hypochondrii*). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 23(1): 153-165.

Sperber, W. H. 1983. Influence of water activity on foodborne bacteria—a review. *Journal of Food Protection*®, 46(2): 142-150.

Stadtman, E. R., & Oliver, C. N. 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*, 266(4): 2005-2008.

Stevenson, K. A. P. 1984. Social and economic aspects of prevention of food loss activities.

Storz, P. 2005. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 10(1-3): 1881-1896.

Suárez-Jiménez, G. M., Cortez-Rocha, M. O., Rosas-Burgos, E. C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., & Cinco-Moroyoqui, F. J. 2007. Antifungal activity of plant methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb, and fumonisin B1 production. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2): 134-142.

Sutton, G. C., Quinn, P. J., & Russell, N. J. 1990. The effect of salinity on the composition of fatty acid double-bond isomers and sn-1/sn-2 positional distribution in membrane phospholipids of a moderately halophilic eubacterium. *Current Microbiology*, 20(1): 43-46.

Tappel, A. L. 1973. Lipid peroxidation damage to cell components. In *Federation proceedings* 32(8); 1870

Terry, L. A., & Joyce, D. C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32(1): 1-13.

Tharanathan, R. N., & Kittur, F. S. 2003. Chitin—the undisputed biomolecule of great potential.

Thiruchelvam, M., Prokopenko, O., Cory-Slechta, D. A., Richfield, E. K., Buckley, B., & Mirochnitchenko, O. 2005. Overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase

protects against the paraquat+ maneb-induced Parkinson disease phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23): 22530-22539.

Tin, S., Lim, C. S., Sakharkar, M. K., & Sakharkar, K. R. 2010. Synergistic combinations of chitosans and antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Letters in Drug Design & Discovery*, 7(1): 31-35.

Troller, J. A. 1980. Influence of water activity on microorganisms in foods. *Food Technology (USA)*.

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., & Aziz, A. 2006. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4): 405-413.

Tsai, G. J., & Su, W. H. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection®*, 62(3): 239-243.

TSAI, G. J., SU, W. H., CHEN, H. C., & PAN, C. L. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, 68(1): 170-177.

Turk, M., Mejanelle, L., Šentjerc, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, 8(1): 53-61.

Valenzuela, C., & Arias, J. I. 2012. Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 27(1).

Velásquez, C. L. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1): 1-22.

Wilson, C. L., AHMED, E. G., Chalutz, E., Droby, S., Stevens, C., Lu, J. Y., ... & Arul, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant disease*, 78(9): 837-844.

Xue, G. X., Gao, H. Y., Li, P. M., & Zou, Q. 2004. Effects of chitosan treatment on physiological and biochemical characteristics in cucumber seedlings under low temperature. *Journal of plant physiology and molecular biology*, 30(4): 441-448.

Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., & Hayat, S. 2011. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of Environmental Biology*, 32(5): 667.

Yang, T. C., Li, C. F., & Chou, C. C. 2007. Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of *Escherichia coli* O157: H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *International journal of food microbiology*, 113(3): 258-262.

Yoon, S. J., Park, J. E., Yang, J. H., & Park, J. W. 2002. OxyR regulon controls lipid peroxidation-mediated oxidative stress in *Escherichia coli*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35(3): 297-301.

Yuan, Y., Wan, Z., Yin, S., & Yang, X. 2013. Stability and antimicrobial property of soy protein/chitosan mixed emulsion at acidic condition. *Food & function*, 4(9): 1394-1401.

Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K. J., & Klis, F. M. 2005. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell*, 4(4): 703-715.

Zeng, D., & Luo, X. 2012. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. *Open Journal of Soil Science*, 2(03): 282.

Zhang, J.Q., C.X. Duan, X.M. Wang, Z.D. Zhu, 2011. Study on the biologic characteristic of *Macrophomina phaseolina* causing soybean charcoal rot. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica* S2:435-451.

Zharare, G. E., Kabanda, S. M., & Poku, J. Z. 2010. Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. *Scientia Horticulturae*, 125(2): 95-102.