

Seminario de Investigación para obtener el título de  
Profesora en Química

Puel Catriel Ivana Marisol

Dirigido por Dra. Ferrari Ana

Codirigido por Dra. Sangorrín Marcela

“Evaluación de diferentes condiciones de cultivo sobre la capacidad  
antagónica de la levadura *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263”



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

FACULTAD DE INGENIERIA

Neuquén, 2024

## *Agradecimientos*

Quisiera comenzar diciendo que pertenezco a la primera generación de estudiantes universitarios en mi familia, y que, sin la condición de pública y gratuita de nuestra universidad no hubiera sido posible contar con mi formación, tampoco sin el sistema de becas que me permitió instalarme en la residencia estudiantil al iniciar mi carrera. Es por ello que mi primer agradecimiento es a la Universidad Nacional del Comahue por alojarme y brindarme la oportunidad de estudiar. Estamos viviendo un escenario en el que la educación gratuita está en peligro y defenderla es una obligación, sobre todo de quienes la transitamos y vivimos cotidianamente.

Ahora sí, los demás agradecimientos.

A mi mamá y hermanos, que fueron el sostén durante este proceso, Clotilde, Emilio, Ricardo y Víctor les agradezco infinitamente por apoyarme económica y emocionalmente, sobre todo por sembrar las ganas de ser profesional universitaria. Mamá hace un lugarcito en la pared, en breve va el título.

A mi compañero de vida Umaw, por estar para apoyarme en todo y proyectar la vida juntos con amor y convicción.

A mi fiel compañía felina, Amino y Remo, que estuvo días y noches compartiendo mi estudio, trabajo y nervios.

A mis sobris Uli, Lisan, Luz, Jana, Kimvn y Liq, que con su curiosidad y amor iluminan mis días y me hacen mejor persona.

A todas las personas de la universidad que han apoyado mi formación a lo largo de este proceso. La primera que quiero mencionar es Dani, que por azar y decisión del querido profe David Islas, terminó siendo mi compañera de grupo y se convirtió en una gran amiga. A Deby que siempre estuvo para cada cosa que necesité y me motivó para que terminara mi carrera. Al hermoso grupo de profes de química: Ana, Vani, Mica, Yazmi y Dani (otra vez), colegas y amigas que admiro y quiero muchísimo. A mis compañeros de estudio y días de mate y risas en la salita, Cristhian, Yanco, Giuliano y especialmente a Damián, con quien nos acompañamos muchos años y también me ayudó con la escritura inicial de este trabajo. A mi querida compañera de tutorías (otro de los espacios que pude habitar), Flor, que siempre me acompaña aunque esté lejos.

A mi equipo de cátedra de Química para Licenciatura en Ciencias Geológicas, Vicky, Mili, Flor, y especialmente Jime y Ale, que siempre me apoyaron y confiaron en mí (por fin van a dejar de preguntar por la tesis).

A quienes han dirigido este seminario de investigación. Marcela gracias por abrirme las puertas y por todo lo transmitido. Ana, siempre estaré agradecida por la paciencia, amor y profesionalismo que le pones a todo, gracias por incentivar me a terminar este trabajo y por todo tu conocimiento compartido. A Betina, que me permitió trabajar en el laboratorio y enseñó muchas cosas.

A mis amigas y compañeras de vida, Meli y Yuli que siempre confían en mí y me motivan a superarme constantemente.

A mis colegas y amigas de la escuela de enfermería, Ana, Maribel y Noe, gracias por este hermoso grupo que (con su señal especial) contiene, motiva y alegra mis jornadas.

A mis cuñadas, Vane y Caro. En especial a Vane con quien compartimos estudio y casita.

A mi amiga Ele, siempre te llevo en el corazón y agradezco haberte conocido bailando en el barcito de ingeniería.

A Luisa, Pewtun, Amaru, Lef, Kato, Noe y Jorge, por estar acompañando todos los días, los quiero mucho.

A mi Lofce (comunidad) Newen Mapu que acompaña, enriquece mi identidad y apuesta a la educación intercultural todos los días.

Me recibo con mi apellido, Puel Catriel, después de varios años de haber finalizado la carrera y muchos más de estar ejerciendo la docencia. Agradecida a la vida por llevarme por caminos de conciencia y elecciones propias. Agradecida de haber tenido la fortaleza para no abandonar este proyecto.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
1. Producción de peras en Argentina.....	7
1.1 Cadena productiva en el Alto Valle .....	7
1.2 Pérdidas en postcosecha de peras .....	9
2. Estrategias de manejo de las enfermedades postcosecha .....	11
2.1 Aplicación de fungicidas de síntesis química .....	11
2.2 Manejo integrado de plagas y producción orgánica.....	13
2.3 Control biológico postcosecha con levaduras.....	14
2.4 Mecanismos de acción de los agentes de control biológico.....	18
3. Resistencia al estrés oxidativo en levaduras.....	20
3.1. Métodos de detoxificación enzimáticos.....	21
4. Características de la levadura <i>Vishniacozyma victoriae</i> .....	23
4.1 Cultivo de <i>Vishniacozyma victoriae</i> en sustrato económico.....	24
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
Objetivo general .....	27
Objetivos específicos.....	27
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
1. Preparación del material microbiológico y vegetal.....	28
1.1 Microorganismos y preparación de inóculo.....	28
1.2 Frutas de producción orgánica .....	30
2. Condiciones y medios de cultivo.....	30
3. Ensayos de actividad antagónica <i>in situ</i> en pera .....	30
3.1 Ensayo de colonización en herida.....	32
3.2 Análisis estadístico .....	32
4. Ensayos de tolerancia al estrés oxidativo .....	32
4.1 Cuantificación de la trehalosa intracelular.....	33
4.2 Exposición a peróxido de hidrógeno.....	34
4.3 Análisis estadísticos.....	36
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>

1. Ensayos de actividad antagonica <i>in situ</i> en pera.....	37
2. Colonización en heridas de peras .....	38
3. Evaluación de parámetros de respuesta al estrés oxidativo .....	39
3.1 Cuantificación de trehalosa intracelular.....	39
3.2 Ensayos de exposición a peróxido de hidrógeno .....	40
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
1. Biocontrol: antagonismo en ensayos <i>in situ</i> en pera.....	44
2. Acondicionamiento fisiológico y respuesta al estrés oxidativo.....	46
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>
<b>PROPUESTA DIDÁCTICA.....</b>	<b>62</b>
I. Fundamentación .....	62
II. Objetivos .....	66
III. La producción de peras en el Alto valle de Neuquén y Río Negro, los microorganismos, los plaguicidas y el medio ambiente como temas disparadores.....	66
IV. Primera propuesta didáctica .....	68
V. Segunda propuesta didáctica .....	80
VI. Conclusiones .....	92
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>93</b>

## RESUMEN

El alto Valle de Río Negro y Neuquén constituye unas de las principales áreas productoras y exportadoras de peras de Argentina. Las variedades de peras con mayor volumen de exportación son Beurré D'Anjou y Packham's Triumph, y se almacenan en cámaras frigoríficas (-1 a 0 °C y 95% HR) entre 3 y 7 meses. Es durante este periodo que se producen grandes pérdidas por la aparición de enfermedades de postcosecha, siendo los patógenos más importantes presentes en esta etapa son *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. El uso de fungicidas es la primera medida en el control de enfermedades en postcosecha. Sin embargo, esta medida se encuentra actualmente en reconsideración debido a los problemas de toxicidad asociados al uso de estos compuestos. En este contexto, la producción orgánica de alimentos y el Control Biológico resultan alternativas prometedoras para la producción de alimentos inocuos.

En trabajos previos del grupo de investigación se aisló y seleccionó la levadura *Vishniacozyma victoriae* con capacidad antagonista y se optimizaron las condiciones de cultivo en melaza de caña de azúcar como sustrato económico. En este trabajo, se evaluó la colonización de heridas de pera, así como también la capacidad antagonista de una cepa de *V. victoriae* producida en condiciones no optimizadas (NOP) y optimizadas (OP) mediante bioensayos *in situ*. La levadura fue capaz de colonizar las heridas de pera, mostrando un mayor número de unidades formadoras de colonia cuando provenía de la condición NOP, a tiempos mayores a 40 días. Los resultados de bioensayos *in situ* mostraron igual porcentaje de disminución de la enfermedad causada por *B. cinerea* con la levadura crecida en OP y NOP, en cambio para *P. expansum* se observó un biocontrol del 100% de la enfermedad con la levadura crecida en NOP y 85% cuando creció en OP.

A fin de estudiar las posibles causas de esa diferencia en la capacidad antagonista se evaluó el acondicionamiento fisiológico de las levaduras. Se realizaron estudios de tolerancia al estrés oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se observó que *V. victoriae* crecida en la condición NOP presentó mayor viabilidad y un aumento protector de la actividad catalasa (CAT) frente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferencia de la crecida en la condición OP en la que se observó disminución de CAT y mayor incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs). Por otra parte, la levadura crecida en la condición NOP presentó mayor nivel basal de glutatión reducido (GSH) y trehalosa intracelulares, por lo tanto, tiene mejor respuesta frente al estrés oxidativo y estaría más adaptada para soportar las condiciones prooxidantes presentes en heridas de pera.

Los resultados obtenidos sugieren que la resistencia al estrés oxidativo podría representar un mecanismo por el cual *V. victoriae* mejora la eficacia como agente de control biológico (ACB), cuando se desarrollan en la condición NOP.

La investigación realizada permitió generar propuestas áulicas experimentales para ser trabajadas con estudiantes en el nivel Secundario en el área de Ciencias Naturales perteneciente al nuevo diseño curricular. En este sentido se propone utilizar las levaduras como tema disparador de diferentes contenidos de la disciplina, resaltándose la ventaja de ser llevada a cabo en el laboratorio con materiales fáciles de conseguir. Asimismo, por la familiaridad de las sustancias utilizadas, es una propuesta sencilla y que puede generar interés en estudiantes de diferentes edades.

**Palabras clave:** biocontrol, levaduras, postcosecha, estrés oxidativo.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Producción de peras en Argentina

#### 1.1 Cadena productiva en el Alto Valle

Argentina ocupa el puesto N°17 en producción de frutas a nivel mundial, con un volumen de 5.322.357 toneladas (Tn). Además, es el tercer mayor productor de peras y el segundo mayor exportador global de manzanas, liderando la exportación en el hemisferio sur. A nivel nacional, el sector frutícola se encuentra en el 7° lugar con el 4% del total de las exportaciones, siendo el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (AVRNyN) (Figura 1) quien concentra el 90 % de la superficie en la producción de peras y manzanas del país. La producción anual de frutas de pepitas actual alcanza las 560.000 Tn de peras y 420.000 Tn de manzanas. Si bien la producción es baja en comparación con el periodo anterior al año 2015, se encuentra en niveles dentro del promedio 2016-2021 (Barrios López, 2022).

Según datos del SENASA, en la región del AVRNyN se registraron 35.699 ha de frutales de pepita, en donde 18.411 ha pertenecen a la pera. De esa superficie total, cerca del 85,8 % se encuentra en la provincia de Río Negro y el 14,2 % restante en la provincia de Neuquén. En cuanto a las principales variedades de peras plantadas, William's Bon Chrétien suma 7.419 ha, Packham's Triumph 5.375 ha y Beurré D'Anjou 2.711 ha, Abate Fetel 921 ha y 2.025 ha otras variedades (Beurré Bosc, Beurré Giffard, Clapps Favourite y Red Beurré D'Anjou) (Santagni *et al.*, 2022).

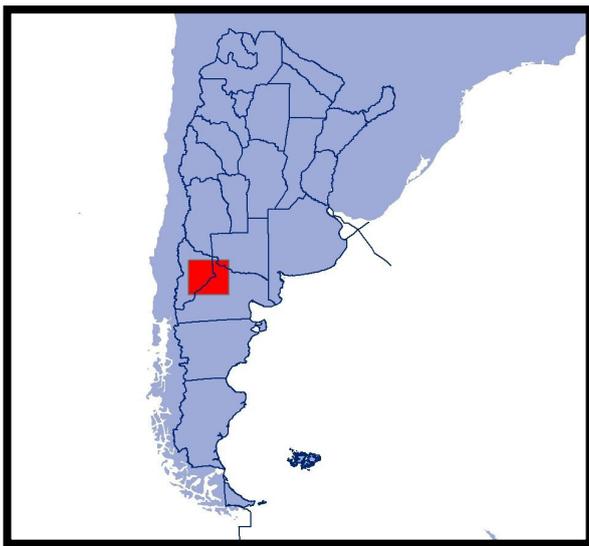


Figura 1. Alto Valle de Río Negro y Neuquén

El cultivo de pera en la región presenta ventajas agroecológicas, obteniendo cosechas con altos rendimientos y de alta calidad, lo cual ocasiona que sea una actividad económicamente competitiva. En el mercado internacional Argentina presenta una ventaja competitiva, por su carácter de comercializador de productos frescos en contraestación en relación con el hemisferio norte, compitiendo con países como Chile y Sudáfrica.

El principal destino de la producción de peras se orienta a la exportación, lo que representa el 60%, mientras que el mercado interno constituye el 13% y la industria el 27%. En cuanto a los destinos de exportación de la producción regional, los principales importadores son Brasil con 100.000 Tn, Rusia con 88.000 Tn y la Unión Europea con 30.000 Tn, y, en menor medida, países asiáticos y latinoamericanos (Santagni *et al.*, 2022).

Existen dos etapas en la cadena productiva de la pera: la producción y el proceso industrial. La mayor parte de la producción de esta fruta (72%) se destina al consumo en fresco, y el 28% restante (fruta de menor calidad) se utiliza como materia prima para la producción de jugos y en menor proporción sidra, fruta deshidratada y conservas (Ministerio de Economía. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022).

La etapa industrial es la que se ocupa del procesamiento de la fruta en fresco y comprende el empaque y la conservación en frío previa a la llegada al consumidor. El procesamiento de la fruta en fresco para la exportación va desde la clasificación de la fruta (bajo parámetros de sanidad, tamaño y color) hasta el envasado que difiere según el destino de exportación. Para que la fruta mantenga sus cualidades durante todo el periodo de conservación hasta su exportación, es indispensable el uso de cámaras de baja temperatura. Los frigoríficos que se encuentran localizados en la zona del AVRNYN utilizan dos tipos de tecnologías para este fin: frío convencional y atmósfera controlada.

Si bien, el principal varietal de pera producido en la región es William's Bon Chrétien, este solo se vende en fresco y no es apto para períodos largos de conservación. Por otro lado, los variedades Packham's Triumph y Beurré D'Anjou pueden permanecer en conservación durante 6-7 meses, por lo cual constituyen variedades más apropiados para la aplicación de agentes de control biológico.

La fruta de exportación está sujeta a una serie de barreras arancelarias y barreras no arancelarias. Las arancelarias corresponden al pago de un arancel según el destino de exportación mientras que las no arancelarias (presentes principalmente en la Unión Europea y

Brasil) son exigencias basadas en el producto, como los límites máximos de residuos de agroquímicos y contaminantes. Los límites de estos residuos se suelen basar en las Buenas Prácticas Agrícolas y persiguen el fin de lograr frutas sin efectos tóxicos para la salud humana. La respuesta a estos requerimientos ha surgido a través de la producción orgánica de frutas, que no permite el uso de compuestos de síntesis química y que busca preservar la calidad de los frutos mediante la aplicación de tecnologías no agresivas para la salud humana y respetuosas del medio ambiente. En Argentina existen 10.608 ha cosechadas de frutales bajo producción orgánica, los cultivos más importantes son manzana (19%) y pera (32%). En las provincias de Neuquén y Río Negro se producen casi la totalidad de estos cultivos orgánicos del país (SENASA, 2023). En los últimos 10 años, la exportación total de peras disminuyó de 450.000 Tn a 300.000 Tn. Sin embargo, durante ese mismo período, la exportación de peras orgánicas aumento de 22-24.000 Tn a 25-30.000 Tn, reflejando un creciente interés por parte de los países importadores y de los consumidores en los productos orgánicos. Dada esta importancia de la producción de peras orgánicas para exportación, es que nuestros ensayos fueron realizados para esta fruta de pepita.

## 1.2 Pérdidas en postcosecha de peras

En el caso de la pera, las principales pérdidas registradas durante la postcosecha se pueden agrupar, de acuerdo con su origen, en dos categorías: fisiogénicas y desórdenes físicos o enfermedades patogénicas de origen fúngico. En la primera categoría se agrupan aquellos frutos que sufren daños por congelamiento, por altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, bajas de O<sub>2</sub> o directamente escaldaduras superficiales. Por otro lado, en la segunda categoría, se registran aquellos frutos que sufren enfermedades producto de patógenos en heridas.

### 1.2.1 *Penicillium expansum*

*Penicillium expansum* es el patógeno fúngico que mayores pérdidas genera, superiores al 70%, en la etapa de postcosecha de frutas y vegetales (Pianzola *et al.*, 2004; Mostafavi *et al.*, 2013; Errampali *et al.*, 2014). Se trata de un hongo de difusión universal y saprófito de herida, que se desarrolla a partir de las mismas mediante hidrólisis pectinolítica. La enfermedad causada por este hongo se denomina moho azul, debido al color de sus conidios (Figura 3). Al principio de la infección los síntomas de enfermedad en la fruta aparecen como lesiones blandas y acuosas de color marrón. Las lesiones tienen márgenes definidos entre tejidos enfermos y sanos y las lesiones más antiguas pueden cubrirse con esporas verdeazuladas (Errampali *et al.*, 2014).

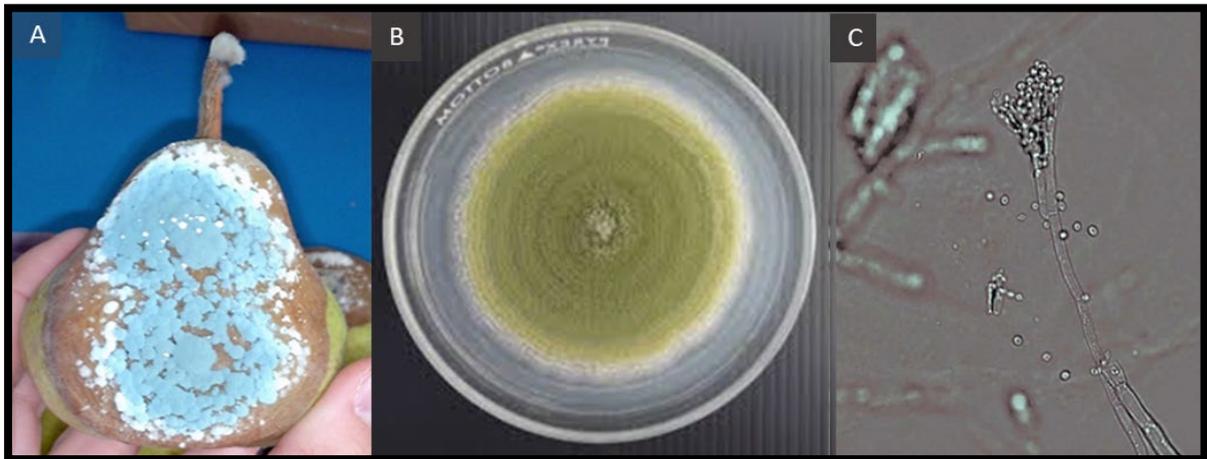


Figura 2. (A) Enfermedad causada por el moho azul en peras del varietal Packham's Triumph (B) Crecimiento de *P. expansum* en medio agar papa. (C) Conidióforo de *P. expansum* aumento 40X.

### 1.2.2 *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* es un parásito necrótrofo, que produce la muerte de la célula del hospedante provocando una podredumbre progresiva del tejido vegetal infectado. A nivel mundial causa pérdidas anuales de entre 10 mil millones a 100 mil millones de dólares, dado que es capaz de tolerar una amplia gama de fungicidas (Boddy, 2016). Es un hongo de crecimiento rápido capaz de crecer a expensas de una gran variedad de sustratos; sobrevive como micelio en restos vegetales en descomposición y también en forma de esclerocio (Staats *et al.*, 2005). Afecta a más de 200 especies de cultivos en todo el mundo. Es más destructivo en tejidos maduros y senescentes; sin embargo, generalmente está en el tejido desde etapas más tempranas de desarrollo del cultivo y permanece inactivo durante un periodo considerable antes de ocasionar que los tejidos se pudran rápidamente cuando existe un ambiente propicio y un cambio en la fisiología del hospedante (Williamson *et al.*, 2007).

El control de *B. cinerea* resulta complicado debido a sus múltiples modos de ataque y a la diversidad de hospedadores que sirven como fuente de inóculo. Además, este hongo puede sobrevivir en forma de micelios y/o conidios (Figura 3C) y también puede permanecer inactivo durante períodos prolongados como esclerocios.

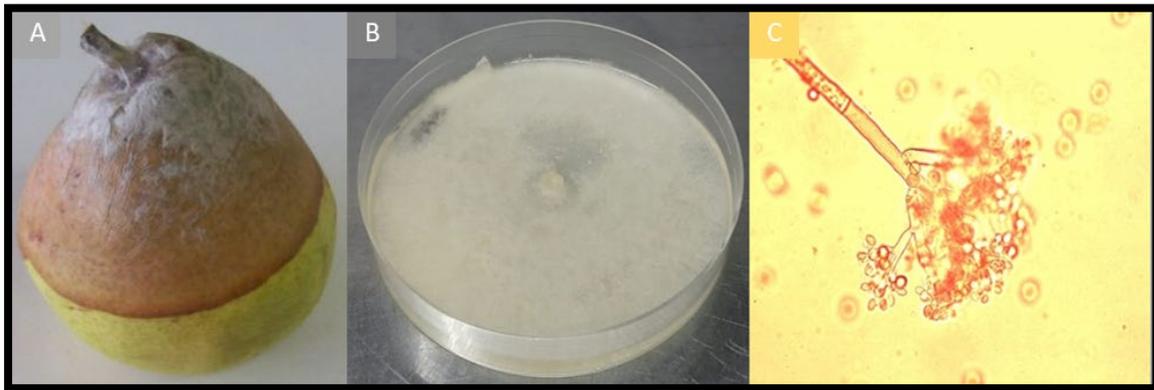


Figura 3. (A) Enfermedad causada por el moho gris en peras del varietal Packham's Triumph. (B) Crecimiento *B. cinerea* en medio agar papa. (C) Conidióforo de *B. cinerea* aumento 40X.

## 2. Estrategias de manejo de las enfermedades postcosecha

Existen distintas prácticas de manejo postcosecha que se llevan a cabo con el fin de prevenir la aparición de patógenos en esta etapa de la cadena productiva. En el AVRNYN los patógenos de postcosecha con mayor incidencia son los descritos previamente: *B. cinerea* y *P. expansum*. Las estrategias empleadas para controlar a los patógenos comienzan por el manejo a campo, con un buen manejo nutricional del monte y prácticas de fertilización equilibradas, las cuales estimulan la resistencia natural de los frutos. Posteriormente en la fase de cosecha de la fruta, se recomienda cosechar frutos en madurez fisiológica, evitar golpes y heridas en los mismos, y, por último, desinfectar las canastas de cosecha y los bins.

En planta de empaque se sugiere el manipuleo cuidadoso para evitar golpes y heridas, la higiene adecuada de las instalaciones, la protección de la fruta con fungicidas u otro tratamiento preventivo y el almacenamiento a bajas temperaturas, con altos porcentajes de humedad relativa (HR) y en distintos tipos de atmosferas (atmosfera modificadas o controladas).

El cumplimiento de estas pautas no resulta suficiente para controlar totalmente a los patógenos postcosecha, razón por la cual se requiere la aplicación de productos químicos que aseguren la producción de la fruta.

### 2.1 Aplicación de fungicidas de síntesis química

La aplicación de fungicidas en postcosecha es de carácter preventivo con el objetivo de proteger a la fruta de la acción de los patógenos. El objetivo de esta práctica es la aplicación de

un principio activo que asegure la protección durante todo el periodo de almacenamiento de la fruta.

La limitación más importante de esta práctica consiste en que según el mercado comprador, existe un número restringido de principios activos autorizados con un límite máximo de residuos (LMR) permitidos en la fruta (Tabla 1).

*Tabla 1. Límites máximos de residuos permitidos para peras*

Grupo químico	Principio activo	Límites máximos permitidos (ppm)		
		ARG	USA	UE
<b>Ftalimida</b>	Captan	15,0	25,0	10,0
<b>Benzimidazol</b>	Carbendazim	1,0	NR	0,2
	Metil tiofanato	1,0	3,0	0,5
	Tiabendazol (TBZ)	3,0	10	4,0
<b>Dicarboximida</b>	Iprodione	5,0	RST	0,01
<b>Fenilpirroles</b>	Fludioxonil	5,0	5,0	5,0
<b>Imidazoles</b>	Imizalil	2,0	RST	0,01

Adaptada de Agon *et al.* (2022). NR: no registrado, aplica tolerancia cero. RST: registrado, pero sin tolerancia para peras y manzanas.

Por otra parte, el uso continuo de un mismo fungicida lleva a la generación de resistencia en el patógeno. Esta situación es usualmente irreversible y propia de cada empaque, según el manejo de los tratamientos químicos que se hayan llevado a cabo en ese lugar. Algunos principios activos son más susceptibles de generar resistencia, y como consecuencia el hongo logra evadir su efecto en las aplicaciones repetidas. Las esporas son las que siguen reproduciéndose, por lo que la descendencia es resistente y así, en poco tiempo, la mayor parte del inóculo no responde a la acción del fungicida aplicado. Distintos autores han reportado la aparición de cepas de *P. expansum* y *B. cinerea* resistentes al uso de benzimidazoles (Yourman & Jeffers, 1999; Shorbelg *et al.*, 2005). La resistencia a los fungicidas adquirida por estos patógenos es persistente, esto significa que se mantuvo aún después de muchos años de no aplicar ningún principio activo de este grupo (Jijakli & Lepiovre, 2004).

El uso de estos compuestos químicos se ha restringido debido a la resistencia generada en los patógenos, a efectos carcinogénicos, teratogénicos, alto nivel residual, periodos largos

de degradación y contaminación ambiental (Bautista-Baños, 2006; Palou *et al.*, 2008; Romanazzi *et al.*, 2016).

## 2.2 Manejo integrado de plagas y producción orgánica

Frente a la necesidad de la disminución o desaparición del uso de fungicidas de síntesis química, ante un mercado que los limita y consumidores que exigen prácticas más saludables, aparece la alternativa del manejo integrado de plagas (MIP) y la producción orgánica.

El MIP se define como un enfoque de sistemas para abatir el daño por plagas a niveles tolerables. La estrategia de MIP generalmente descansa primero en las defensas biológicas contra las plagas, antes que alterar químicamente el ambiente. El enfoque de la protección integrada de plantas es el desarrollo sostenible y su sistema de producción fue descrito por Boller *et al.* (1999). Todas las medidas de protección de plantas profilácticas disponibles deben aplicarse antes de que se usen las medidas de control directo. La decisión de la aplicación de medidas de control directo debe basarse en umbrales económicos y evaluaciones de riesgo. Se debe dar prioridad a los métodos naturales, culturales, biológicos, genéticos y biotecnológicos de control de enfermedades y se debe minimizar el uso de agroquímicos (Cross, 2002). Por el momento, el MIP, se desarrolló con éxito principalmente para la protección contra insectos y patógenos fúngicos antes de la cosecha, como la sarna de la manzana o el oídio. El MIP permite el uso de fungicidas solo cuando no se disponga de métodos no químicos adecuados (Jijakli & Leproivre, 2004)

La producción orgánica, se diferencia del MIP en que los fungicidas de síntesis química no se encuentran permitidos utilizando como estrategia el manejo preventivo de plagas y enfermedades. De acuerdo con el Manual Internacional de Inspección Orgánica (Riddle & Ford, 2000), la agricultura orgánica incluye todos aquellos sistemas agrícolas que promueven la producción de alimentos y fibras que sean ambiental, social y económicamente sustentables. Este tipo de agricultura no permite el uso de productos de síntesis química, brinda alimentos sanos, abundantes y mantiene o incrementa la fertilidad del suelo, la diversidad biológica y permite asimismo la identificación clara por parte de los consumidores de las características señaladas a través de un sistema de certificación que las garantiza (Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal - Res.423/92).

El control biológico en postcosecha es una alternativa prometedor, para la aplicación del MIP y la producción orgánica, ya que este permite la reducción del uso de fungicidas de

síntesis química para controlar patógenos de postcosecha. El desarrollo de resistencia a los fungicidas de síntesis, sumado a las consideraciones ambientales y de salud, se encuentran entre los impulsores para el desarrollo de tecnologías de manejo de enfermedades alternativas que sean seguras y efectivas (Droby et al, 2016).

### **2.3 Control biológico postcosecha con levaduras**

El control biológico es una disciplina en auge desde hace 40 años. Debido a las exigencias actuales de sanidad y ambientales, el mismo se presenta como una alternativa al uso de fungicidas. A lo largo de los años se ha definido al control biológico de diversas maneras: Baker & Cook (1974) lo definen como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista o por la introducción masiva de uno o más antagonistas”. Por su parte, Eilenberg *et al.* (2001) indican que “es el uso de organismos vivos para disminuir o suprimir la densidad poblacional o el impacto de un determinado organismo plaga, haciéndolo menos abundante o dañino”. Una definición práctica fue dada por Barkai-Golan (2001) que enuncia que el término control biológico se refiere al uso de microorganismos que se encuentran naturalmente y que antagonizan a los patógenos postcosecha que deseamos suprimir. En el sector agroalimentario, el biocontrol se refiere a un conjunto de estrategias emergentes que son alternativas al uso de productos químicos para mitigar las enfermedades en frutas y hortalizas (Zhang et al., 2020). Se supone que el control biológico de las enfermedades de las plantas ocurre naturalmente en las superficies aéreas de las plantas y puede ser una de las razones principales por las que los frutos están protegidos en cierta medida durante su cultivo (Droby *et al.*, 2016).

Existen dos posibles vías para controlar las enfermedades de postcosecha mediante el uso de microorganismos antagónicos: estimular y manejar antagonistas que ya existen sobre la superficie del fruto o bien introducir artificialmente antagonistas contra los patógenos (Viñas *et al.*, 2006). Es por esta razón que durante los últimos 30 años se han desarrollado una gran cantidad de investigaciones con el fin de explorar y desarrollar estrategias basadas en antagonistas microbianos para controlar biológicamente los patógenos postcosecha (Spadaro & Droby, 2016).

Los microorganismos antagonistas más comúnmente usados (algunas levaduras y bacterias) están presentes de forma natural en las superficies de las frutas, por lo que este

sustrato es la principal fuente de potenciales antagonistas para el control de los patógenos postcosecha (Wilson & Wisniewski, 1992). Para seleccionar un posible agente de control biológico (ACB), este microorganismo debe reunir ciertas características pensando en la aplicación directa sobre la fruta en postcosecha. Las levaduras reúnen estas características, listadas en la Tabla 2, que las hacen efectivas para su aplicación en alimentos frescos, tales como frutas y verduras.

*Tabla 2. Características de levaduras utilizadas como ACB en frutas*

**Características de levaduras para control biológico de hongos en frutas.**

- Genéticamente estables
- Efectivas a bajas concentraciones
- Requerimientos nutricionales bajos
- Capaces de sobrevivir en condiciones ambientales adversas (bajas/altas temperaturas, estrés oxidativo y atmosfera controlada)
- Efectivo en un gran rango de patógenos y gran variedad de frutas
- Fácil de producir en medios de cultivos de bajo costo
- Capaces de ser formulados con larga vida útil y de fácil aplicación.
- Compatibles con los procedimientos de procesamiento comerciales
- Resistentes a los plaguicidas, amigables con el medio ambiente y no patógenas para el hospedante tratado
- No crecer a 37°C, ni ser patógena para las personas

*Adaptada de Di Canito et al. (2021).*

Las levaduras son tolerantes a las condiciones ambientales extremas que prevalecen antes y después de la cosecha (temperaturas extremas, desecación, amplio rango de humedad relativa, niveles bajos de oxígeno, fluctuaciones del pH, radiación UV). Además, están especialmente adaptadas al microambiente de la fruta (alta concentración de azúcar, alta presión osmótica y bajo pH). Pueden lograr crecimientos rápidos en sustratos económicos en fermentadores y, por lo tanto, son fáciles de producir en grandes cantidades (Spadaro *et al.*, 2010). No producen esporas alergénicas ni micotoxinas, en contraste con los hongos filamentosos, y tienen requisitos nutricionales simples que les permiten colonizar las superficies secas durante largos períodos de tiempo. Producen grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que intensifican su supervivencia. Además, entre los consumidores presentan una

imagen positiva respecto a su utilización en productos alimenticios, a diferencia de las bacterias. Una gran cantidad de los ACB reportados en bibliografía son levaduras, algunos ejemplos se presentan en la Tabla 3.

*Tabla 3. Levaduras aisladas de superficie de fruta reportadas como agentes de control biológico*

<b>Fruta</b>	<b>Especie de levadura</b>	<b>Referencia</b>
<b>Tomate</b>	<i>Candida oleophila</i>	Saligkarias <i>et al.</i> , (2002)
<b>Uva</b>	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Kurtzman & Droby (2001)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Suzzi <i>et al.</i> , (1995)
	<i>Zygosaccharomyces</i>	Suzzi <i>et al.</i> , (1995)
<b>Naranja</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Da Cunha <i>et al.</i> , (2018)
	<i>Candida stellimalicola</i>	Da Cunha <i>et al.</i> , (2018)
<b>Manzana</b>	<i>Candida ciferri</i>	Vero <i>et al.</i> , (2002)
	<i>Candida sake</i>	Viñas <i>et al.</i> , (1998)
	<i>Papiliotrem alaurentii</i>	Qin <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Qin <i>et al.</i> , (2004)
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Agirman & Erten, (2020)
<b>Pera</b>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Robiglio <i>et al.</i> , (2011)
	<i>Papiliotrema laurentii</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2007)
	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Lutz <i>et al.</i> , (2020)
	<i>Pichia membranifaciens</i>	Lutz <i>et al.</i> , (2020)
<b>Durazno</b>	<i>Pichia membranifaciens</i>	Fan & Tian (2000)
<b>Limón</b>	<i>Pichia fermentans</i>	Pérez <i>et al.</i> , (2016)
<b>Limón</b>	<i>Cystofilobasidium informominiatum</i>	Vero <i>et al.</i> , (2011)
<b>Kiwi</b>	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	Nian <i>et al.</i> , (2023)

*Adaptada de Agirman et al. (2023).*

Debido a que la mayoría de las levaduras son consideradas GRAS (por sus siglas en inglés: Generally Recognize as Safe), en la actualidad integran algunas de las formulaciones comerciales de ACB que existen en el mercado (Tabla 4).

Tabla 4. Levaduras antagonistas formulados comercialmente

Levaduras	Nombre comercial	Patógeno blanco	Fruta
<i>Aureobasidium pulullans</i>	Botector	<i>Erwinia. amylovora</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioide</i>	Uva, frutilla, tomate.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Blossom Proctect	<i>B. cinerea</i> , <i>E. amylovora</i> , <i>Neofabraea spp.</i> , <i>Monilia fructigena</i> , <i>P. expansum</i> .	Pera, manzana, membrillo.
<i>Candida oleophila</i>	Nexy	<i>Botrytis</i> , <i>Penicillium</i>	Pera, manzana, cítricos, plátano.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Romeo	<i>B. cinerea</i> , <i>Erysiphe</i> .	Uva, lechuga, tomate, frutilla, pepino.

Adaptado de Kowalska et al. (2022) y Zhang et al. (2020).

El desarrollo de un ACB para el control de las enfermedades postcosecha es un proceso largo y costoso, que implica un proceso investigación y desarrollo tecnológico de gran envergadura (Figura 4). Son fácilmente distinguibles dos etapas en el proceso: la de descubrimiento y la de desarrollo comercial.

La fase de descubrimiento incluye desde el aislamiento de los potenciales ACB hasta las pruebas de eficacia a escala laboratorio, semicomercial e incluso escala comercial en la planta de empaque, con el fin de evaluar su comportamiento frente a diferentes patógenos y su compatibilidad con las prácticas habituales de la postcosecha (Nunes, 2012). También se añade a esta fase, el estudio de los posibles mecanismos de acción de los ACB, requerimientos nutricionales y estrategias de mejora de su actividad antagónica.

La segunda fase, es la de desarrollo comercial, que incluye las etapas de producción de biomasa, desarrollo de un producto formulado, los estudios sobre la seguridad biológica del microorganismo y finalmente el registro (Nunes, 2012).

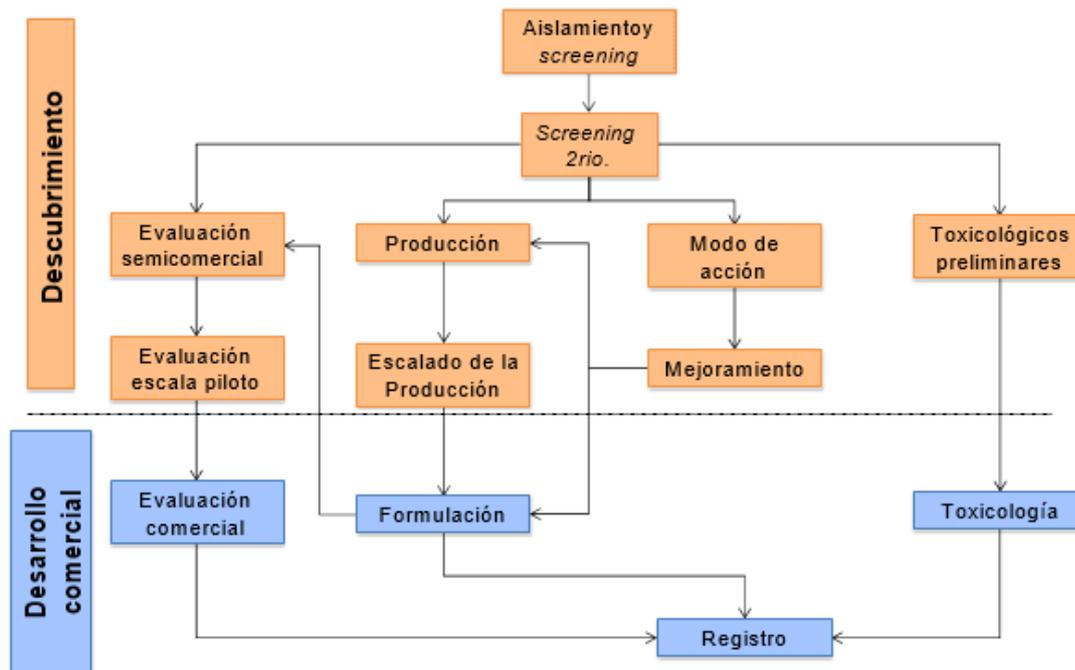


Figura 4. Etapas implicadas en el desarrollo de un ACB postcosecha (Nunes, 2012).

Una vez superadas las primeras etapas del descubrimiento es sumamente importante obtener una elevada producción del ACB, evaluar el acondicionamiento fisiológico del mismo de acuerdo con la preparación de su biomasa para enfrentar la situación de secado en la formulación, las condiciones prooxidantes que se producen en las heridas y lograr una formulación adecuada para lograr posicionarlo a nivel comercial.

#### 2.4 Mecanismos de acción de los agentes de control biológico

Los ACB poseen diversos mecanismos de acción como estrategia para hacer frente a los patógenos postcosecha causantes de enfermedades. Un ACB puede utilizar uno o varios de ellos al momento de enfrentar la infección del patógeno. Si bien se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos de acción utilizados por diferentes antagonistas, dilucidar el mecanismo exacto de acción no es una tarea sencilla debido a la complejidad entre las interacciones presentes (ACB-patógeno-hospedante-ambiente), ya que no existe un único mecanismo presente (Liu *et al.*, 2013). No obstante, conocer los mecanismos permite trazar estrategias para mejorar los ACB y realizar formulaciones adecuadas que permitan conservar su capacidad

antagónica (Droby *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). Los principales mecanismos de acción de un ACB son: la competencia de nutrientes y/o espacio, el parasitismo y amensalismo, la inducción de resistencia y la producción de biofilms (Di Canito *et al.*, 2021; Verma *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020) (Figura 5).

La competencia de nutrientes (por ejemplo, carbohidratos, nitrógeno, oxígeno) o espacio es uno de los principales mecanismos de acción reportados en bibliografía (Spadaro & Droby., 2016). Este tipo de competencia se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento que se encuentra en cantidad limitante (Spadaro *et al.*, 2010). La rápida colonización de la herida de la fruta por parte del antagonista es crítica para el control de la enfermedad, y las manipulaciones que conducen a una rápida colonización mejoran el control biológico (Mercier & Wilson, 1994). Por lo tanto, los antagonistas microbianos deberían tener la capacidad de crecer más rápido que el patógeno. Las levaduras y algunas bacterias pueden competir exitosamente con el patógeno en el sitio de la herida (*in situ*) para limitar los factores nutricionales e inhibir su crecimiento (Janisiewicz *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2010).

El nitrógeno es un compuesto que se encuentra en menor concentración que los carbohidratos en heridas de pera, por lo cual es probable que este elemento represente un factor limitante en el ambiente rico en carbono de las heridas (Janisiewicz & Korsten, 2002). El hierro es un factor esencial para el crecimiento de casi todos los microorganismos y en particular para el crecimiento de los hongos y la patogénesis, por lo cual se cree que la competencia por este elemento juega un papel importante en el control biológico de los patógenos postcosecha (Saravanakumar *et al.*, 2008). Algunos antagonistas son capaces de producir moléculas denominadas sideróforos que funcionan como agentes quelantes férricos. Se ha demostrado que levaduras como *Metshnicowia pulcherrima* (Saravanakumar *et al.*, 2008) y *Rhodotorula glutinis* (Calvente *et al.*, 1999) producen estas moléculas y que éstas constituyen el principal mecanismo antagónico frente a patógenos como *B. cinerea* y *P. expansum*.

La competencia puede ser un mecanismo de control biológico efectivo cuando el antagonista está presente en cantidades suficientes en el momento y ubicación correcta, y siempre y cuando sea capaz de usar recursos limitados más eficientemente que el patógeno.



Figura 5. Esquema de las posibles interacciones entre los componentes del sistema de biocontrol: patógeno, levadura antagonista, hospedante y ambiente. Adaptado Zhang *et al.* (2020).

### 3. Resistencia al estrés oxidativo en levaduras

Como consecuencia del crecimiento aeróbico, las células están continuamente expuestas a especies reactivas de oxígeno (EROs), potentes oxidantes capaces de causar daño celular extenso a nivel de ADN, proteínas y contenido de lípidos en la membrana (Moradas-Ferreira & Costa, 2000; Rodríguez Pousada *et al.*, 2005). Las EROs incluyen tanto a moléculas radicales de oxígeno (anión superóxido, hidroxilo, etc.) como a especies no radicales, pero altamente oxidantes por ejemplo el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El estrés oxidativo se produce cuando hay un desequilibrio entre la producción de EROs y otras moléculas oxidantes y la capacidad de la célula de eliminarlas o neutralizarlas adecuadamente. La respuesta antioxidante y

detoxicante al estrés oxidativo es un fenómeno por el cual la célula responde a las alteraciones en su estado redox.

Además de lidiar con las EROs que surgen del metabolismo aeróbico, los ACB usualmente deben enfrentar niveles elevados de estas especies al momento de colonizar una herida en la fruta. La primera respuesta del fruto ante la presencia de microorganismos, sean o no fitopatógenos, es una explosión oxidativa (Zhang *et al.*, 2017). Por ello la tolerancia de un antagonista a la presencia de altos niveles de EROs es altamente relevante (Liu *et al.*, 2013), dado que esta situación estresante puede afectar su viabilidad y eficacia (Sui *et al.*, 2015).

Las levaduras poseen distintos mecanismos de respuesta antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos, que actúan de manera coordinada con el fin de evitar o atenuar los daños provocados por el estrés oxidativo. Entre ellos se destaca la acción de enzimas como la catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), la acumulación de trehalosa y el aumento de la concentración del contenido intracelular de glutatión reducido (GSH).

### 3.1. Métodos de detoxificación enzimáticos

Para contrarrestar los efectos de situaciones prooxidantes que pueden derivar en estrés oxidativo las células cuentan con enzimas antioxidantes como: CAT, SOD, glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPx), entre otras.

La CAT es una enzima ubicua que protege a los organismos aeróbicos de los efectos nocivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al catalizar su conversión en O<sub>2</sub> y agua (Bai *et al.*, 2003). Se conocen dos genes para esta enzima en *S. cerevisiae*, CTA1 y CTT1, el primero codifica la catalasa A del peroxisoma, y el segundo la catalasa T citosólica (Ruis & Hamilton, 1992). La catalasa A se encuentra en el peroxisoma y la función fisiológica principal de esta enzima sería eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por β-oxidación de ácidos grasos. El papel fisiológico de la catalasa citosólica T es menos claro; sin embargo, la expresión del gen CTT1 está regulada por el estrés oxidativo, osmótico y por la falta de nutrientes (Izawa *et al.*, 1996; Gasch *et al.*, 2000). Las cepas de levadura deficientes tanto en CTA1p como en CTT1p son hipersensibles al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fase estacionaria y los mutantes de CAT simples y dobles no muestran una respuesta de estrés adaptativo (Ruis & Hamilton, 1992). Junto con las enzimas SOD constituyen la primera línea de defensa frente a las reacciones en cadena del estrés oxidativo.

Las SOD son metalo-proteínas que pueden ser dependientes hierro (Fe-SOD), manganeso (Mn-SOD) y cobre y zinc (CuZn-SOD) en base a los metales en sus sitios activos.

En general, se acepta que las células fúngicas contienen Mn-SOD en las mitocondrias y CuZn-SOD en el citoplasma (Bleoanca & Bahrim, 2013). En las células microbianas, los niveles de expresión de SOD pueden variar considerablemente, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Pashova *et al.*, 1999; Kreiner *et al.*, 2000).

Además de las dos enzimas antes descriptas, participan de la respuesta antioxidante enzimática la GR y la GPx. La GR es la principal responsable de la reducción del glutatión oxidado (GSSG) y del mantenimiento de la relación GSH / GSSG en las células. El GSH es un compuesto antioxidante que desempeña un papel relevante en el mantenimiento del estado redox celular. El gen que codifica la enzima GR en *S. cerevisiae* (GLR1) ha sido identificado y los mutantes nulos, aunque son viables, acumulan un exceso de GSSG y son hipersensibles a los oxidantes (Grant *et al.*, 1998; Collinson *et al.*, 1995). Además de su capacidad de reaccionar directamente con los radicales libres, el GSH puede actuar como una fuente de electrones para la enzima GPx. Esta enzima cataliza la reducción de hidroperóxidos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizando GSH como reductor (Lončar & Fraaije 2015).

Por último, se ha demostrado que los sistemas de detoxificación enzimáticos están relacionados en levaduras, dado que mutantes de *S. cerevisiae* que carecen de CuZnSOD o MnSOD citosólica, o ambos tipos de enzimas SOD presentan disminución de la actividad enzimática de CAT, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y GR, y además un mayor nivel de EROs (Lee *et al.*, 2001).

### *3.1.1 Mecanismos no enzimáticos de respuesta al estrés oxidativo*

Como se mencionó previamente, los microorganismos deben mantener un estado intracelular redox adecuado a fin de hacer frente a situaciones prooxidantes; para ello no solo poseen las enzimas antioxidantes mencionadas, sino que también cuentan con diversos compuestos antioxidantes. Entre los más importantes se encuentran el azúcar trehalosa, el tripéptido GSH, los carotenoides, el ubiquinol, el ácido L-ascórbico y los tocoferoles.

La trehalosa es un disacárido no reductor que se encuentra en una amplia variedad de microorganismos, y está involucrado principalmente en la adquisición de resistencia a una variedad de condiciones de estrés, incluido el calor y el estrés oxidativo (Hua *et al.*, 2015; Dhanasekaran *et al.*, 2021). La naturaleza fisicoquímica de la trehalosa, incluyendo su carácter hidrofílico, estabilidad química y la ausencia de formación interna de enlaces de hidrógeno, la hace adecuada para su función como metabolito de respuesta al estrés (Fillinger *et al.*, 2001).

Otro compuesto protector ante condiciones prooxidantes es el GSH. Esta molécula puede funcionar como un antioxidante de diversas maneras. Posee un grupo sulfhidrilo redox activo que puede reaccionar con oxígeno,  $O_2^-$  y  $OH^-$  para producir glutatión oxidado (GSSG) (Stephen & Jamieson, 1997; Wang *et al.*, 2015) y, por lo tanto, puede funcionar directamente como un eliminador de radicales libres. Los sistemas de reducción dependientes de GSH son responsables de mantener el ambiente interno reducido de microorganismos (Carmel-Harel & Storz, 2000). Además, como sustrato de la GPx, el GSH puede estabilizar la estructura de la membrana al contribuir en la eliminación de hidroperóxidos formados por reacciones que conducen a la peroxidación lipídica.

#### 4. Características de la levadura *Vishniacozyma victoriae*

Las levaduras constituyen un grupo heterogéneo de organismos incluido en el reino Fungi (Kurtzman *et al.*, 2011). Se encuentran frecuentemente en las hojas y las flores, aunque en número muy pequeño, siendo los insectos un importante vector de diseminación de las mismas. Están sobre la epidermis de frutas y pueden penetrar a los tejidos subyacentes como resultado de un daño mecánico. El suelo es un importante reservorio, desde el cual pueden llegar a los alimentos, pero también suelen hallarse en el agua de lagos y ríos.

Todas las especies de levaduras conocidas son capaces de asimilar glucosa y fructosa para utilizarlas aeróbicamente como fuente de carbono y energía, mientras que sólo algunas pueden fermentar estos azúcares en condiciones de anaerobiosis. Muchas levaduras también son capaces de asimilar y degradar moléculas orgánicas que incluyen: lípidos, compuestos aromáticos, ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos complejos (Kurtzman *et al.*, 2011). Las levaduras poseen distintas estrategias de adaptación para enfrentar condiciones adversas sintetizando moléculas (trehalosa, glicerol, glutatión, entre otras) o activando la maquinaria enzimática (CAT, SOD, enzimas killer, entre otras) que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés (Folch-Mallol *et al.*, 2004; Sangorrín *et al.*, 2014; Villalba *et al.*, 2016)

En particular la especie *Vishniacozyma victoriae* es una levadura perteneciente al phylum Basidiomycota, clase Tremellomycetes, orden Tremellales (Liu *et al.*, 2015). Suele encontrarse en ambientes fríos, pero su presencia no se encuentra restringida solo a hábitats con bajas temperaturas (Luo *et al.*, 2019). No es capaz de crecer a temperaturas superiores a 25°C, lo cual le impide ser patógena para las personas. Es capaz de utilizar sacarosa y lactosa como fuente de carbono y energía, así como también glucosa entre otros azúcares (Kurtzman *et al.*, 2011). El primer reporte de esta levadura como ACB fue realizado por Lutz *et al.* (2012) frente

a *B. cinerea* y *P. expansum* en heridas de pera con la cepa *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263. Luego se realizaron otros estudios sobre su utilidad como ACB en frutas de pepita en postcosecha (Lutz *et al.*, 2020; Gramisci *et al.*, 2018). Como posible mecanismo de acción de esta levadura, Lutz *et al.* (2013) reportó que la misma presentó producción de toxinas *killer*, actividad glucanasa, proteasa y quitinasa contra ambos patógenos en condiciones de cámara fría (-1/0°C). Además, esta levadura mostró capacidad de inhibir la germinación de los conidios de *P. expansum*. Por último, las pruebas de patogenicidad realizadas no mostraron crecimiento de *V. victoriae* a 37°C, ni crecimiento en condiciones de simulación gástrica y no se detectó actividad fosfolipasa (Lutz *et al.*, 2013). Por lo cual estos ensayos preliminares muestran que *V. victoriae* NPCC 1263 no tiene características para ser patógena ni oportunista para las personas.

#### 4.1 Cultivo de *Vishniacozyma victoriae* en sustrato económico

A fin de ser utilizado como ACB, se debe cultivar la levadura y obtener una cantidad de biomasa suficiente para ser aplicada en el control de patógenos postcosecha. El empleo de medios de cultivo económicos y la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento para cada microorganismo, son necesarios para la factibilidad comercial y obtención de biomasa de calidad (Patiño-Vera *et al.*, 2005; Yáñez-Mendizábal, 2012). Los medios de cultivo brindan los nutrientes necesarios para la producción de biomasa, ya que proveen a las células los elementos necesarios para los procesos de biosíntesis, mantenimiento celular y reproducción (Stanbury *et al.*, 1995). Deben contener sustancias carbonadas (azúcares asimilables) y nitrogenadas (urea, amonio en sales, etc.), para que las levaduras puedan realizar sus funciones metabólicas y alcanzar altos niveles poblacionales. Cuando se proyecta la producción industrial de un producto, se debe considerar el costo del medio de cultivo. Existe en la actualidad una gran variedad de sustratos económicos como la melaza de caña de azúcar, el suero de queso, los residuos de juguera, etc. (Peña, 2009; Pérez-Torrado *et al.*, 2015; Viera, 2013). Estos productos de desecho de la producción primaria de otros productos representan una alternativa económica para la producción de biomasa de los ACB.

La melaza de caña de azúcar es un desecho de la industria azucarera. Es un residuo denso y viscoso de color oscuro con un alto contenido de azúcares, principalmente sacarosa (Leeson & Summers, 2005). Está constituida además por: glucosa, fructosa, sales, vitaminas, otros compuestos solubles en álcali, que usualmente están en el jugo de caña y otros compuestos formados durante el proceso de manufactura y procesamiento (Castillo, 2007). En la Tabla 5, se detalla una composición aproximada de la melaza de caña de azúcar dado que puede haber

variaciones entre las características de las diferentes partidas. Pese a esto, la melaza de caña es un sustrato económico y con abundancia nutricional que permite utilizarla como medio de cultivo.

Tabla 5. Composición de la melaza de caña

Constituyentes Principales	Componentes	Porcentaje (%p/p)
<b>Agua</b>	Agua	17-25
<b>Azúcares</b>	Sacarosa	30-40
	Glucosa	4-9
	Fructosa	5-9
	Otras sustancias reductoras	1-4
<b>Carbonatos bases</b>	K <sub>2</sub> O	7-5
	CaO	30-50
	MgO	7-15
	Na <sub>2</sub> O	0,3-9
<b>Ácidos</b>	SO <sub>3</sub>	7-27
	Cl	12-20
	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,5-2,5
	SiO <sub>2</sub>	1-7
<b>Compuestos nitrogenados</b>	Proteína bruta - proteína verdadera.	2,5-4,5
	Aminoácidos: ácido aspártico y glutámico	0,5-1,5
		0,3-0,5
<b>Ácidos nitrogenados no</b>	Ácido aconítico, cítrico, málico, oxálico, glicólico	1,5-6
	Mesacónico, succínico, fumárico, tartárico	0,5-1,5
<b>Ceras, esteroides y lípidos</b>		0,1-1
<b>Vitaminas</b>	Vitamina A, Biotina, niacina,	Cantidades variables
	Ácido pantoténico, riboflavina, tiamina	

*Extraído de Meade (1986).*

Un factor para tener en cuenta al utilizar melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y energía para el crecimiento de microorganismos, es que suelen ser deficientes en el contenido de nitrógeno (menos del 3%). Aunque las levaduras son capaces de utilizar algunos de los aminoácidos presentes como fuente de nitrógeno, se recomienda el agregado de una

fuelle extra de nitrógeno (Gómez-Pastor *et al.*, 2011). Por ello, Lutz (2015) utilizó para el cultivo de *V. victoríae* un medio basado en melaza de caña de azúcar adicionado con urea. Los medios y condiciones de cultivo (temperatura, velocidad de agitación, etc.) se pueden optimizar a fin de conseguir un mayor crecimiento. Tradicionalmente, las condiciones de cultivo han sido optimizadas por la estrategia de modificar una variable a la vez (Abadías *et al.*, 2003); sin embargo, el uso de diseños experimentales basados en estadística son aproximaciones más eficientes para la optimización ya que pueden llevarse a cabo con un gran número de variables en simultáneo y se puede estimar la interacción entre esas variables (Díaz *et al.*, 2005). En estudios previos se ha optimizado el medio de melaza de caña de azúcar y las condiciones de cultivo de *V. victoríae* utilizando esta última estrategia (Gramisci, 2019). Posteriormente a la optimización de estas condiciones, resulta necesario evaluar la capacidad de colonizar las heridas de pera, así como la habilidad de controlar a los principales patógenos postcosecha.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar el efecto del acondicionamiento fisiológico de la levadura *Vishiniacozyma victoriae* sobre la capacidad de control de las principales enfermedades de postcosecha de pera.

### Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad de colonización de *Vishiniacozyma victoriae*, proveniente de dos condiciones de cultivo, en heridas de pera en condiciones de conservación postcosecha.
- Comparar la capacidad antagónica de la levadura producida en dos condiciones de cultivo frente a los patógenos postcosecha en pera en condiciones de conservación.
- Cuantificar indicadores bioquímicos de la inducción de los sistemas de defensa frente al estrés en las levaduras con diferentes condiciones de crecimiento.
- Determinar la viabilidad de la levadura luego de un estrés oxidativo.
- Profundizar el manejo de técnicas de laboratorio y uso de equipamiento disponible.
- Elaborar propuestas didácticas para distintos niveles educativos a través de los ensayos realizados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En trabajos previos del laboratorio se seleccionó la levadura *V. victoriae* NPCC 1263 como ACB de superficies de peras y evaluó su capacidad antagonista en ensayos en línea de empaque a nivel semicomercial. Para realizar estos ensayos se desarrolló la biomasa de la levadura a gran escala en reactores empleando como medio de cultivo económico melaza de caña de azúcar adicionada con diferentes micronutrientes. En el grupo de investigación se desarrollaron dos propuestas de condiciones de cultivo que fueron utilizadas y analizadas en el presente trabajo.

### 1. Preparación del material microbiológico y vegetal

#### 1.1 Microorganismos y preparación de inóculo

La levadura *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263 se encuentra conservada en glicerol 20% v/v y almacenada a -20 °C en la Colección de Cultivos de la Patagonia Norte, North Patagonian Culture Collection (NPCC), Neuquén, Argentina.

La levadura se incubó por 48 horas a 26°C placa de Petri con GPY-agar (Figura 6) a partir de 5 µL de la suspensión de levaduras de NPCC. Una ansada del cultivo fresco de la levadura se utilizó para realizar las suspensiones, que se ajustaron luego a la concentración necesaria para cada experimento. Luego de 24 horas se realizó un recuento de células en el microscopio con cámara de Neubauer y se inocularon los Erlenmeyer (Figura 6). Una vez inoculado el medio se procedió a seguir su crecimiento midiendo absorbancia a 640 nm.

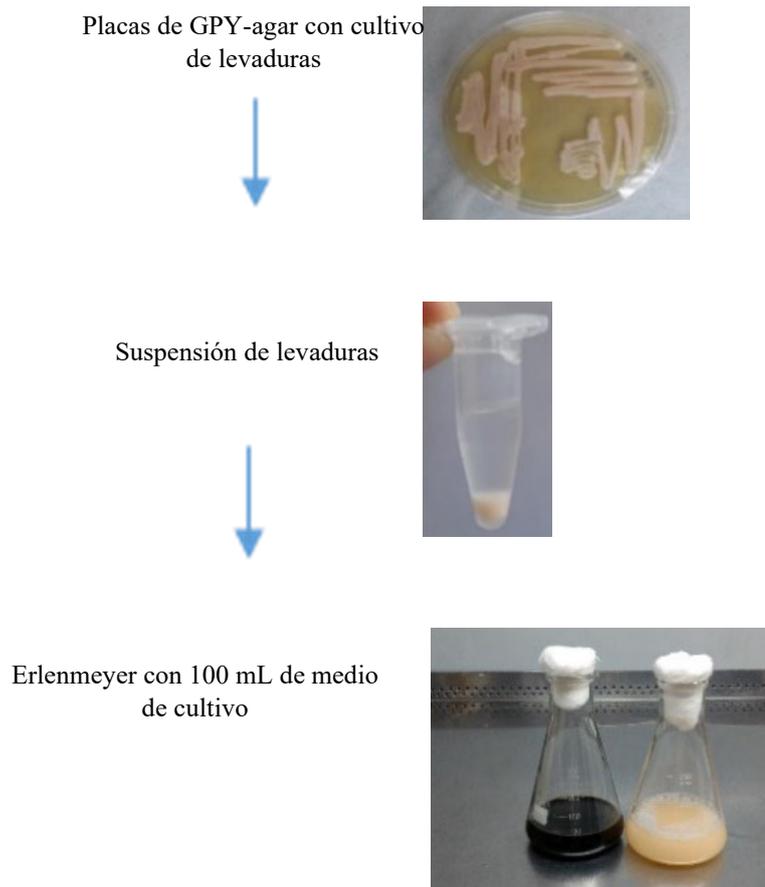


Figura 6. Esquema de producción de biomasa.

Los hongos patógenos: *Penicillium expansum* NPCC 2023 y *Botrytis cinerea* NPCC 2049 fueron aislados de superficie de peras en conservación en cámara fría y seleccionados por su patogenicidad y resistencia a los fungicidas postcosecha. Ambos patógenos se encuentran conservados en la misma colección, NPCC.

Los aislamientos de *B. cinérea* NPCC 2049 y *P. expansum* NPCC 2023 se cultivaron en agar papa dextrosa (APD). Se utilizó la formulación sólida en polvo de Laboratorios Britania, según especificaciones del producto (39 g/L). *B. cinerea* se cultivó en APD con períodos de luz-oscuridad, a 25°C durante 14 días; mientras que *P. expansum* se cultivó durante siete días en oscuridad a la misma temperatura. Las suspensiones conidiales de cada patógeno se obtuvieron por raspado de la superficie de la colonia con ansa estéril, con los cuales se realizó una suspensión en agua destilada estéril (ADE) y filtración a través de malla de tela estéril para eliminar restos de micelio. Las suspensiones se ajustaron de acuerdo con su concentración mínima inhibitoria (CMI), por recuento directo con cámara de Neubauer al microscopio óptico.

## 1.2 Frutas de producción orgánica

Para la evaluación a nivel laboratorio de la efectividad de los agentes de control biológico en heridas se utilizaron peras de producción orgánica, de la variedad Packham's Triumph. Las frutas fueron cosechadas con madurez fisiológica y conservados en cámaras frigoríficas (-1/0°C y 95% de HR) pertenecientes a la empresa de empaque La Deliciosa (Centenario, Neuquén), que también cedió sus instalaciones para los ensayos de conservación en cámara fría en cada temporada (Convenio CONICET 8915-2014 y UNCo 876/00-2014).

## 2. Condiciones y medios de cultivo

Para desarrollar la biomasa de la levadura *V. victoriae* (NPCC 1263) se utilizó como fuente de carbono y energía melaza de caña de azúcar obtenida de la zafra azucarera en Tucumán. La concentración de azúcares totales de la melaza utilizada fue de 70 g/L de azúcares totales (50% de azúcares reductores y 50% no reductores). Los medios de cultivo fueron realizados con agua destilada y esterilizados en autoclave por vapor saturado a 1 atm de sobrepresión (121°C, 2 atm, 20 min).

Se realizaron ensayos en un volumen de 100 mL con medio y condiciones de cultivo que se seleccionaron a partir pruebas realizadas previamente en el laboratorio por el grupo de investigación. Las condiciones se denominaron: no optimizada "NOP" y optimizada "OP" y son las siguientes:

NOP: medio 12,8 % v/v melaza, 0.6 g/l urea; temperatura de trabajo 20°C; velocidad de agitación 150 rpm.

OP: medio 9% v/v melaza, 0.25% p/v  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.25% p/v  $\text{ZnSO}_4$  y 0.25 ppm tiamina, 1 g/L urea; temperatura de trabajo 13°C; velocidad de agitación 120 rpm.

## 3. Ensayos de actividad antagónica *in situ* en pera

Peras sanas de la variedad Packham's Triumph con tres meses de almacenamiento en frigorífico (-1/0°C y 95% HR), fueron desinfectadas superficialmente para luego realizar heridas en la región ecuatorial y ser inoculadas con 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión de levadura ( $10^8$  células/mL) y con 20  $\mu\text{L}$  de agua en el caso de los controles positivos. Luego de dos horas, fueron inoculadas en la misma herida con 10  $\mu\text{L}$  de una suspensión de conidios de los hongos patógenos (*P. expansum* y *B. cinerea*) en su concentración infectiva mínima (CIM) ( $1 \times 10^4$  y  $5 \times 10^3$  respectivamente) (Figura 7). Luego de la inoculación y secado de las heridas, los frutos se colocaron en bandejas, dentro de bolsas de polietileno y éstas en cajas de cartón. Las cajas

fueron guardadas en condiciones de almacenamiento convencional (-1/0°C y 95% HR). Los tratamientos se dispusieron en forma completamente aleatoria. Se utilizaron diez frutos por tratamiento y cada tratamiento se repitió dos veces.

Los frutos se examinaron periódicamente, evaluando la incidencia (%I), y la severidad (como diámetro de lesión, en mm) de la enfermedad. El parámetro de cuantificación del porcentaje de incidencia se estableció de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\%I = \frac{b}{x} \cdot 100$$

Donde:

%I: porcentaje de incidencia

x: número de frutos inoculados

b: número de frutos inoculados y enfermos.

También se calculó el porcentaje de control de los tratamientos a través de la siguiente expresión:

$$\%C = \frac{x - b}{x} \cdot 100$$

Donde:

%C: porcentaje de control

x: número de frutos inoculados

b: número de frutos inoculados y enfermos



Figura 7. Peras heridas e inoculadas con hongos patógenos y levaduras antagonistas.

### 3.1 Ensayo de colonización en herida

La capacidad de las levaduras para colonizar y establecerse en las heridas de pera se evaluó en condiciones de conservación postcosecha. Frutos del cultivar Packham's Triumph con tres meses de almacenamiento en cámara frigorífica fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70% (v/v) y posteriormente se realizaron heridas. Estas fueron inoculadas con 20  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $10^5$  células/mL de la levadura crecida en ambas condiciones de cultivo. La fruta inoculada se colocó en bandejas, en el interior de bolsas plásticas y éstas en cajas de cartón, las mismas fueron almacenadas en cámaras frigoríficas ( $-1/0^\circ\text{C}$  y 95% HR).

La dinámica poblacional de la levadura se evaluó a los 0, 7, 15, 30, 45 y 120 días de incubación. En cada tiempo, las heridas inoculadas fueron extraídas de los frutos utilizando un sacabocado estéril y el bloque de tejido colocado en 1 mL de ADE, macerado y finalmente agitado a 150 rpm por una hora (Vero *et al.*, 2013). De la suspensión obtenida, se realizaron diluciones seriadas y 100  $\mu\text{L}$  de dilución se sembraron en placas de GPY-agar con cloranfenicol. Luego de 4 días de incubación a  $20^\circ\text{C}$  se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

### 3.2 Análisis estadístico

La severidad se determinó como el diámetro de la lesión (mm) y los resultados de estas mediciones se analizaron con un modelo lineal de un solo factor, con efecto tratamiento. Las comparaciones de medias se realizaron utilizando la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). El porcentaje de incidencia (%I), se analizó utilizando un modelo lineal generalizado de distribución binomial (GLM) del sistema de análisis estadístico (INFOSTAT, versión 2018e).

## 4. Ensayos de tolerancia al estrés oxidativo

Para la realización de los ensayos de tolerancia a estrés oxidativo se siguió el esquema presentado en la Figura 8.

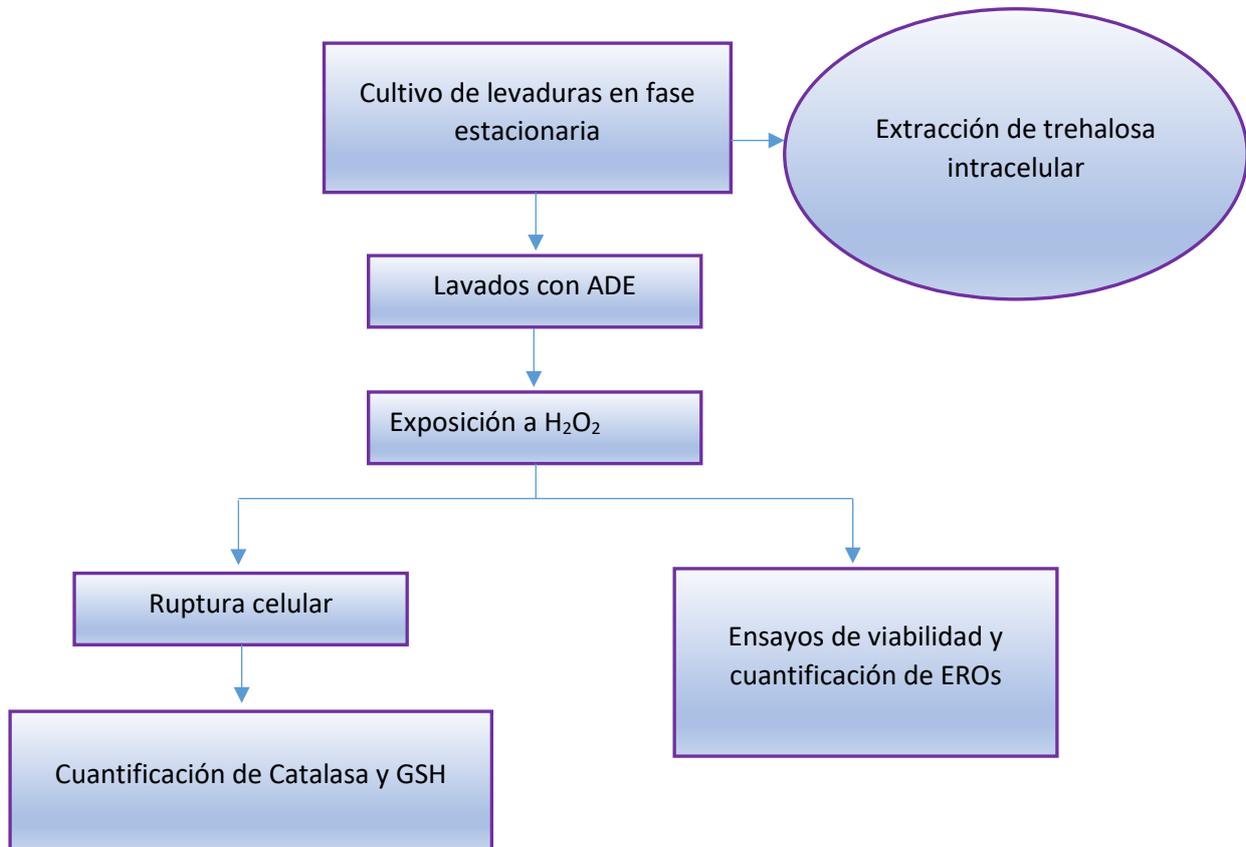


Figura 8. Esquema de procesamiento de muestras para ensayos de estrés.

#### 4.1 Cuantificación de la trehalosa intracelular

Para extraer la trehalosa de las células se parte del pellet obtenido del lavado de cultivo. Se lavó con el triple de volumen de ácido tricloroacético (TCA) 0,5 M y se lo dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente se centrifugó a 6000-8000 rpm durante 5 minutos. Se guardó el sobrenadante. Se repitió nuevamente el proceso de extracción con TCA con las mismas condiciones. Luego se juntaron los sobrenadantes obtenidos de todas las extracciones y se cuantificó el contenido de trehalosa por el método de Antrona con modificaciones (Hodge & Hofreiter, 1962) utilizando un estándar de glucosa 0,5 g/L para la curva de calibración. A 100  $\mu$ L de la muestra a ensayar se agregó 1 mL de reactivo de Antrona ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  66%, tiourea 10 g/L, Antrona 0,5g/L), y se incubó en baño de agua fría durante 5 minutos. Luego se incubó a 100°C durante 15 minutos y se enfrió a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente se midió la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro PG Instrument T60.

## 4.2 Exposición a peróxido de hidrógeno

Se tomaron 2 mL de un cultivo en fase estacionaria, el mismo fue lavado con ADE hasta no presentar restos de medio de cultivo. Las células fueron resuspendidas en 2 mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM para los ensayos de estrés oxidativo a fin de comparar las condiciones OP y NOP. Las muestras utilizadas como control negativo fueron resuspendidas en ADE. Todas las muestras fueron luego incubadas a 20 °C con una agitación de 150 rpm. Se ensayaron dos tiempos de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 y 2 horas, posteriormente las células se lavaron 2 veces con ADE. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada fue determinada a partir de ensayos preliminares realizados por el grupo de investigación.

### 4.2.1 Viabilidad

Se realizaron diluciones seriadas de las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y agua (control), luego del lavado con ADE, y se sembraron en placas de GPY agar. El ensayo se realizó por duplicado. El porcentaje de supervivencia se calculó como las UFC/mL obtenidas en las muestras tratadas sobre UFC/mL de las muestras control por 100.

### 4.2.2 Especies reactivas del oxígeno (EROs)

La evaluación del nivel de EROs intracelulares se realizó mediante microscopía de fluorescencia utilizando el reactivo 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFH-DA) 10 μM (Sigma) (Zhang *et al.*, 2017).

Las muestras de levadura expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y sus respectivos controles, se lavaron con buffer PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,42 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/L). Posteriormente se centrifugó la muestra y el pellet de levadura fue resuspendido en 100 μL de buffer PBS. Se le añadió 10 μL del reactivo fluorescente y se incubó en oscuridad a 37°C durante 1 hora. Una vez terminada la incubación se procedió a lavar dos veces con el mismo buffer utilizado anteriormente y se observaron las levaduras en microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i) utilizando una excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 530 nm. La cuantificación se realizó a través de la toma de 8 fotografías en campo claro de campos con aproximadamente 300 células, contando células totales y cambiando el filtro de fluorescencia, se contaron las células fluorescentes de cada campo respectivamente. El ensayo se realizó por duplicado.

### 4.2.3 Ruptura celular y determinación de parámetros de respuesta antioxidante

A fin de realizar la ruptura celular se aplicó el método descrito por Toalini *et al.* (2010). Las células obtenidas luego del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron centrifugadas y lavadas con agua

destilada, luego se resuspendieron en 800  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (Tris 10 mM, pH 8 con, NaCl 100 mM, EDTA 1mM y Tritón 2%) y se agregaron 0,25 gramos de perlas de vidrio de tamaño 1,5-2 mm (Sigma). Para lograr la ruptura de la pared celular se agitaron los tubos de reacción en vortex por 10 ciclos de 20 segundos con intervalos de descanso de 20 segundos, conservando la muestra refrigerada en hielo. Se centrifugó a 860 g durante 3 minutos para separar las perlas, obteniéndose el extracto crudo (utilizado para la medición de concentración de GSH intracelular). Posteriormente, una porción de ese extracto crudo se centrifugó a 10000 g 30 min y en este sobrenadante se cuantificó la actividad enzimática de CAT.

### Actividad Catalasa

La actividad de la enzima CAT se determinó espectrofotométricamente de manera cinética mediante el método de Beers & Sizer (1952). El método se basa en la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la enzima presente en el extracto.

La mezcla de reacción consistió en 560  $\mu\text{L}$  buffer fosfato de sodio 50 mM que contenía 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  más 60  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de ruptura celular luego de la centrifugación de 10.000 g. Se registró de manera continua la disminución en la absorbancia a 240 nm en espectrofotómetro PG Instrument T60.

La actividad específica fue expresada como  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ consumidos min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$  usándose el coeficiente de absorción molar  $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### Determinación de glutatión reducido (GSH)

El contenido de GSH endógeno fue determinado colorimétricamente por el método de Ellman (1959) como tioles ácido-solubles.

A 360  $\mu\text{L}$  del extracto crudo de levaduras obtenido por ruptura (4.2.3) se le adicionó 120  $\mu\text{L}$  de TCA 20 % p/v y la mezcla fue centrifugada a 9.000 g durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , descartándose el precipitado. La mezcla de reacción consistió en 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de 9000 g y 1 mL de reactivo de Ellman (DTNB 1,5 mM en buffer de sodio 0,25 M pH 8). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos. El contenido de GSH fue determinado midiendo la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro Shimadzu 1603 UV-Vis de doble haz, cuantificado mediante una curva estándar de GSH (Sigma) y expresado como nmoles de GSH/mg de proteína.

## Determinación de Proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas en el sobrenadante de 10.000 g (empleado para determinar actividad CAT) y en extracto crudo (empleado para determinar contenido de GSH) se realizó por el método descrito por Lowry *et al.* (1951). La concentración de proteína se determinó mediante una curva estándar de albúmina sérica bovina (Sigma).

### 4.3 Análisis estadísticos

Para comparar la respuesta de las variables analizadas se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) y test de Tukey de diferencias significativas con  $p < 0,05$  para la comparación de medias. Se verificaron la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas.

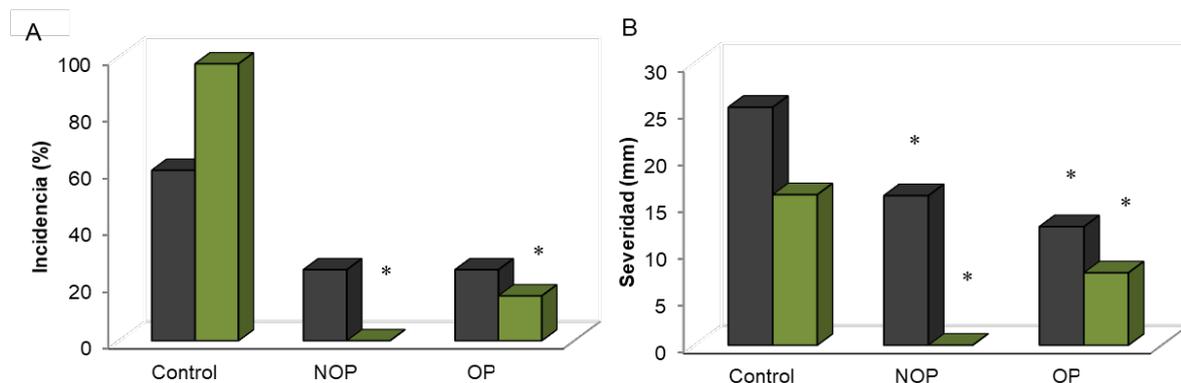
## RESULTADOS

### 1. Ensayos de actividad antagonista *in situ* en pera

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de *V. victoriae* crecida en ambas condiciones NOP y OP, se realizaron ensayos de biocontrol *in situ* con ambos patógenos. Los ensayos fueron realizados en el varietal de pera Packham's Triumph, en un empaque regional con manejo orgánico.

Luego de 60 días de conservación en cámara fría de las peras tratadas se observaron elevados niveles de incidencia en los tratamientos control sin levadura (60% para *B. cinerea* y 100% para *P. expansum*) (Figura 9). Las levaduras crecidas en las dos condiciones de cultivo presentaron la misma capacidad antagonista (75% de control) frente a *B. cinerea* (Figura 9A). En cambio, el porcentaje de control de *P. expansum* fue diferente de acuerdo con la condición de crecimiento empleada: 100% de control cuando la levadura fue crecida en la condición NOP y 84% de control del patógeno con la levadura crecida en la condición OP.

En cuanto a la severidad de las enfermedades se observaron diferencias significativas entre los controles y los tratamientos con las levaduras crecidas en las diferentes condiciones. Con la condición OP se observó una reducción del diámetro de lesión para *B. cinerea* de alrededor del 50% y para *P. expansum* de 48% (Figura 9B). La reducción del diámetro de la lesión observada por el tratamiento con las levaduras crecidas en NOP, fue del 37% para la enfermedad causada por *B. cinerea*, este parámetro no se evaluó para *P. expansum*, dado que no hubo enfermedad en los tratamientos.



**Figura 9.** Eficacia del biocontrol de *V. victoriae* NPCC 1263 crecida en ambos medios (NOP y OP) frente a *B. cinerea* (■) y *P. expansum* (■) durante 60 días de conservación. Incidencia (A) y Severidad (B). Los (\*) en la incidencia muestran diferencias significativas cuando se aplican modelos lineales generalizados. Los (\*) sobre las barras de severidad significan que son estadísticamente diferentes cuando se aplica el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 2. Colonización en heridas de peras

A fin de evaluar la capacidad de *V. victoriae*, crecida en las condiciones NOP y OP, de colonizar las heridas de pera en condiciones de almacenamiento comercial (-1/0°C y 95% de HR) se realizó seguimiento durante 120 días cuantificando la cantidad de UFC por herida. Los datos de UFC/herida obtenidos en los tiempos de muestreo durante el ensayo se utilizaron para modelar el crecimiento de las levaduras en las heridas de pera utilizando el modelo de Gompertz (Figura 10). Los parámetros de las curvas de crecimiento: velocidad específica de crecimiento ( $\mu$  max), fase *lag* y máximo nivel poblacional (A) determinados para cada condición estudiada se presentan en la Tabla 6.

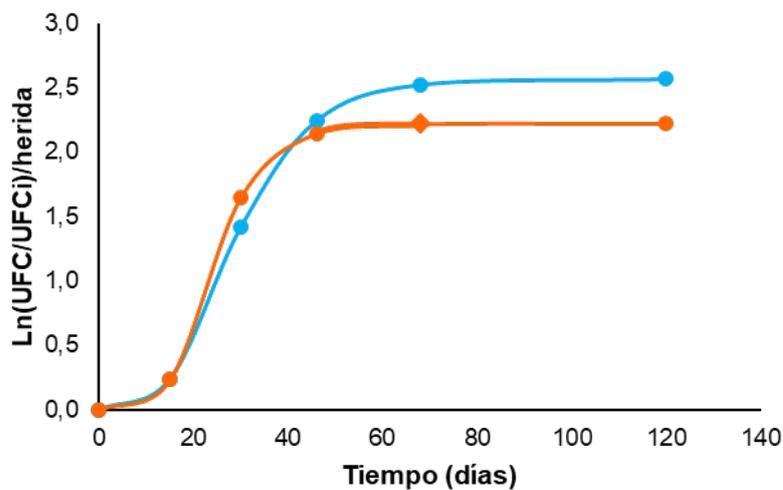


Figura 10. Dinámica poblacional de *V. victoriae* NPCC 1263 en las heridas de pera modeladas a través del modelo de Gompertz. NOP (—●—), OP (—▲—).

Tabla 6. Parámetros de crecimiento de *V. victoriae* NPCC 1263 en heridas de peras, producida en las condiciones de crecimiento estudiadas

Condición	Parámetros		
	A (ln UFC/herida)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<i>lag</i> (días)
<b>NOP</b>	2,57	0,09	13,54
<b>OP</b>	2,22	0,11	13,63

Se observó que las levaduras obtenidas en ambas condiciones muestran un crecimiento en pera similar hasta los 40 días de ensayo (Figura 10), a partir de ese momento y hasta los 120 días la

población de levaduras crecidas en la condición NOP presentó valores mayores de crecimiento en pera que los obtenidos con las levaduras crecidas en la condición OP. Los parámetros cinéticos de la curva de crecimiento obtenidos en el modelado de los puntos muestran un rendimiento A mayor para el medio NOP, una fase *lag* similar y un  $\mu$  menor que en la condición OP (Tabla 6).

### 3. Evaluación de parámetros de respuesta al estrés oxidativo

Datos bibliográficos señalan que la capacidad biocontroladora de un microorganismo está relacionada con su capacidad de respuesta frente a situaciones de estrés oxidativo. Debido a esto, se evaluaron diferentes indicadores de respuesta al estrés oxidativo en las levaduras crecidas en las dos condiciones de cultivo (NOP y OP), para conocer el acondicionamiento fisiológico de las levaduras y ver si existe alguna relación con su capacidad antagonista.

#### 3.1 Cuantificación de trehalosa intracelular

La trehalosa intracelular es un disacárido que cumple un papel de protección celular frente a diversas situaciones de estrés, entre ellas: deshidratación, altas temperaturas, congelación y exposición a compuestos prooxidantes. A fin de conocer si el contenido intracelular de trehalosa varía de acuerdo con la condición de crecimiento de la levadura *V. victoriae*, se evaluó la cantidad de este metabolito en las levaduras crecidas en ambas condiciones, NOP y OP. Los resultados obtenidos indican que el contenido de trehalosa fue significativamente mayor en *V. victoriae* cuando creció en la condición NOP, que cuando creció en la condición OP (1,4-1,6 veces mayor), independientemente del método de cuantificación utilizado (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido de trehalosa intracelular en mg/g de peso seco de *V. victoriae* NPCC 1263 en las dos condiciones de cultivo

Trehalosa intracelular	Método de cuantificación	
	Antrona	HPLC
<b>NOP</b>	1,37± 0,05*	1,44*
<b>OP</b>	0,98±0,04	0,87

Los (\*) significan que los valores son estadísticamente diferentes cuando se aplica el test de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2 Ensayos de exposición a peróxido de hidrógeno

A fin de cuantificar otros marcadores de respuesta al estrés oxidativo en las levaduras crecidas en ambas condiciones, NOP y OP, se realizaron ensayos de exposición al compuesto oxidante  $H_2O_2$ . Uno de los parámetros analizados fue la viabilidad celular de *V. victoriae* crecida en ambas condiciones y posteriormente expuesta durante 1 hora y 2 horas a 30 mM de  $H_2O_2$ , usando como control la incubación con agua. Se observó una caída significativa de la viabilidad de las levaduras luego de ambos tiempos de exposición a  $H_2O_2$  comparada con su correspondiente control (Figura 11). Sin embargo, cuando *V. victoriae* se había cultivado en la condición NOP la caída en la viabilidad por exposición a peróxido fue menor (60% y 66%) que cuando la misma levadura se había desarrollado en la condición OP (67% y 75% para 1 hora y 2 horas, respectivamente).

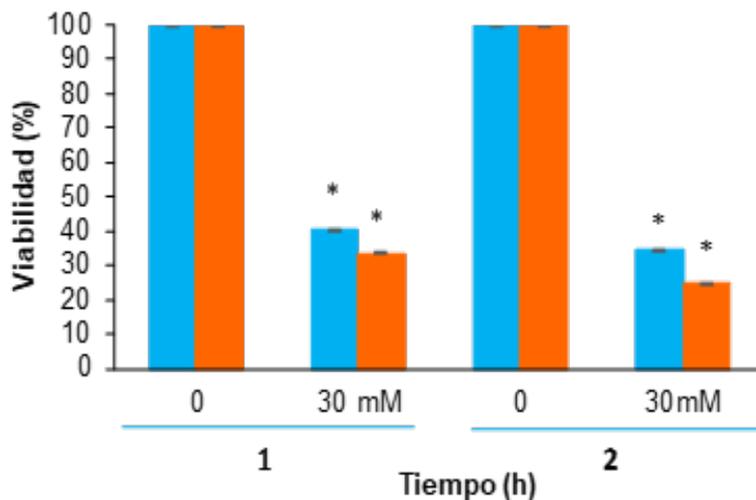


Figura 11. Capacidad de supervivencia al estrés inducido por exposición a  $H_2O_2$  de *V. victoriae* NPCC 1263 crecida en las dos condiciones de cultivo: NOP (■) y OP (■). Los valores representan la media  $\pm$  ES. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a su control sin exposición a  $H_2O_2$ , \*  $p < 0,05$ .

Por otra parte, se estudió la respuesta de la enzima antioxidante CAT de *V. victoriae* a la exposición de  $H_2O_2$  en las células provenientes de las dos condiciones de crecimiento.

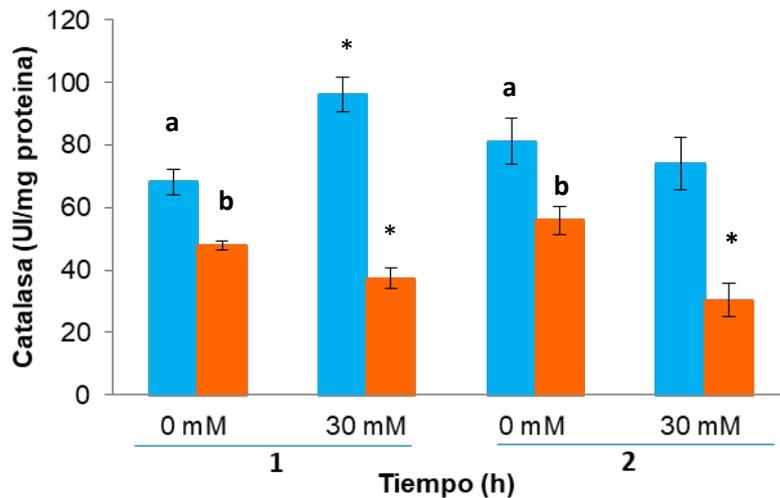


Figura 12. Actividad específica de catalasa de *V. victoriae* NPCC 1263 crecida en las dos condiciones de cultivo: NOP (■) y OP (■). Los valores representan la media  $\pm$  ES. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a su control sin exposición a  $H_2O_2$ , \*  $p < 0,05$ . Letras diferentes indican que la actividad control es diferente entre condiciones.

La actividad enzimática de CAT determinada en los controles, sin exposición a peróxido, mostró que la levadura *V. victoriae* crecida en la condición NOP presentó una mayor actividad específica que en la condición OP (Figura 12). Por otra parte, la actividad CAT de la levadura que creció en la condición OP resultó disminuida significativamente con respecto a su correspondiente valor control, luego de 1 hora y 2 horas de exposición a  $H_2O_2$  30 mM (22% y 45%, respectivamente) (Figura 12). Por el contrario, las células de levadura crecidas en la condición NOP presentaron un aumento significativo de la actividad enzimática (41%) con respecto al control luego de una hora de tratamiento; mientras que ese aumento no se mantuvo luego de 2 horas de exposición a  $H_2O_2$ , retornando la actividad a su valor control.

El contenido de EROs intracelulares, cuantificadas por microscopía de fluorescencia en levaduras crecidas en ambas condiciones luego del ensayo de exposición a  $H_2O_2$ , se presenta en la Figura 13. Se observó que el nivel de EROs control (agua 1 hora y 2 horas) fue mayor en *V. victoriae* crecida en la condición NOP con respecto a la condición OP; sin embargo, las diferencias entre ambas condiciones no fueron estadísticamente significativas.

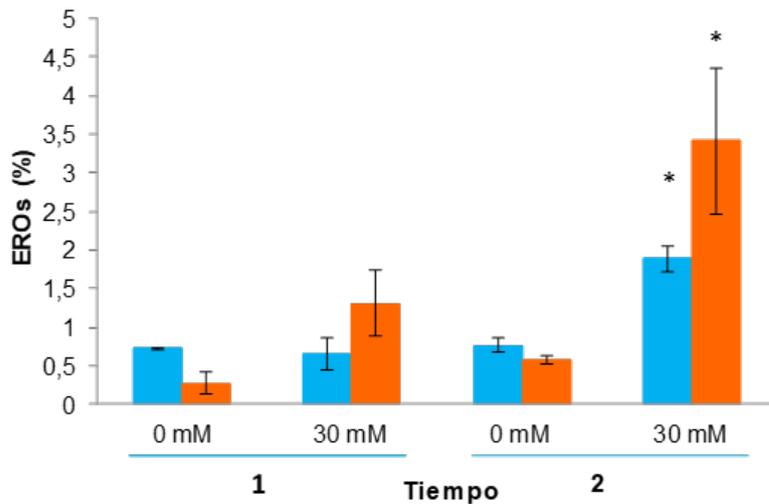


Figura 13. Porcentaje de EROs de *V. victoriae* NPCC 1263 crecidas en las dos condiciones de cultivo: NOP (■) y OP (■). Los valores representan la media  $\pm$  ES, cuantificados con el fluoróforo DCFH-DA. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a su control sin exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, \*  $p < 0,05$ .

Por otra parte, la exposición con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 2 h, causó un aumento significativo en el contenido de EROs en *V. victoriae* crecidas en ambas condiciones. Las levaduras expuestas al peróxido que habían crecido en la condición NOP presentaron un aumento en el nivel de EROs de 1,5 veces con respecto a su correspondiente control; mientras que las levaduras crecidas en la condición OP presentaron un aumento de 5 veces con respecto a su correspondiente control. Si bien el valor de incremento del contenido de EROs luego de 2 horas de exposición a peróxido fue mayor en las levaduras provenientes de la condición de cultivo OP, las diferencias con los niveles determinados en las células de la condición NOP no resultaron estadísticamente significativas, probablemente debido a que se observó mucha dispersión en los datos de la condición OP.

Asimismo, se determinó el contenido intracelular del antioxidante GSH en las células de *V. victoriae* crecidas en las condiciones NOP y OP. En la Figura 14 se presentan los valores de concentración de GSH intracelular para las levaduras crecidas en ambas condiciones, sin exponer y expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los valores de concentración de GSH intracelular resultaron significativamente mayores en las levaduras crecidas en NOP comparada con las crecidas en OP luego de 1 o 2 horas de ensayo, tanto en controles como en las expuestas a peróxido (Figura 14). La diferencia en concentración intracelular de GSH entre ambas condiciones de cultivo es muy marcada siendo 10 y 12 veces mayor en NOP con respecto a OP luego de 1 hora y 2 horas

en agua (controles). Por otra parte, la exposición durante 2 horas a  $H_2O_2$  30 mM causó un aumento significativo del 57% en la concentración de GSH con respecto a su control en las levaduras que crecieron en la condición OP. Sin embargo, a pesar del incremento el contenido de GSH quedó muy por debajo del valor determinado en las levaduras provenientes de NOP expuestas a peróxido.

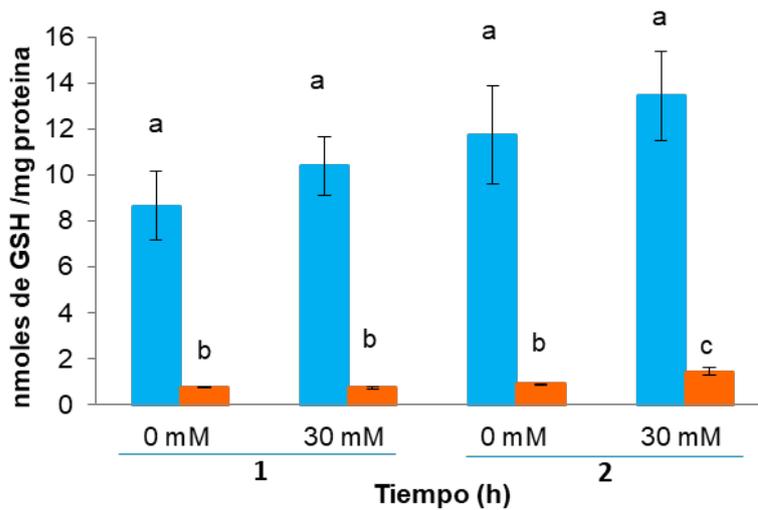


Figura 14. Concentración de GSH intracelular en las levaduras crecidas en las dos condiciones de cultivo: NOP (■) y OP (■). Los valores representan la media  $\pm$  ES. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre las condiciones (0mM y 30 mM de  $H_2O_2$ ) a 1 y 2 horas.

## DISCUSIÓN

### 1. Biocontrol: antagonismo en ensayos *in situ* en pera

El control biológico en postcosecha es una alternativa prometedora para lograr la reducción del uso de fungicidas de síntesis química para controlar patógenos de postcosecha. El desarrollo de resistencia de los patógenos a los fungicidas de síntesis, además de las consideraciones ambientales y de salud, son algunas de las razones que impulsan el desarrollo de tecnologías de manejo de las enfermedades que sean alternativas seguras y efectivas (Droby *et al.*, 2016; Di Canito *et al.*, 2021; Öztekin *et al.*, 2023);).

El control biológico de las enfermedades de frutas en postcosecha constituye un desafío único y de crecimiento constante. El ambiente controlado en temperatura y humedad de las cámaras de conservación de frutas puede ayudar a alterar el equilibrio en las interacciones entre el hospedante, el patógeno y el antagonista a favor de este último. Los ACB presentan claras ventajas, ya que son más seguros que los fungicidas de síntesis para su uso en alimentos son capaces de persistir sobre la superficie de la fruta por largos periodos de tiempo y producen un efecto insignificante en el equilibrio ecológico, ya que no destruyen a los enemigos naturales, y son compatibles con otras medidas de manejo (Passaro *et al.*, 2012, Agirman *et al.*, 2023).

Con el objetivo de evaluar la capacidad antagonista de *V. victoriae* NPCC 1263 en peras cultivadas en la región del AVRNYN en este trabajo se realizaron ensayos *in situ* en los que se evaluó el potencial antagónico en el varietal de peras Packham's Triumph. La melaza de caña de azúcar fue el sustrato base elegido para la producción de biomasa de *V. victoriae* ya que es ampliamente empleado en la producción de biomasa de levaduras (Schnierda *et al.*, 2014; Gamero-Sandemetro *et al.*, 2015) y además porque constituye una fuente de carbono, con aporte nutricional elevado y de bajo costo. La capacidad de crecimiento de esta levadura en un medio de cultivo tan difundido a nivel industrial como la melaza de caña de azúcar puede permitir la producción de este ACB en plantas que realicen la producción de otras levaduras en este medio sin requerir un gasto extra en la inversión de un nuevo sustrato. La optimización de este medio de cultivo realizada en estudios anteriores por Gramisci (2019) consistió en el agregado de nitrógeno, fosfato y vitaminas, sobre la base de reportes anteriores acerca de la deficiencia de la melaza de caña de azúcar en estos compuestos (Acevedo *et al.*, 2002; Pérez-Torrado *et al.*, 2015).

La característica más importante de un ACB es su capacidad biocontroladora, esta se ve influida por varios factores entre ellos: el acondicionamiento fisiológico del antagonista durante su desarrollo, la formulación de este, la fruta sobre la cual se hace la aplicación, maduración de la fruta tratada, severidad de la herida y condiciones ambientales (Droby *et al.*, 2016; Dukare *et al.*, 2018). Por esta razón, se realizaron ensayos para comparar la capacidad antagónica en peras con el medio y condiciones seleccionadas luego de optimizarlo (OP) (Gramisci, 2019) y el medio a base de melaza y urea sin optimizar utilizado en trabajos anteriores del grupo de investigación (NOP) (Lutz *et al.*, 2020) frente a los dos hongos patógenos de postcosecha más difundidos en la región, *B. cinerea* y *P. expansum*. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que hay diferencias en la capacidad de biocontrol de las levaduras crecidas en ambas condiciones de cultivo frente a los diferentes patógenos, siendo más efectivo el control ejercido contra *P. expansum*. Por otra parte, frente a este último patógeno resultaron más efectivas las levaduras crecidas en NOP, con un 100% de control, contra un 74% de control con levaduras crecidas en OP. Zhang *et al.* (2008), evaluaron la respuesta de la levadura antagonista *R. glutinis* en pera contra los dos patógenos estudiados en este trabajo, sus resultados mostraron un control del patógeno *B. cinerea* cercano al 60% y del 80% para la enfermedad provocada por *P. expansum*. Yan *et al.* (2018) reportaron porcentajes de control del 40% para *P. expansum* con el antagonista *Meyerozyma guilliermondii* y Zhang *et al.* (2019) reportaron un porcentaje de control del 80% para *P. expansum* con *Wickerhamomyces anomalus*. Valores similares fueron reportados por Li *et al.* (2011) para *Rhodotorula mucilaginosa* en heridas en peras, donde se observó 83% de control de *P. expansum*. Los porcentajes de control logrados en este trabajo para *B. cinerea* y *P. expansum* son similares o mayores a los obtenidos en la bibliografía. Cabe mencionar además que la mayoría de los trabajos publicados fueron realizados a 20°C, condiciones que no son representativas para la conservación de peras en postcosecha que se realiza a -1°C; por el contrario, en este trabajo se respetaron estas últimas condiciones de temperatura. Es importante destacar que los porcentajes de control conseguidos en los ensayos en heridas de peras realizados con *V. victoriae* (76-100%) desarrollada en el medio NOP superan a los obtenidos por otros autores.

Por otra parte, estudios recientes realizados en otros países y con otras frutas demuestran que *V. victoriae* es un prometedor ACB. Nian *et al.* (2023) informaron que esta levadura es capaz de reducir la enfermedad causada por *B. cinerea* en kiwi mediante la formación de

biofilm. Asimismo, Sepulveda *et al.* (2022) aislaron dos cepas de *V. victoriae* que presentan actividad antagonista frente al hongo *Phlyctema vagabunda* en manzanas orgánicas de Chile.

Un requerimiento importante para que un microorganismo sea un buen ACB es que sea capaz de colonizar las heridas que se pretende proteger. Los mejores antagonistas son capaces de colonizar el sitio de herida rápidamente, debido a que son metabólicamente activos a las bajas temperaturas en que se realiza el almacenamiento de los frutos (Janisiewicz & Korsten, 2002; Li *et al.*, 2016; Vero *et al.*, 2013). La cepa de levadura seleccionada *V. victoriae* NPCC 1263 tiene la característica particular de haber sido aislada de la superficie de pera en conservación, por lo cual su metabolismo está adaptado a las bajas temperaturas presentes en las cámaras de conservación frigoríficas (Lutz *et al.*, 2013). Sin embargo, es necesario evaluar la capacidad de colonización de este antagonista de acuerdo con la condición de cultivo empleada para la producción de biomasa, que influiría en el acondicionamiento fisiológico de la levadura que sería empleada como ACB. Los resultados de los ensayos *in situ* muestran que las levaduras desarrolladas en ambas condiciones de cultivo presentan una población similar hasta los 40 días de realizado el ensayo. Posteriormente, *V. victoriae* crecida en la condición NOP logra una población al final del ensayo 2,5 veces superior a la lograda por la misma levadura crecida en el medio OP. Esto indicaría una ventaja en la colonización a tiempos prolongados cuando la levadura es cultivada en la condición NOP, lo cual es deseable para ejercer el biocontrol en las condiciones comerciales de mantenimiento de la pera en postcosecha.

## **2. Acondicionamiento fisiológico y respuesta al estrés oxidativo**

Los agentes de control biológico se encuentran sometidos a una gran variedad de factores estresantes tanto durante la producción de biomasa, como en la formulación y en la aplicación en fruta (Macarisin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). La presencia continua de condiciones adversas, aunque subletales, puede desencadenar la adquisición de tolerancia a otros tipos de estrés debido a la síntesis y acumulación de moléculas protectoras y/o la activación de proteínas capaces de actuar frente a estos diferentes tipos de estrés, esta capacidad se denomina protección cruzada (D'amore *et al.*, 1991; Galvagno & Cerrutti, 2004; Dunlap *et al.*, 2007; Garre García, 2008).

En este trabajo se estudió el acondicionamiento fisiológico de *V. victoriae* NPCC 1263 al finalizar los cultivos y su capacidad de responder al estrés oxidativo, mediante ensayos de

cuantificación de trehalosa intracelular y de respuesta al estrés oxidativo inducido por exposición a  $H_2O_2$ .

Se encuentra ampliamente reportado que la concentración de trehalosa intracelular juega un papel importante en la habilidad de muchos organismos para soportar condiciones ambientales adversas (D'amore *et al.*, 1991; Eleutherio *et al.*, 2015). La alta concentración de este disacárido fue descripta como una respuesta a estrés, el aumento de trehalosa intracelular se observa a partir del comienzo de la fase estacionaria como respuesta a la limitación de alguno de los nutrientes esenciales (Thammahong *et al.*, 2017). En este trabajo se midieron las concentraciones de trehalosa intracelular en las levaduras provenientes de las diferentes condiciones de cultivo ensayadas. Las concentraciones de trehalosa cuantificadas en *V. victoriae* obtenidas en la condición de cultivo NOP fueron mayores que en las levaduras crecidas en la condición OP. Estos resultados podrían indicar que la condición de crecimiento NOP para *V. victoriae* somete a la levadura a una situación de estrés oxidativo leve a moderado, que ocasiona una adaptación de la misma mediante el incremento de la concentración de trehalosa, ya que este metabolito es capaz de prevenir o mitigar el daño oxidativo (Liu *et al.*, 2011). Este tipo de respuesta podría favorecer la colonización en heridas de frutas, debido al efecto protector frente al estrés oxidativo, que podría beneficiar al antagonista en la competencia por nutrientes y espacio contra los hongos fitopatógenos.

En este sentido, otros estudios muestran que el alto contenido intracelular de trehalosa mejora la capacidad antagonista de diversas levaduras: *Papiliotrema laurentii* mejoró los porcentajes de control de *P. expansum* en manzana (Li & Tian, 2006), *Candida oleophila* mejoró contra *P. expansum* y *Alternaria alternata* en pera (Nie *et al.* 2019) y por último la levadura *Meyerozyma caribbica* con altos contenidos de trehalosa fue mejor antagonista frente a *P. expansum* y *B. cinerea* en manzana (Zhao *et al.* 2013). Por otra parte, el cultivo de la levadura *Sporidiobolus pararoseus* en medio suplementado con trehalosa, incrementó su tolerancia al estrés oxidativo inducido por exposición a  $H_2O_2$  por lo tanto mejoró su eficiencia de control biológico (Dhanasekaran *et al.*, 2021).

Como se mencionó previamente, para que el control biológico sea exitoso los antagonistas necesitan poseer mecanismos efectivos a fin de hacer frente a diferentes factores estresantes tanto abióticos como bióticos a los que están expuestos (Sui *et al.*, 2015). Usualmente las levaduras antagonistas se encuentran sometidas a estrés oxidativo, ya que tanto los fitopatógenos como el tejido del huésped (fruta) podrían actuar como inductores que

desencadenan la señalización a través de EROs, explosión oxidativa asociada principalmente al aumento de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}^{2-}$  (Zhang *et al.*, 2017). Varios estudios describen ensayos de respuesta al estrés oxidativo realizados mediante la exposición de los ACB a diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dado que la resistencia a este tipo de estrés es indicador de la respuesta al ambiente hostil presente en el momento de la colonización de la herida (Castoria *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011, 2012). En este trabajo se evaluó la respuesta a una situación prooxidante inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante el análisis de la viabilidad de *V. victoriae* producida en ambas condiciones, NOP y OP, así como también de la actividad enzimática CAT, la producción de EROs y la concentración de GSH intracelular.

En el ensayo de viabilidad se observó que la supervivencia de *V. victoriae* fue mayor cuando la levadura se produjo con la condición NOP (superiores al 30% de viabilidad), en cambio en la condición OP las levaduras se vieron más afectadas, mostrando una supervivencia luego de la exposición al  $\text{H}_2\text{O}_2$  de hidrógeno de alrededor del 20% a las 2 horas de tratamiento. La supervivencia bajo condiciones de inducción de estrés oxidativo puede ser diferente en cada organismo. Chi *et al.* (2015) reportaron valores ligeramente superiores al 40% en la viabilidad cuando expusieron a *Pichia kudriavzevii* a 5 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 minutos, mientras que cuando se sometió a la misma levadura a 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante el mismo periodo de tiempo, se obtuvo menos del 20% de viabilidad. Chen *et al.*, (2015) reportaron porcentajes de viabilidad menores al 40% cuando sometió a *R. glutinis* a 30 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2 horas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un aceptable nivel de tolerancia a la situación prooxidante inducida por exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por parte de *V. victoriae* cuando la levadura es producida bajo la condición NOP.

Uno de los factores que afecta la vitalidad y viabilidad de las levaduras es la concentración intracelular de EROs (Gamero-Sandemetrio *et al.*, 2014) y el aumento de la concentración de estas especies es considerada un marcador de presencia de una situación de estrés oxidativo (Bai *et al.*, 2003; Morano *et al.*, 2012). En este trabajo al cuantificar el nivel de EROs basal (sin exposición a  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) de *V. victoriae* en ambas condiciones de cultivo fue posible observar un mayor contenido de EROs en las levaduras crecidas en la condición NOP respecto de las provenientes de la condición OP. Esto es similar a lo observado con el contenido de trehalosa, ambas determinaciones indicarían que la condición de cultivo NOP resulta más estresante. Al exponer a las levaduras a una situación de estrés oxidativo inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la respuesta de las levaduras varió según las condiciones de cultivo. En las levaduras crecidas en

la condición NOP sólo se observó aumento significativo en el nivel de EROs luego de 2 horas de tratamiento. En cambio, las levaduras que crecieron en la condición OP al someterlas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentaron niveles de EROs más elevados. Estos resultados indicarían que la condición de crecimiento OP resulta menos estresante para las células por lo cual las levaduras tienen una menor pre-adaptación a condiciones estresantes, dando como resultado un aumento en los niveles intracelulares de EROs al ser expuestas a un compuesto prooxidante.

En este sentido, Castoria *et al.* (2003) reportaron que la capacidad biocontroladora de *P. laurentii* y *R. glutinis* estaba relacionada con la tolerancia a altos niveles de EROs. Por otro lado, Liu *et al.* (2012) comprobaron que la exposición a niveles de estrés prooxidantes subletales mejoraban la capacidad de *C. oleophila* para tolerar un estrés oxidativo mayor posterior. Esta capacidad le proporcionó a la levadura tolerancia cruzada a los tratamientos térmicos y mejoró la capacidad antagonista contra *B. cinerea* y *P. expansum*.

Para neutralizar los efectos deletéreos de las EROs las células poseen complejos sistemas antioxidantes, entre los que se encuentran la acción de la enzima CAT y el GSH intracelular (Moradas-Ferreira & Costa, 2000; Lushchak, 2006; Chi *et al.*, 2015; Gamero-Sandemetrio *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017). Los resultados de actividad CAT observados para *V. victoriae* en ambas condiciones de cultivo muestran que la actividad de CAT en las células sin exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es mayor cuando la levadura se cultivó en la condición NOP que en la condición OP. Este fenómeno puede deberse a que la condición NOP posee mayor concentración de melaza, con el consecuente aumento de la concentración de azúcar y menor oxígeno disuelto debido a la concentración del medio, lo que podría provocar un aumento del estrés osmótico. Asimismo, este resultado está en concordancia con lo observado previamente para contenido de trehalosa y nivel de EROs. Por otra parte, *V. victoriae* crecida en NOP expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1 hora presentó un aumento en la actividad de CAT, que no pudo sostener luego de 2 hora de exposición al peróxido. En contraste, las levaduras crecidas en OP, sufren una disminución en la actividad de CAT en respuesta al estrés inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de mostrar una menor actividad enzimática en las células no tratadas.

La actividad CAT puede aumentar o disminuir cuando los organismos son expuestos a un ambiente prooxidante, el aumento de la actividad constituye una respuesta protectora frente a esta situación; sin embargo, cuando aumenta la presencia de ciertas EROs, puede ocurrir que se inactive el sitio activo de la enzima por la alta concentración de un sustrato oxidante y por lo tanto disminuya su actividad con la consecuente disminución de su capacidad protectora

(Kono & Fridovich, 1982; Bayliak *et al.*, 2006, 2014; Semchyshyn & Lozinska, 2012). Diversos autores han evaluado la respuesta de los ACB con distintos tratamientos como formas de acondicionamiento ante situaciones estresantes: exposiciones a niveles subletales de peróxido, agregado de sustancias protectoras, tratamientos térmicos, etc. Liu *et al.* (2011) comprobaron que la incubación de *C. informominiatum* con glicina betaina (osmoprotector que aumenta las defensas de la célula contra el estrés oxidativo) incrementó la actividad CAT de este ACB luego de la exposición de este a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observando a un aumento asociado en la capacidad de colonización y el nivel de biocontrol. Li *et al.* (2014) informaron el uso de ácido ascórbico, aditivo alimentario y sustancia endógena que desempeña un papel crucial en la protección contra el estrés oxidativo en distintos organismos, para aumentar la resistencia de *P. caribbica* al estrés oxidativo causado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta levadura al ser incubada con el compuesto antioxidante, ácido ascórbico, mostró un aumento del sistema enzimático de protección contra el estrés oxidativo (CAT, SOD, GPx) durante los primeros 40 minutos de tratamiento y posteriormente se observa una disminución de la actividad enzimática probablemente producto de la inactivación del sitio activo de las enzimas; no obstante, las células tratadas con ácido ascórbico aumentaron el nivel del biocontrol contra *B. cinerea*, comparado con las células no tratadas con este compuesto.

Por otro lado, el GSH es otro componente importante de los sistemas antioxidantes microbianos (tanto bacterias como levaduras), ya que puede aumentar su contenido y proteger a las levaduras contra los daños oxidativos inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Guan *et al.*, 2017). El glutatión está involucrado tanto en defensas no enzimáticas como enzimáticas contra diferentes EROs y peróxidos orgánicos (Cnubben *et al.*, 2001). Los niveles de GSH hallados en los experimentos realizados muestran una gran diferencia en la concentración de GSH cuando *V. victoriae* se cultivó en las diferentes condiciones. Las células obtenidas con la condición NOP presentaron 10 veces más concentración de GSH que cuando la misma creció en OP, en condición basal (sin aplicar el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cuando las células se expusieron a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se puede observar un aumento protector en la concentración de GSH en las células producidas en la condición NOP, en cambio las células obtenidas con la condición OP no presentaron ninguna respuesta a la condición estresante, manteniendo su concentración constante.

Una concentración mayor de GSH en las células de *V. victoriae* crecidas en NOP sin tratamiento oxidante es indicativo de que la condición NOP genera una situación de estrés moderado a las células de *V. victoriae*, como se discutió previamente, que conduce luego a una mejor respuesta

frente a una situación de estrés oxidativo como la inducida por la exposición a  $H_2O_2$ . Anshau *et al.* (2013) cuantificaron el GSH de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* realizando cultivos con melaza como fuente de carbono. En estos ensayos los autores observaron que, a mayor concentración de melaza en el medio cultivo, mayor es la cantidad de GSH intracelular, estos resultados son similares a los encontrados en este Seminario Integrador para *V. victoriae*. Como se ha explicado anteriormente el GSH es una molécula de protección contra el estrés oxidativo que actúa tanto en la maquinaria enzimática como en la no enzimática. La concentración de este compuesto se encuentra entre 1 mM y 10 mM en células de levaduras (Zhang *et al.*, 2012; Toledano *et al.* 2013). Hatem *et al.* (2014) mostraron la importancia de que las células tengan una concentración de GSH más elevada para lograr enfrentar y sobrevivir a situaciones de estrés oxidativo durante el tratamiento con condiciones oxidantes.

A modo de resumen, los resultados de los ensayos de estrés oxidativo *in vitro* muestran que las levaduras *V. victoriae* crecidas en la condición NOP se encuentran mejor preparadas que las crecidas en la condición OP para enfrentar las condiciones estresantes presentes en las frutas, ya que si bien poseen mayores niveles de EROs presentan también mayor actividad de CAT, contenido intracelular de GSH y de trehalosa en las condiciones basales de cultivo lo cual les permitirían sobrevivir mejor cuando son sometidas luego a condiciones prooxidantes. Es importante señalar además que presentan mayor viabilidad post-exposición a  $H_2O_2$ .

Los resultados obtenidos en los ensayos de estrés oxidativo indican que las células de *V. victoriae* producidas en la condición NOP se encontrarían mejor preparadas para hacer frente al estallido oxidativo que se produce en la fruta al momento de la colonización de una herida. Esta podría ser la causa de la mayor capacidad de colonización de heridas y de biocontrol observada en los tratamientos realizados con las levaduras desarrolladas en esta condición. Los resultados obtenidos remarcan la necesidad de evaluar no sólo las condiciones de producción de los ACB sino también su acondicionamiento fisiológico y la capacidad de respuesta antioxidante de los ACB que influirían en su capacidad de colonización y de biocontrol de patógenos postcosecha.

## CONCLUSIONES

- *Vishniacozyma victoriae* NPCC 1263 logró controlar las enfermedades causadas por *B. cinerea* y *P. expansum* en ensayos *in situ* en pera.
- Se utilizó melaza de caña de azúcar para la producción económica de biomasa de *V. Victoriae* NPCC 1263; sin embargo, la levadura crecida en la condición optimizada presentó un detrimento en su capacidad antagónica para el control de los patógenos estudiados.
- *V. victoriae* NPCC 1263 muestra mayor capacidad de colonizar heridas de pera bajo condiciones de mantenimiento en postcosecha cuando crece en la condición no optimizada.
- *V. victoriae* NPCC 1263 crecida en la condición no optimizada presenta mayor: viabilidad, actividad CAT, nivel de EROs basales, concentración de trehalosa y GSH intracelular, por lo tanto, estaría más adaptada para soportar las condiciones prooxidantes presentes en heridas de pera. Asimismo, presenta mayor tolerancia frente a la exposición aguda a  $H_2O_2$ . Todo esto contribuiría a aumentar su acción antagónica frente a los patógenos postcosecha.
- La levadura *V. victoriae* NPCC 1263 puede aplicarse como herramienta biológica para el control de las enfermedades en la producción de fruta orgánica contra los mayores patógenos de postcosecha presentes en la región, en reemplazo al control con agroquímicos. Resulta relevante el estudio previo de las condiciones que favorecen ese control biológico, entre ellas la respuesta al estrés oxidativo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abadías, M., Teixido, N., Usall, J., & Viñas I. (2003). Optimization of growth conditions of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in a lab-scale fermenter. *Journal of Applied Microbiology*, 95(2), 301–309.
- Acevedo, B., Gentina J.C., & Illanes, A. (2002). *Fundamentos de ingeniería bioquímica* (pp. 155-157). Ediciones universitarias de Valparaíso, Universidad católica de Valparaíso.
- Agirman, B., Carsanba, E., Settanni, L., & Erten, H. (2023). Exploring yeast-based microbial interactions: the next frontier in postharvest biocontrol. *Yeast*, 40(10), 457-475.
- Anschau, A., Santos, L.O.D., & Alegre, R.M. (2013). A cost effective fermentative production of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae* with cane molasses and glycerol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 849-857.
- Bai, Z., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of Fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23 (4), 267-302.
- Baker, K.J., & Cook, R.J. (1974). *Biological Control of Plant Pathogens*. W.H. Freeman and Company.
- Barkai-Goland, R. (2001). *Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control*. Elsevier.
- Barrios López, J. C. (2022). Estado de situación enero 2023 (p. 9). Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Velázquez-del Valle, M.G., Barka, E.A, Bósquez-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.
- Bayliak, M., Semchyshyn, H., & Lushchak, V. (2006). Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzyme activities in *Saccharomyces cerevisiae* is strain specific. *Biochemistry (Moscow)*, 71, 1013-1020.
- Bayliak, M., Burdyliuk, N., Izers'ka, L.I., & Luschak, V.I. (2014). Concentration-depent effects of *Rhodiola rosea* on long.term survival and stress of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: the involvement of YAP 1 and MSN2/4 regulatory proteins. *Dose Response*, 12(1), 93-109.
- Beers, R.F., & Sizer, I.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133-140.
- Bleoanca, I., & Bahrin, G. (2013). Overview on brewing yeast stress factors. *Romanian Biotechnological Letters*, 18 (5), 8559- 8572.
- Boddy, L. (2016). Pathogens of Autotroph, (pp. 245–292). *The Fungi*.
- Boller, E.F., El Titi, A., Gendrier, J.P., Avilla, J., Jörg, E., & Malavolta, C. (1999). Integrated production. *Principles and technical guidelines*.
- Calvente, V., Benuzzi, D., & De Tosetti, M. I. S. (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43(4), 167-172.
- Carmel-Harel, O., & Storz, G. (2000). Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 439-61.

- Castillo, E., & Forero, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología industrial. Bogotá, DC Agosto De.
- Castoria, R., Caputo, L., De Curtis, F., & De Cicco, V. (2003). Resistance of postharvest biocontrol yeasts to oxidative stress: a possible new mechanism of action. *Phytopathology*, 93(5), 564–572.
- Cnubben, N. H., Rietjens, I.M., Wortelboer, H., Zanden, J., & Bladeren, P.J. (2001). The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), 141-152.
- Chen, J., Li, B., Qin, G., & Tian, S. (2015). Mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- induced oxidative stress regulating viability and biocontrol ability of *Rhodotorula glutinis*. *International Journal of Food Microbiology*, 193, 152-158.
- Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., et al. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control*, 90, 113-119.
- Collinson, L.P., & Dawes, I.W. (1995). Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, GLR1 encoding glutathione reductase. *Gene*, 156(1), 123-127.
- Cross J.V. (2002). Guideline for integrated production of pome fruits in Europe. Bulletin OILB srop Vol,25, 8.
- Dhanasekaran, S., Yang, Q., Godana, E. A., Liu, J., Li, J., & Zhang, H. (2021). Trehalose supplementation enhanced the biocontrol efficiency of *Sporidiobolus pararoseus* Y16 through increased oxidative stress tolerance and altered transcriptome. *Pest Management Science*, 77(10), 4425-4436.
- D'amore, T., Crumplen, R., & Stewart, G.G. (1991). The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *Journal of Industrial Microbiology*, 7(3), 191-196.
- Da Cunha, T., Ferraz, L.P., Wehr, P.P., & Kupper, K.C. (2018). Antifungal activity and action mechanisms of yeasts isolates from citrus against *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 276, 20–27.
- Di Canito, A., Mateo-Vargas, M. A., Mazzieri, M., Cantoral, J., Foschino, R., Cordero-Bueso, G., et al. (2021). The Role of Yeasts as Biocontrol Agents for Pathogenic Fungi on Postharvest Grapes: *Annual Review of Microbiology*, 10(7), 1650.
- Droby S., Wisniewski M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, H. (2016) The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22-29.
- Dukare, A.S., Paul, S., Nambi, V.E., Gupta, R.K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R.K. (2018). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498-1513.
- Dunlap, C.A., Evans, K.O., Theelen, B., Boekhout, T., & Schisler, D.A. (2007). Osmotic shock tolerance and membrane fluidity of cold-adapted *Cryptococcus flavescens* OH 182.9, previously reported as *C. nodaensis*, a biocontrol agent of *Fusarium* head blight. *FEMS Yeast Research*, 7(3), 449-458

- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46, 387-400.
- Eleutherio, E., Panek, A., De Mesquita, J. F., Trevisol, E., & Magalhães, R. (2015). Revisiting yeast trehalose metabolism. *Current Genetics*, 61, 263–274.
- Errampali, D. (2014). *Penicillium expansum* (blue mold). In *Postharvest decay and control* (pp. 189-231). Academic Press.
- Fan, Q., & Tian, S., (2000). Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranifaciens*. *Plant Disease*, 84(11), 1212–1216.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A.A. (2004). The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 46(1-2), 24-46
- Galvagno, M., & Cerrutti, P. (2004). Aumento de la actividad panificante de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación. *Revista Argentina. Microbiología* 36(1), 41-46.
- Gamero-Sandemetro, E., Torellas, M., Rábena, M.T., Gómez-Pastor R., Aranda, A., & Matallana E. (2015). Food-grade argan oil supplementation in molasses enhances fermentative and antioxidants defenses of active dry wine yeast. *AMB express*, 5, 1-11.
- Gamero-Sandemetro, E., Gómez-Pastor, R., & Matallana, E. (2014). Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnology Journal*, 9(8), 1055-1064.
- Garre García, E. (2008). Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca activa. Universitat de València.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., *et al.* (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241–4257.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E., & Matallana, E. (2011). Recent Advances in Yeast Biomass Production, *Biomass - Detection, Production and Usage*, 202-222.
- Gramisci, B. R. (2019). Optimización de la producción de dos levaduras seleccionadas para su uso como agentes de control biológico en postcosecha de pera. Tesis doctoral (CRUB), Argentina
- Gramisci, B. R., Lutz, M. C., Lopes, C. A. & Sangorrín, M. P. (2018). Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. *Biological Control*, 121, 151-158.
- Grant, C. M., Perrone, G., & Dawes, I. W. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), 893–898.
- Guan, N., Li, J., Shin, H., Du, G., Chen, j., & Liu, L. (2017). Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanism to practical applications. *Applied microbiol and biotechnology*, 101, 3991-4008.
- Hatem, E., Berthonaud, V., Dardalhon, M., Lagniel, G., Baudouin-Cornu, P., Huang, M.E., *et al.* (2014). Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 67, 103–114.

- Hua, S. S. T., Hernlem, B.J., Yokoyama, W., & Sarreal, S. B. L. (2015). Intracellular trehalose and sorbitol synergistically promoting cell viability of a biocontrol yeast, *Pichia anomala*, for aflatoxin reduction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 729–734.
- Instituto Argentino de Sanidad y Calidad Vegetal, Res.423/92  
<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-423-1992-197474/texto>
- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptative response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 320, 61-67.
- Janisiewicz, W. J., Tworkoski, T.J., & Kurtzman C.P. (2001). Biocontrol Potential of *Metchnikowia pulcherrima* Strains Against Blue Mold of Apple. *Phytopathology*, 91(11), 1098 – 1108.
- Janisiewicz, W.J., & Korsten L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annual Review Phytopathology* 40(1), 411-441.
- Jijakli M.H., & Lepoivre P. (2004). State of the Art and Challenges of Post-harvest Disease Management in Apples. *Fruit and vegetable diseases*, 59-94.
- Kono, Y., & Fridovich, I. (1982). Superoxide radical inhibits catalase. *Journal Biological Chemistry*. 257(10), 5751-5754.
- Kowalska, J., Krzywińska, J., & Tyburski, J. (2022). Yeasts as a potential biological agent in plant disease protection and yield improvement—A Short Review. *Agriculture*, 12(9), 1404.
- Kreiner, M., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2000). “Oxidative stress” response in submerged cultures of a recombinant *Aspergillus niger* (B1-D). *Biotechnology Bioengineering*, 70(6), 662–669.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., & Boekhout, T. (Eds). (2011). *The Yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Lee, J.C., Straffon, M.J., Jang, T.Y., Higgins, V.J., Grant, C.M., & Dawes, I. W. (2001). The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analyzed using a grande gsh1 disruptant strain. *FEMS yeast Research*, 1(1), 57-65.
- Leeson, S., & Summer, J. D. (2005). *Commercial poultry nutrition*. Nottingham University Press.
- Li, C., Zhang H, Yang, Q., Komla, M.G., Zhang, X., & Zhu S. (2014). Ascorbic acid enhances oxidative stress tolerance and biological control efficacy of *Pichia caribbica* against postharvest blue mold decay of apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(30),7612–7621.
- Li, G., Chi, M., Chen, H., Sui, Y., Li Y., Liu Y, *et al.* (2016). Stress tolerance and biocontrol performance of the yeast antagonist, *Candida diversa*, change with morphology transition. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 2962-2967.
- Li, R., Zhang, H., Liu, W., & Zheng, X. (2011). Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *International Journal of food Microbiology*, 146(2), 151-156.
- Li, B. Q., & Tian, S. P. (2006). Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *Journal of Applied Microbiology* 100(4), 854–861.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S., & Farrel, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 578-590.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S., & Hershkovitz, V. (2011). Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 76-83.

- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International journal of food microbiology*, 167(2), 153-160.
- Lončar, N., & Fraaije, M.W. (2015). Catalases as biocatalysts in technical applications: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3351–3357.
- Lowry, O., Rosebrough N., Farr. A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-75.
- Luo, B., Sun, H., Zhang, Y., Gu, Y., Yan, W., Zhang, R., & Ni, Y. (2019). Habitat-specificity and diversity of culturable cold-adapted yeasts of a cold-based glacier in the Tianshan Mountains, northwestern China. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(5), 2311-2327.
- Lushchak, V.I. (2006). Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model to study oxidative modification of protein in eukaryotes. *Acta Biochimica Polonica*, 53 (4), 679-684.
- Lutz, M. C. (2015). Control biológico de hongos patógenos de peras en postcosecha utilizando levaduras indígenas en la Nor-Patagonia. Universidad Nacional del Comahue.
- Lutz, M.C., Lopes, C.A., Rodriguez, M.E., Sosa, M.C., & Sangorrín, M.P. (2013). Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology* 164(2-3), 166–172.
- Lutz, M.C., Robiglio, A., Sosa, M.C., Lopes, C.A., & Sangorrín, M.P., (2010, November). Two selection strategies of epiphytic native yeasts with potential biocontrol capacity against postharvest pears pathogens in Patagonia. In *XI International Pear Symposium 909*(pp. 761-768).
- Lutz, M.C., Lopes, C.A., Sosa, M.C., & Sangorrín, M.P. (2020). Semi-commercial testing of regional yeasts selected from North Patagonia Argentina for the biocontrol of pear postharvest decays. *Biological Control*, 150, 104246.
- Lutz, M.C., Sosa, C., Lopes, C. A., & Sangorrín, M.P. (2012). A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 22(12), 1465-1483.
- Macarasin, D., Droby, S., Bauchan, G., & Wisniewski, M. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist–fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 194–202.
- Meade, G.P. 1986. Manual del Azúcar de Caña. Montaner y Simón S.A Barcelona. 305-325 pp.
- Mercier, J., & Wilson, C.L. (1994). Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biological Control*, 4(2), 138–144,
- Ministerio de Economía Argentina. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca (2022). Informe de pera y manzana (2021) con avances 2022.  
<https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2021/09/perasymanzanas-sep2022-1.pdf>
- Moradas-Ferreira, P., & Costa, V. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defenses, damage and death. *Redox Report* 5(5), 277-285.
- Morano, K.A., Grant, C.M., & Moye-Rowley, W.S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190(4), 1157-1195.

- Mostafavi, H., Mirajlessi, S., Fathollahi, H., Shahbazi, S., & Mijalili, S. (2013). Integrated effect of gamma radiation and biocontrol agent on quality parameters of apple fruit: An innovative commercial preservation method. *Radiation Physics and Chemistry*, *91*, 193-199.
- Nian, L., Xie, Y., Zhang, H., Wang, M., Yuan, B., Cheng, S., & Cao, C. (2023). *Vishniacozyma victoriana*: An endophytic antagonist yeast of kiwifruit with biocontrol effect to *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry*, *411*, 135442.
- Nie, X., Zhang, C., Jiang, C., Zhang, R., Guo, F., & Fan, X. (2019). Trehalose increases the oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* in the microenvironment of pear wounds. *Biological Control*, *132*, 23-28.
- Nunes C.A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal Plant Pathology*, *133*, 181-196.
- Öztekin, S., & Karbancioglu-Guler, F. (2023). Biological control of green mould on mandarin fruit through the combined use of antagonistic yeasts. *Biological Control*, *180*, 105186.
- Palou, L., Smilanick, J.L., & Droby, S., (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*. *2*(2), 1-16
- Pashova, S., Slokoska, L., Krumova, E., & Angelova, M. (1999). Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger* 26. *Enzyme and Microbial Technology* *24*(8-9), 535-540.
- Patiño-Vera, M., Jimenez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., *et al.* (2005). Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(3), 540-550.
- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., & Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimized product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology* *46* (2), 167-175.
- Pianzola, M.J., Moscatelli, M., & Vero, S. (2004). Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Disease*, *88*(1), 23-28.
- Qin, G., Tian, S., & Xu, Y. (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, *31*(1), 51-58.
- Riddle, J. & Ford, J. (2000). Independent Organic Inspectors Association. International Federation of Organic Agriculture Movement.
- Romanazzi, G., Simlanick, J.L., Filiziani, E., & Droby, S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crop. *Postharvest Biology and Technology*, *113*, 69-76.
- Ruis, H. (1992). Regulation of yeast catalase genes. *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, 155-172.
- Sangorrín, M.P., Lopes, A., Vero, S., & Wisniewski, M. (2014). Cold-Adapted Yeasts as Biocontrol Agents: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biocontrol Potential. *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*, 441-464.
- Santagni, A., Nievas, W. E., Di Masi, S. N., & Menni, M. F. (2022). Prospectiva frutícola del Alto Valle del río Negro al 2035. Revisión del presente frutícola para la construcción de arquetipos de escenarios. EEA Alto Valle, INTA.

- Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M.L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternate* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(1), 121-128.
- Schnierda, T., Bauer, F.F., Divol B., Van Rensburg, E., & Gorgens, J.F. (2014). Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Letters in Applied Microbiology* 58(5), 478-485.
- Semchyshyn, H.M., & Lozinska, L.M. (2012). Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase. *FEMS Yeast Research*, 12(7), 761-773
- SENASA, 2018. Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/senasa>
- SENASA, 2023. Situación de la Producción Orgánica en Argentina durante el año 2022. Dirección de Calidad Agroalimentaria.
- Sharma, R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50 (3), 205-221.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Spadaro, D., Ciavarella, A. A., Lopez-Reyes, J. G., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2010). Effect of culture age, protectants, and initial cell concentration on viability of freeze-dried cells of *Metschnikowia pulcherrima*. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(10), 809-815.
- Staats, M., Van Baarlen, P., & Van Kan., J. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22(2), 333-346.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (1995). Media for industrial fermentations. In P. F. Stanbury, A. Whitaker, & S. J. Hall (Eds.), *Principles of fermentation technology*. Oxford: Perjamon Press. 2nd ed., pp. 93-121.
- Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, J. (2015). Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (9), 2968-2975.
- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., & Montuschi, C. (1995). Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journall of Applied Microbiology*, 78(3), 304-308.
- Thammahong, A., Puttikamonkul S., Perfect J.R., Brennan, R.G., & Cramer, R.A (2017). Central role of the trehalosa biosynthesis pathway in the pathogenesis on human fungal infections: opportunities and challenges for therapeutic development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 81(2), 1-31.
- Toledano, M. B, Delaunay-Moisan, A., Outten, C. E., & Igarria, A. (2013) Functions and cellular compartmentation of the thioredoxin and glutathione pathways in yeast. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(13),1699-711.
- Vero, S., Garmendia, G., Garat, M.F., de Aurrecoechea, I., & Wisniewski, M. (2011). *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. In *International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities* 905(pp. 169-180).

- Vero, S., Garmendia, G., González, M.B., Betancur, O., & Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeast obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agent for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). *FEMS Yeast Research*, 13(2), 189-199.
- Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., & Wisniewski, M., (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26(1), 91–98.
- Viera, M.E. (2013). Combinación de tecnologías de membranas para la purificación de L (+) – ácido láctico a partir de mosto de banano (*Musa AAA*, variedad Cavendish cultivar Gram naine) obtenido de un desecho agroindustrial.
- Villalba, L.; Lutz, M.C.; Lopez, S.; Pildain, M.B.; & Sangorrín, M.P. (2016). Patagonian antagonist yeasts for food biopreservation. *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*, 301-323.
- Viñas, I., Usall J., Teixidó N., & Sanchis V. (1998). Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal Food Microbiology* 40(1-2), 9-16.
- Viñas, I., Teixidó, N., Abadias, M., Torres R., & Usall, J. (2006). Alternativas a los fungicidas de síntesis en el control de las enfermedades de postcosecha de frutas. En Actas Simposio de Postcosecha, Orihuela, Alicante, España (363-373).
- Wang, L., Jin, P., Wang, J., Zhang, S., Gong, H., Liu, H., *et al.* (2015). In vitro inhibition and in vivo induction of defense response against *Penicillium expansum* in sweet cherry fruit by postharvest applications of *Bacillus cereus* AR 156. *Postharvest Biology and Technology*, 101, 15-17.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A.L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Wilson, C., & Wisniewski, M. (1992). Futures alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases. *Biological Control of Plant Diseases: Process and Challenges for the future* (pp 133-138). Boston, MA: Sprinder US.
- Xu, X., Chan, Z., Xu, Y., & Tian, S. (2008). Effect of *Pichia membranifaciens* combined with salicylic acid on controlling brown rot in peach fruit and the mechanisms involved. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(10), 1786 – 1793.
- Yan, Y., Zhang, X., Zheng, X., Apaliya, M. T., Yang, Q., Zhao, L., *et al.* (2018). Control of postharvest blue mold decay in pears by *Meyerozyma guilliermondii* and it's effects on the protein expression profile of pears. *Postharvest Biology and Technology*, 136, 124–131.
- Yáñez-Mendizábal, V. (2012). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*, 60(3), 280-289
- Yourman, L. F., & Jeffers S. N. (1999). Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 83(6), 569-575.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M.L. (2010). Selection and Evaluation of New Antagonists for Their Efficacy Against Postharvest Brown Rot of Peaches. *Postharvest Biology and Technology*, 55(3), 174-181.
- Zhang, H., Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Zhang, H., & Zheng, X. (2008). Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 126 (1-2), 167–171.

- Zhang, H.; & Forman, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2 (Vol. 23, No. 7, pp 722–728). Academic Press
- Zhang, Q., Zhao, L., Li, Z., Li, C., Li, B., Gu, X., *et al.* (2019). Screening and identification of an antagonistic yeast controlling postharvest blue mold decay of pears and the possible mechanisms involved. *Biological Control*, 133, 26–33.
- Zhang, Z., Chen, J., Li, B., He, C., Chen, Y., & Tian, S. (2017). Influence of oxidative stress on biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against blue mold on peach fruit. *Frontiers in Microbiology*, 8, 239079.
- Zhang, X., Li, B., Zhang, Z., Chen, Y., & Tian, S. (2020). Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. *Journal of Fungi*, 6(3), 1-15.
- Zhao, L., Zhang, H., Lin, H., Zhang, X., & Ren, X. (2013). Effect of trehalosa on the biocontrol efficacy of *Pichia caribicca* against post-harvest grey mould and blue mold decay apples. *Pest Management Science*, 69(8), 983–989.

## PROPUESTA DIDÁCTICA

### I. Fundamentación

La enseñanza de las Ciencias Naturales en nuestra región se encuentra, desde la perspectiva de la complejidad, actualmente tensionada. En primer lugar, enfrenta el desafío de la alfabetización científica para la ciudadanía, es decir permitir que los y las estudiantes tengan las herramientas y la motivación necesaria para poder participar de las prácticas sociales que demandan conocimiento científico. En segundo lugar, el desafío de aunarse a la realidad social en la cual estamos inmersos, atendiendo además de los aspectos sociales y tecnológicos también los ambientales. Esto último implica un esfuerzo no solo desde un marco ecologista de responsabilidad individual, sino que también desde una formación de conciencia colectiva en que la escuela se inmiscuye en la sociedad en la cual está inserta afrontando el desafío político económico que representa ser parte de la misma.

Ante estas urgencias se presenta en un plano más formal y concreto una realidad educativa que se halla atravesada por un currículo desactualizado, arcaico e inerte a los estímulos de la vida en sociedad: sus conflictos y exigencias. Además, una burocracia y una estructura abstracta y rígida que corre por detrás de las necesidades y que suprime al sujeto de aprendizaje. Es imperante entonces plantear cuál es el papel que debe cumplir la Química como disciplina fundamental en la alfabetización científica. Debe ser una herramienta útil en la vida de los y las estudiantes; es decir, que les permita comprender y desarrollar competencias científicas como ciudadanos reflexivos. En palabras de Sanmartí (2002): “Si se considera que la escuela tiene la finalidad de preparar a los individuos para comprender, juzgar e intervenir en su comunidad de manera responsable, justa, solidaria y democrática, la enseñanza de las Ciencias es un componente fundamental en esta formación”.

Entonces, pasando al plano material, se entiende como vital recurrir a una adecuada selección de contenidos, que cuenten con un enfoque global, integrador sistémico y contextualizado, que permita a los y las estudiantes aprender a resolver problemas y situaciones que le plantea la realidad (Zabala, 1999). Para ello, ya definido el papel de la disciplina es importante entrelazar la finalidad de la educación científica, surge entonces el concepto de competencia científica. Zabala & Arnau (2007) plantean que: "la introducción en la enseñanza del término competencia es el resultado de la necesidad de utilizar un concepto que dé respuesta a las necesidades reales de la intervención de la persona en todos los ámbitos de la vida". En este sentido, se plantea

priorizar contenidos con el potencial de generar un aprendizaje significativo que ocurre cuando se confronta la realidad con la teoría.

Los movimientos curriculares que promueven la enseñanza de una ciencia aplicada vinculada a los currículos Ciencia-Tecnología-Sociedad (CTS) son una respuesta a la problemática planteada. Según Massarini (2011) “el enfoque CTS se orienta al análisis de las complejas relaciones entre ciencia, tecnología y sociedad, tanto en lo de referido a los procesos de producción del conocimiento, como a sus aplicaciones y a su distribución”. Es decir, tener en cuenta que vivimos en un mundo cada vez más globalizado y las implicancias que ello conlleva sobre la vida en sociedad, el entorno y el contexto socio-cultural del momento, en el sentido de fomentar una mirada crítica frente a esta realidad. “Ello no significa que todo el mundo ha de conocer y hacer uso de las últimas y más sofisticadas teorías científicas. Se trata, más modestamente, de garantizar a través de la educación formal y no formal la posibilidad de acceder al conocimiento necesario y suficiente para discernir sobre las cuestiones que entran en juego al definir políticas en Ciencia y Tecnología de manera que los ciudadanos y ciudadanas puedan optar lúcidamente entre distintas opiniones expertas” (Massarini, 2011). En paralelo, el enfoque del aprendizaje basado en problemas (ABP) sostiene que el aprendizaje efectivo ocurre cuando los y las estudiantes enfrentan y resuelven problemas reales o simulados que desafían su comprensión y habilidades. Así, contrario a lo que antaño significaba el aprendizaje de contenidos específicos, hoy se busca que los conocimientos adquiridos promuevan a la formación de ciudadanos que, además de conocer de ciencia, puedan intervenir críticamente en cuestiones científicas y tecnológicas donde no sólo sean capaces de tomar decisiones en relación con su autonomía personal sino también en la participación colectiva en asuntos de interés común (Villalobos Delgado *et al.*, 2016; Fernández & Aguado, 2017).

Zabala (1999) sostiene: “La comprensión de la realidad para intervenir en ella y transformarla, ya que el aprendizaje no es simplemente una acumulación de saberes, sino que depende de las capacidades de quien aprende y de sus experiencias previas”.

Haciendo eco de las palabras de Zabala se estructura la siguiente propuesta didáctica, con la intención de pensar en enseñar para la complejidad en el sentido de brindar conocimientos, habilidades y valores para aportar de manera activa en las soluciones a las problemáticas actuales. En otras palabras, la intención de este trabajo enarbola la idea de que existe una estrecha implicancia entre la finalidad educativa y la función social, lo cual permite, en

principio, tener criterios muy claros con los que estructurar la propuesta y seleccionar los contenidos escolares.

En esta misma línea, Furman (2009) agudiza el pensamiento con sus palabras: “El conocimiento científico no está ahí afuera listo para ser descubierto, sino que se construye y se valida a partir de una cierta metodología y en una comunidad de pares que comparten ciertas reglas basadas, por ejemplo, en la confrontación de puntos de vista y en la argumentación en base a evidencias. Así, el conocimiento científico no es acabado, sino que está en permanente revisión”. Es la misma autora quien teoriza sobre las formas de abordaje de este conocimiento científico y sostiene que: “la enseñanza por indagación sería un enfoque coherente con una mirada de las ciencias naturales como producto y proceso”. Así, las Ciencias Naturales son el producto que proporciona conocimientos y resultados, y un proceso que implica investigación, método y colaboración. Ambos enfoques están interconectados y se influyen mutuamente. Se ponen en juego entonces, distintas competencias como la búsqueda de información, la clasificación y la organización de la misma.

Es necesario recurrir al espacio que permite la realización de diferentes experimentos que acompañen en el proceso de aprendizaje. En este sentido, Gellon *et al.* (2005) sostienen que “reconocer el carácter empírico de la ciencia en el aula implica, ante todo, poner a los y las estudiantes en contacto con el mundo de los fenómenos. Al observar fenómenos es importante dar a los y las estudiantes la oportunidad de formar sus propias ideas sobre lo que ocurre y de dar sus propias explicaciones antes de introducir la explicación científica. Es deseable también inducirlos a formular predicciones, especialmente aquellas que se puedan verificar experimentalmente”. Estos autores nos explican que si trabajamos siguiendo una secuencia fenómeno-idea-terminología, estamos utilizando la secuencia lógica que sigue la investigación científica. Tomando como punto de partida una serie de fenómenos, y permitiendo que los y las estudiantes se familiaricen con ellos mediante el juego y la exploración, se podrán desarrollar las ideas fundamentales de la unidad que se está estudiando. Será importante no perder de vista los conceptos y las ideas, sin necesidad de darles nombres específicos, haciendo uso de vocabulario cotidiano que acompañe en la descripción de lo que se está estudiando. Finalmente, cuando las ideas hayan sido comprendidas, se hará uso del lenguaje apropiado para cada fenómeno. Puede, además, explicarse a los y las estudiantes la metodología de trabajo para que sean conscientes del proceso propuesto. Lo más importante es que los/as estudiantes obtengan sus primeras herramientas de pensamiento científico, que le permitan desarrollar destrezas al

momento de estudiar los fenómenos y poder identificar la conexión entre lo que pensamos y lo que observamos. El aspecto empírico de la Ciencia comprende una multitud de abordajes de la realidad, que no se limita a los experimentos e incluye formas muchas veces más versátiles, más útiles y accesibles a la realidad del docente (Gellon 2008).

Por otra parte, es preciso reflexionar acerca de la atención a la diversidad e inclusión en las escuelas. En las aulas conviven diferentes personas, surge entonces la necesidad de fomentar el diálogo entre diferentes culturas, valores y sistemas de conocimiento. A partir de ese diálogo, la institución escolar debe enriquecerse con esa diversidad y tendrá que promover la heterogeneidad, en lugar de buscar, como ha ocurrido usualmente, en el marco de una cultura escolar acreditativa y selectiva, la homogeneización u homologación del alumnado (Monereo Font & Pozo Municio, 2001).

Basado en estos criterios y teorías, la propuesta que se presenta pretende extender los conocimientos desarrollados en el cuerpo del Seminario de Investigación mediante la intervención didáctica, al Ciclo Básico Común de la Escuela Secundaria. Con este fin se estructuraron las actividades experimentales contextualizadas en la realidad social y económica, atendiendo a los marcos de desarrollo productivo de la zona, explicitados en el trabajo final de grado. Entre la multitud de contenidos, a partir de la problemática vinculada a la conservación de la pera, se buscó involucrar los conceptos químicos específicos como sustancias, propiedades de la materia, reacciones químicas, entre otros.

La propuesta a su vez responderá al diseño curricular nuevo de la Escuela Secundaria correspondiente a la provincia de Neuquén (Consejo Provincial de Educación, 2018), cuyo centro es el trabajo organizado a partir de áreas de conocimiento. En este contexto, la Química como disciplina queda enmarcada en el área de “Las Ciencias Naturales”, donde conviven en simultáneo tres disciplinas: Física, Química y Biología. En estas últimas dos se apoya la propuesta planteada a continuación, donde se proponen actividades interdisciplinarias que permitan a los estudiantes ampliar su concepción, sobre el conocimiento a construir: las levaduras.

#### **Núcleos problemáticos disciplinares a abordar a partir del diseño curricular:**

- El estudio de los sistemas complejos como el Universo, el planeta Tierra, los seres vivos, los sistemas materiales y los compuestos químicos sometidos a cambios e interacciones múltiples y constantes en una red de relaciones naturales y sociales.

- Los seres vivos, la materia y la energía, sus manifestaciones físicas, químicas y biológicas, caracterizaciones y análisis a partir de problemáticas complejas.
- El carácter histórico y social de las Ciencias Naturales, los puntos de encuentro y tensiones con las tecnociencias, las tecnologías de género, la salud, las sexualidades, la industria, el ambiente y el devenir de la mirada de colonial para pensarnos como territorio de luchas interseccionales.

## II. Objetivos

- Comprender problemáticas complejas en el área de Ciencias Naturales a partir de analizar el carácter y las fuentes de información.
- Construir modelos explicativos a partir de buscar información, registrar, comparar y analizar datos. Elaborar hipótesis e inferencias, evaluar variables y organizar la información obtenida.
- Articular el conocimiento y saber de las distintas disciplinas que componen el área de Ciencias Naturales, en particular: Química y Biología.
- Ampliar los conocimientos de la diversidad de los seres vivos.

## III. La producción de peras en el Alto valle de Neuquén y Río Negro, los microorganismos, los plaguicidas y el medio ambiente como temas disparadores

Los aprendizajes resultan significativos cuando se confronta la realidad con la teoría, por lo cual se empleará como eje temático la producción, conservación y consumo de la pera para el diseño de propuestas didácticas, en particular las levaduras. Las mismas buscan desarrollar las competencias antes mencionadas.

Cabe resaltar la amplitud que esta temática tiene para la enseñanza de las ciencias, pues a partir de ella es posible abordar múltiples contenidos propios de la disciplina. En la Figura 1 se muestran los conceptos que podrían ser desarrollados mediante el uso de las levaduras como agente de control biológico (ACB) en la postcosecha de la pera. Los contenidos específicos de la asignatura que se aborden dependerán directamente del contexto educativo en el cual se desarrolla la actividad y la realidad del aula. Además, los objetivos y la complejidad de cada uno de ellos son funcionales al grupo que aprende.

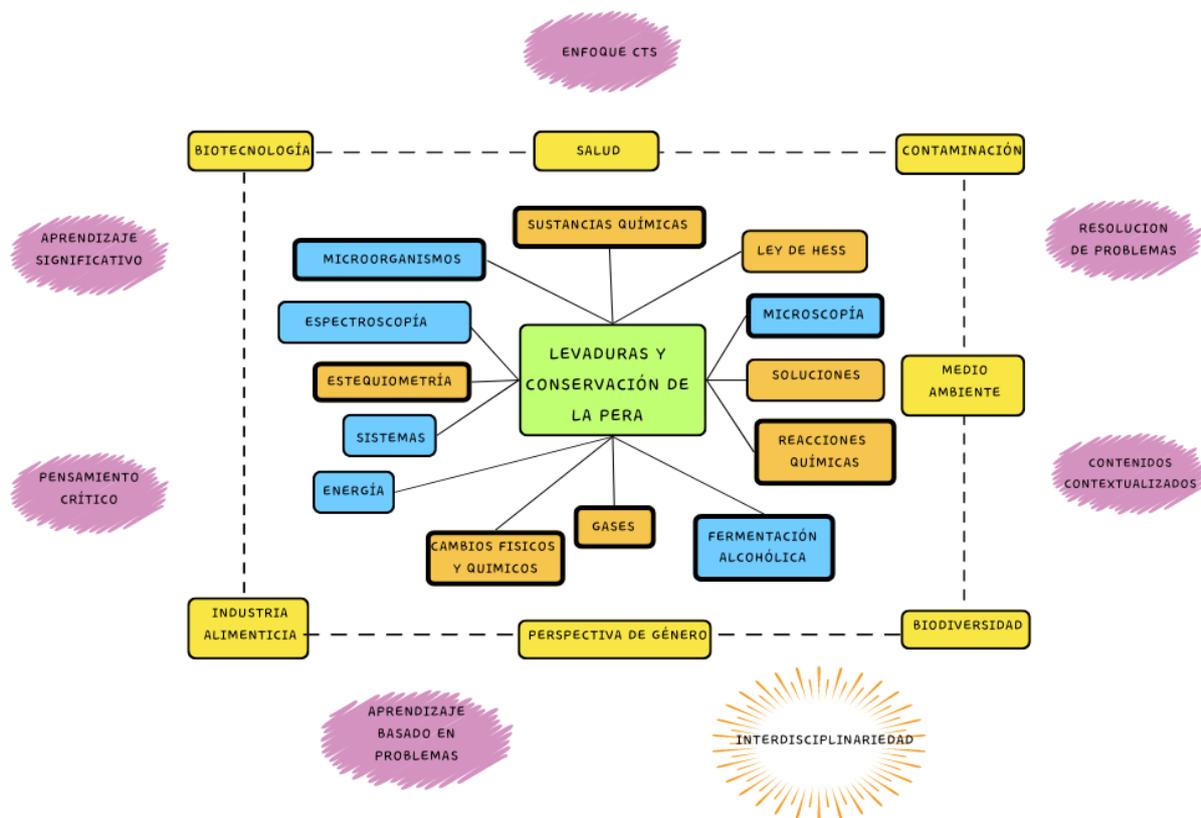


Figura 1: Contenidos disciplinares que podrían ser abordados mediante el uso de las levaduras como agente de control biológico en la postcosecha de la pera. En color naranja se encuentran los contenidos de la química, en turquesa aquellos que pueden ser abordados desde la biología, la física y la química; y los remarcados en negro son los abordados en la propuesta. Además, se indican en la figura, las diferentes competencias y ejes temáticos (medio ambiente, biodiversidad, etc.).

La propuesta está pensada para estudiantes de nivel medio del ciclo básico común (según el nuevo diseño curricular de la provincia de Neuquén) que cursan en 2° cuatrimestre del primer año. En la misma se aplicarán conocimientos sobre reacciones químicas, formulación, nomenclatura y gases vinculados a la producción de alimentos y la presencia de los hongos en la cotidianeidad. El tiempo de duración dependerá del grupo de estudiantes, se estima que serán alrededor de cuatro a cinco clases de 2 horas cada una.

#### IV. Primera propuesta didáctica

##### ¿Cómo actúan los microorganismos sobre los alimentos?

##### Objetivos

- Conocer el proceso biológico de descomposición de los alimentos.
- Identificar los cambios que se producen en determinados materiales orgánicos comestibles (proceso de descomposición).
- Reflexionar sobre situaciones cotidianas relacionadas con la transformación de los alimentos.
- Vincular la producción de alimentos con los microorganismos.

**Contenidos mínimos requeridos para la propuesta:** Propiedades de la materia.

Estados de agregación de la materia. Propiedades intensivas y extensivas. Normas de seguridad del laboratorio. Uso de balanza y microscopio.

##### Actividades

*Este trabajo se llevará a cabo en el laboratorio, en grupos de hasta cuatro personas.*

##### Primer momento: sacando a la luz las ideas previas

1. Responder los siguientes interrogantes
  - a) ¿Qué ocurre cuando un alimento se pone en mal estado? ¿Cuáles son las características que adquiere?
  - b) ¿A todos los alimentos les ocurre lo mismo? ¿De qué condiciones dependerá?
2. A continuación, se presentan dos textos acerca de la producción de queso y del vino.
  - a) Leer los siguientes textos, donde se explican los procesos de obtención del queso y vino.

# EL QUESO

## Historia del queso

Pese a que existen varios registros sobre la existencia del queso en la antigüedad, no se conoce con absoluta certeza el origen de su elaboración. Se cree que con la domesticación de la oveja sobrevino su aparición y esto tuvo lugar 7000 A.C. Ya desde las civilizaciones más primitivas, como la sumeria, se encuentran registros sobre la presencia del queso, mayormente en sus representaciones artísticas.



Los egipcios también dejaron constancia de su conocimiento acerca de la elaboración del queso a través de su literatura y en algunas de sus pinturas funerarias. Se dice que fue por pura casualidad que los egipcios descubrieron el método de elaboración. Durante el pastoreo solían portar los alimentos en bolsas de cuero, entre ellos la leche. El calor hizo fermentar los azúcares y el ácido láctico formado, coaguló la leche. Con el movimiento del viaje, la cuajada se iba disgregando, separándose del suero. Éste lo tomaban como bebida refrescante y la cuajada desuerada y salada, como suplemento proteico.

## ¿Qué es el queso y cómo se fabrica?

El queso es el producto obtenido cuando ocurre la coagulación de la leche por acción de ciertos microorganismos. Las bacterias lácticas son las encargadas de fermentar la lactosa para generar ácido láctico. Una vez que las proteínas de la leche han coagulado (cuajado), formando así la cuajada, ésta se calienta y se comprime para eliminar la porción acuosa de la leche (suero), se sala y se somete a un proceso de maduración, que puede variar de días a meses, incluso años. Cada tipo de queso es elaborado por cepas específicas de bacterias lácticas que tienen una importante función en el desarrollo de sabor, aroma y textura de los quesos. Algunas bacterias generan como producto de la fermentación de la lactosa, además de ácido láctico, dióxido de carbono. Este gas es el responsable de los "ojos" en la fabricación del queso Gruyere y Roquefort, entre otros. Esto se debe a que los surcos formados por el gas son necesarios para permitir el crecimiento del hongo *Penicilium rocheforti* que es el que le otorga el sabor y color.



### Fuentes

<https://infogram.com/infografia-ever-baez-1hke60dz8kv525r>

<https://www.garciabaquero.com/la-historia-del-queso-i-el-origen-del-queso>

[https://web.archive.org/web/20091114080151/http://www.asocpromocionquesos.es/trad\\_centorig.htm](https://web.archive.org/web/20091114080151/http://www.asocpromocionquesos.es/trad_centorig.htm)

# EL VINO

## Historia del vino

En un ánfora de 5500 años de antigüedad, arqueólogos encontraron en Irán, una mancha de vino, siendo esta la más antigua evidencia sobre su existencia. Se cree que su elaboración ha sufrido diversos cambios a lo largo de la historia, sin embargo, la esencia misma de su producción se ha mantenido: la fruta fermentada por acción de las levaduras que viven normalmente sobre ella. Este proceso ocurre de forma natural y es lo que hace que la uva se descomponga y su jugo, se convierta en alcohol.



Peró este proceso natural ha sido perfeccionado mediante la viticultura, es decir, la técnica de la elaboración del vino. Con el avance de las civilizaciones fue aparejado el progreso de dicho arte, que llegó a Europa a través de los egipcios a Grecia. Hoy en día, se cree que su descubrimiento fue azaroso, es decir que posiblemente, las primeras personas que probaron ese líquido borbudo se hayan sentido extraños... y quisieron repetir la experiencia.

## ¿Qué es el vino y cómo se fabrica?

El vino es una bebida alcohólica elaborada a partir del jugo de uvas (o mosto) mediante la acción de levaduras.

En el proceso de elaboración del vino participan dos tipos de levaduras: las "silvestres", que se encuentran en las uvas tal como se cosechan y se transfieren por lo tanto al mosto. Y la "cultivada", *Saccharomyces cerevisiae*, que se añade al mosto para comenzar la fermentación.

Mientras la levadura "silvestre" tolera hasta un 4% de alcohol, la "cultivada" tolera mayores porcentajes. Dependiendo del tipo de uva que se utiliza y de cómo se prepare el mosto, se producirá vino blanco o tinto y las diferentes variedades de uvas darán origen a distintos tipos de vinos, donde las levaduras transformaran el azúcar proveniente de la uva en alcohol y CO<sub>2</sub>.

Casi todos los vinos son almacenados en toneles durante un tiempo que puede durar años, según la variedad y la calidad. Este proceso se llama añejamiento.

El vino espumoso, como el champán, es el que contiene una cantidad considerable de CO<sub>2</sub> que surge de la fermentación final que realiza la levadura dentro de la botella. Similar proceso ocurre con la elaboración de sidra, donde las levaduras actúan sobre el zumo de manzana para la obtención de alcohol, o también en la elaboración de cerveza, donde las levaduras actúan sobre los cereales malteados, usando como fuente de azúcar el almidón contenido en estos.



### Fuentes

[https://www.vinetur.com/2018053047306/como-es-el-proceso-de-elaboracion-del-vino-blanco.html#google\\_vignette](https://www.vinetur.com/2018053047306/como-es-el-proceso-de-elaboracion-del-vino-blanco.html#google_vignette)

[https://www.vinoseleccion.com/saber-de-vinos/historia-del-vino?srsId=AfmBOorM-YZXLOrqeBjkUBJleK52n0AoeSc\\_F6s-JwWNNLUENiVjBYtB](https://www.vinoseleccion.com/saber-de-vinos/historia-del-vino?srsId=AfmBOorM-YZXLOrqeBjkUBJleK52n0AoeSc_F6s-JwWNNLUENiVjBYtB)

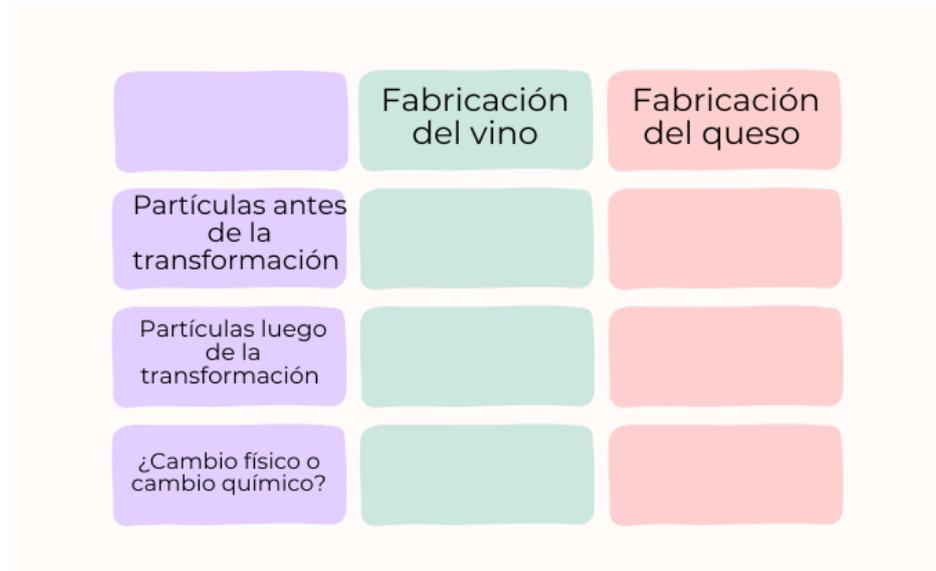
b) Completar el siguiente cuadro con la información obtenida de la lectura.

Productos	Materia prima para la producción	Proceso que ocurre	Cómo ocurre la transformación en producto	Condiciones para que ocurra la transformación
Queso				
Vino				

3. Hasta ahora hemos notado la existencia de pequeños seres que interfieren en procesos de descomposición como de producción. Pero ¿qué sabemos acerca de ellos? Completa el siguiente cuadro con lo que creas acerca de estos.

MICROORGANISMOS	
¿Cómo son?	
¿Dónde se encuentran?	
Otra característica que te llame la atención	

4. Ahora es momento de clasificar los fenómenos que ocurren y comparar las partículas (como te las imagines) de las sustancias antes y después de los procesos de fermentación alcohólica y láctica. Para ello completaremos el siguiente cuadro.



## Segundo momento: experimentando

### Experiencia N°1: Descomposición de los alimentos.



### Procedimiento:

- Rotular cada uno de los recipientes con ayuda de la cinta y el marcador. Deberemos contar con un recipiente para cada alimento.
- Introducir cada uno de estos alimentos en su respectivo recipiente, excepto la leche que podrá estar contenida en un vaso.
- Colocar papel film sobre el vaso de leche y sobre la bandeja que contiene el pan.

**d)** Registrar en el siguiente cuadro cada uno de los cambios que vayas observando cada dos días a lo largo de dos semanas, partiendo por registrar estos aspectos el primer día:

- colores y tamaños de las manchas.
- textura y la forma del alimento
- olor que despiden
- masa

Día número:	Pera	Leche	Tomate	Naranja	Pan
2					
4					
6					
1º Resumen semanal					
8					
10					
12					
2º Resumen semanal					

**e)** Al cumplirse el plazo de tiempo determinado deberá indicar si las propiedades que se fueron registrando son intensivas o extensivas. Fundamentar su respuesta sobre la base de los resultados.

	Masa inicial	Masa final
Pera		
Leche		
Tomate		
Naranja		
Pan		

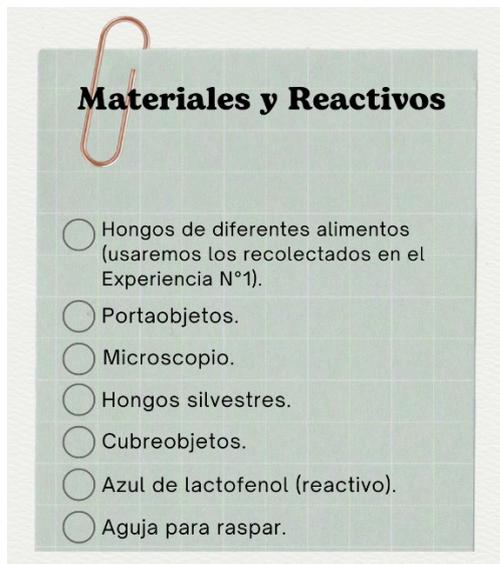
Propiedades intensivas	Propiedades extensivas

Responder  
¿Qué sucede con la masa de cada uno de estos alimentos? ¿Es igual al inicio y al final?  
Explicar qué crees que puede haber ocurrido

**Estas actividades preparan al grupo de estudiantes para el abordaje del concepto de reacción química y ecuación química.**

### **Experiencia N°2: Observación de hongos en el microscopio.**

Esta experiencia se llevará a cabo una vez finalizada la Experiencia N° 1.



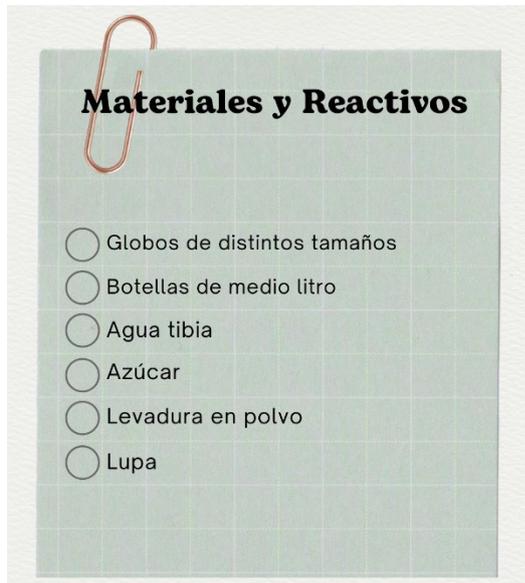
#### Procedimiento:

- a)** Antes de comenzar se debe rotular cada uno de los portaobjetos con un número o referencia asignada a cada muestra. Además, deberá averiguar qué es el azul de lactofenol y qué función cumple en este trabajo.
- b)** Observar cada una de las muestras y registrar en el cuadro en la columna que dice “representación macroscópica”.

- c) Con la ayuda de la aguja tomar una pequeña muestra del hongo que se encuentra en el alimento en cuestión y colocarla en el portaobjeto. Agregar unas gotas de azul de lactofenol y cubrir con el portaobjeto.
- d) Observar en el microscopio.
- e) Dibujar lo observado en la columna que dice “representación microscópica”.
- f) Observa similitudes o diferencias en las representaciones obtenidas. ¿A que piensa que se pueden deber?

Muestra	Representación Macroscópica	Representación Microscópica
Pera		
Tomate		
Pan		
Naranja		
Leche		
Hongo silvestre		

### Experimento N°3: Función metabólica de las levaduras.



#### Procedimiento:

- Colocar una pequeña cantidad de levadura en un vidrio reloj y observar los granitos, tocarlos, desarmarlos. Observar luego con una lupa y estimar la cantidad de levaduras que puede haber en cada granito. Registrar.
- En una botella colocar la mitad del contenido del sobre de levadura y luego agregar un poco de agua hasta disolver.
- Colocar dos cucharadas de azúcar y mezclar bien.
- Tapar la boca de la botella con un globo.
- Observar y registrar los cambios.

*Se puede variar los tamaños de globos y de botellas (inclusive, si se dispone, usar tubos de ensayo).*

En este experimento podemos observar como la levadura realiza su función metabólica, en la cual se desprende el gas dióxido de carbono observado al inflarse el globo sobre el tubo de ensayo.

#### Responder:

- a) ¿Qué función cumple el azúcar en este experimento?
- b) Además del gas dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) ¿se obtendrá otro producto?
- c) ¿Por qué el agua utilizada debe estar tibia?

d) La levadura es utilizada para la producción de pan. Explica cómo crees que actúa en esta receta.

Si se analizan los materiales y procedimientos que se utilizan para fabricar pan, es posible encontrar allí algunos datos que ayudan a pensar que las levaduras son seres vivos. Por eso le proponemos que analice una receta para hacer pan, tratando de buscar esos datos.

### **Tercer momento: Ejercitando y sacando conclusiones.**

**Actividad 1: Se realizará la explicación en el pizarrón de la fermentación alcohólica, fermentación acética, reacción química y ecuación química para luego presentar la consigna.**

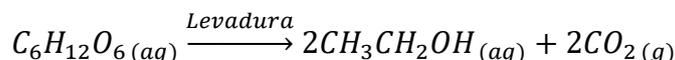
#### **¿Cómo se usan los microorganismos en la producción de alimentos y bebidas?**

Se utiliza un proceso denominado “fermentación”, por el cual los microorganismos obtienen energía a partir de compuestos orgánicos como azúcares y los transforman en compuestos más simples como CO<sub>2</sub>, ácidos, alcoholes, etc.

Existen distintos tipos de fermentaciones, entre los que podemos mencionar:

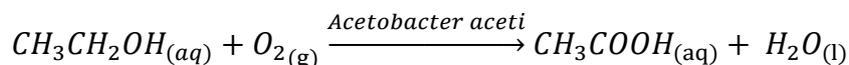
#### **- Fermentación alcohólica**

Realizada fundamentalmente por levaduras, que en ausencia de oxígeno transforman el azúcar de la materia prima en alcohol y CO<sub>2</sub>. Además, utilizan parte de las proteínas y azúcares para desarrollarse y multiplicarse. Ejemplos: Elaboración de pan y bebidas alcohólicas como cerveza, vino, sidra, etc.



#### **- Fermentación acética**

Resulta de la oxidación del alcohol por la bacteria *Acetobacter* en presencia del oxígeno (O<sub>2</sub>) del aire. Estas bacterias, a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requieren un suministro generoso de O<sub>2</sub> para su crecimiento y actividad. Ejemplo: elaboración de vinagre.



### ¿Pero qué significan esas ecuaciones?

Lo que acabamos de ver se llaman **ecuaciones químicas**, y a través de éstas podremos representar las **reacciones químicas**.

En una ecuación química los **reactivos** son la o las sustancias que se encuentran del lado izquierdo de la ecuación, mientras que el o los **productos** son los que se encuentran a la derecha de la misma. A los números que aparecen delante de cada sustancia se les denomina **coeficiente estequiométrico**. Además, se indica **entre paréntesis el estado de agregación de cada sustancia según las siguientes referencias:**

**Aq= acuoso, que esta disuelto en agua**

**l= líquido, que se encuentra en estado líquido.**

**s= sólido, que se encuentra en estado sólido.**

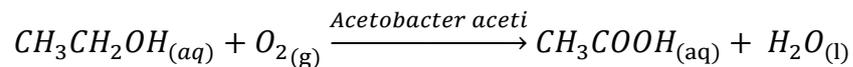
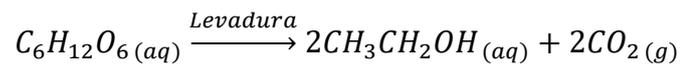
**g=gaseoso, que se encuentra en estado gaseoso.**

De modo general tenemos



a, b, c y d son los **coeficientes estequiométricos**

A. Observemos nuevamente las reacciones de fermentación alcohólica y acética:



- Indicar reactivos y productos.
- Indicar coeficientes estequiométricos de cada sustancia.
- Indicar estado de agregación para cada sustancia.

## V. Segunda propuesta didáctica

### Los alimentos y sus nutrientes

#### Objetivos

- Conocer las sustancias que mantienen el normal funcionamiento del metabolismo humano, dónde se las encuentra y cuáles son las funciones que llevan a cabo.
- Comprender la información de las etiquetas de valores nutricionales de los alimentos que se consumen.
- Comprender la importancia de la producción y conservación de frutas en la región.
- Reflexionar acerca del papel que tiene la ciencia.
- Conocer parte del trabajo de los y las científicas de nuestra Universidad Nacional del Comahue.

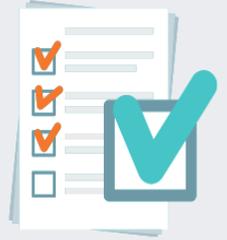
#### **Actividad n°1: ¿Qué sabemos acerca de los alimentos y sus nutrientes?**

- 1) ¿Alguna vez miraste una etiqueta con valores nutricionales? ¿Recordás qué información contiene?
- 2) ¿Conoces los nombres de los nutrientes o grupos de alimentos que debemos consumir a diario?
- 3) ¿Cuáles son las sustancias que deberían mencionarse como peligrosas en las etiquetas nutricionales? ¿Por qué?

#### **Actividad n° 2: pequeña autoevaluación.**

Pensando en nuestra alimentación, te invito a que reflexiones acerca de algunos puntos vinculados a la misma. Al finalizar realizaremos una puesta en común y debate acerca de nuestra elección de alimentos.

## PENSANDO EN NUESTRA ALIMENTACIÓN



1) ¿Qué prefieres beber cuando tienes sed?

- Agua
- Bebida gaseosa
- Jugo natural

2) ¿Cuánta azúcar consumes al día?

- Entre 1 y 5 cucharadas.
- Entre 6 y 10 cucharadas.
- Más de 11 cucharadas.

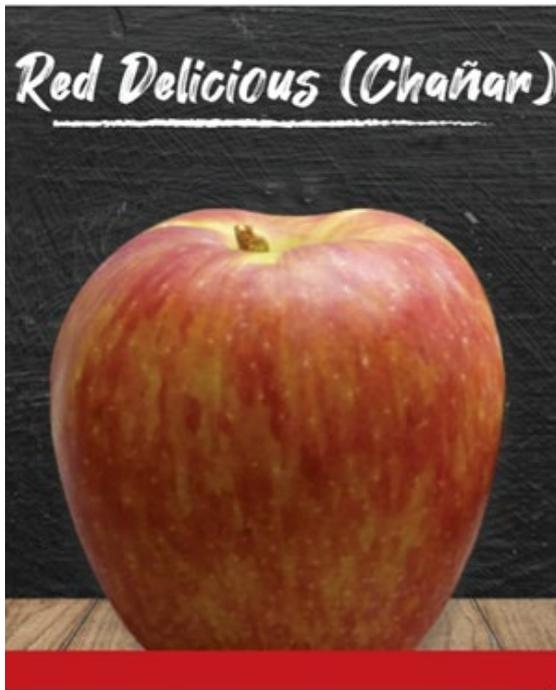
3) ¿Cuáles son los alimentos que más consumes?

- Carbohidratos (harinas, papas, cereales, etc.).
- Proteínas (leche, huevos, carnes, legumbres, etc.).
- Vitaminas y minerales (frutas y verduras).

4) ¿Sueles revisar la información nutricional de los alimentos?

- Si
- No
- A veces





**INFORMACIÓN NUTRICIONAL**

	Cantidad por 100 g	Cantidad por porción 180 g	%VD <sup>(*)</sup>
<b>Valor energético</b>	55 kcal - 235 kJ	100 kcal - 423 kJ	7
<b>Carbohidratos de los cuales:</b>	16 g	28 g	
<i>Sacarosa</i>	3,8 g	6,9 g	9
<i>Glucosa</i>	3,3 g	5,9 g	
<i>Fructosa</i>	8,3 g	15 g	
<i>Sorbitol</i>	1,1 g	2,0 g	
<b>Proteínas</b>	0,5 g	0,8 g	1
<b>Grasas totales de los cuales:</b>	0 g	0 g	
<i>Grasas saturadas</i>	0 g	0 g	0
<i>Grasas trans</i>	0 g	0 g	
<b>Fibra alimentaria</b>	2,6 g	4,7 g	
<b>Fibra insoluble (**)</b>	2,1 g	3,7 g	19
<b>Fibra soluble (**)</b>	0,6 g	1,0 g	
<b>Sodio</b>	0 mg	0 mg	0
<b>Potasio</b>	146 mg	262 mg	7
<b>Cinc</b>	0,25 mg	0,45 mg	6
<b>Cobre</b>	70 µg	122 µg	14
<b>Vitamina C</b>	1,9 mg	3,5 mg	8

(\*) Valores diarios recomendados en base a una dieta de 2000 kcal o 8400 kJ. Los valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de las necesidades energéticas.  
 (\*\*) No obligatorio para la legislación Argentina.

**Información nutricional proporcionada por INTA-INTI (\*\*\*)**  
 (\*\*\*\*) INTA e INTI sólo tienen participación en la generación de la información nutricional. Su utilización por parte de terceros, no representará responsabilidad alguna para éstos organismos.

**INFORMACIÓN NUTRICIONAL**

	Cantidad por 100 g	Cantidad por porción 200 g	%VD <sup>(*)</sup>
<b>Valor energético</b>	64 kcal - 270 kJ	128 kcal - 541 kJ	6
<b>Carbohidratos de los cuales:</b>	11 g	22 g	
<i>Sacarosa</i>	0,9 g	17 g	7
<i>Glucosa</i>	2,6 g	5,2 g	
<i>Fructosa</i>	7,6 g	15 g	
<i>Sorbitol</i>	3,6 g	7,0 g	
<b>Proteínas</b>	0,3 g	0,7 g	1
<b>Grasas totales de los cuales:</b>	0 g	0 g	
<i>Grasas saturadas</i>	0 g	0 g	0
<i>Grasas trans</i>	0 g	0 g	
<b>Fibra alimentaria</b>	3,0 g	6,0 g	
<b>Fibra insoluble (**)</b>	2,3 g	4,7 g	24
<b>Fibra soluble (**)</b>	0,7 g	1,3 g	
<b>Sodio</b>	0 mg	0 mg	0
<b>Potasio</b>	158 mg	316 mg	9
<b>Cinc</b>	0,25 mg	0,50 mg	7
<b>Cobre</b>	100 µg	200 µg	22
<b>Magnesio</b>	8,5 mg	17 mg	7

(\*) Valores diarios recomendados en base a una dieta de 2000 kcal o 8400 kJ. Los valores diarios pueden ser mayores o menores dependiendo de las necesidades energéticas.  
 (\*\*) No obligatorio para la legislación Argentina.

**Información nutricional proporcionada por INTA-INTI (\*\*\*)**  
 (\*\*\*\*) INTA e INTI sólo tienen participación en la generación de la información nutricional. Su utilización por parte de terceros, no representará responsabilidad alguna para éstos organismos.

a) Completa la siguiente tabla:

Alimento (100g)	Energía (kcal)	Proteína (g)	Grasa total (g)	Hidratos de carbono (g)	Sodio (mg)

b) Analizar y comunicar al resto de los grupos los resultados obtenidos. Juntos debatiremos:

- i) ¿Cuál es el alimento más completo nutricionalmente?
- ii) ¿Qué alimento tiene un mayor contenido energético?

c) Realizar la lectura del siguiente texto.

### **Ley de etiquetado frontal**

Como veras la lectura de las etiquetas de información nutricional tiene cierto grado de complejidad. Además de toda la información que contienen, muchas veces es difícil de visualizar y mucho más comprender rápidamente. Es por ello que el 12 de noviembre del 2021 se sancionó en Argentina la ley 27.642 “Promoción de la alimentación saludable”, popularmente conocida como “ley de etiquetado frontal”. La misma tiene los siguientes objetivos:

- Garantizar el derecho a la salud y a una alimentación adecuada. Dar información nutricional comprensible de los alimentos envasados y bebidas alcohólicas para resguardar los derechos de las y los consumidores.
- Advertir a las y los consumidores sobre los excesos de: azúcares, sodio, grasas saturadas, grasas totales y calorías.

- Prevenir la malnutrición en la población y reducir las enfermedades crónicas no transmisibles.

Seguramente ya habrás apreciado esos octógonos negros en el frente de los alimentos. Los mismos indican la composición del producto en cuestión de manera más simple, de modo que quien consuma o elija consumir lo haga con pleno conocimiento de lo que está eligiendo.

### SELLOS DE ADVERTENCIAS



### LEYENDAS PRECAUTORIAS



- d)** Responde las siguientes preguntas
- ¿Conocías la ley de etiquetado frontal? ¿qué sabes al respecto?
  - ¿Lees la información que hay en los sellos negros?
  - ¿Te informas sobre nutrición y salud? ¿Dónde?
  - ¿Estás de acuerdo con la ley de etiquetado frontal? ¿Por qué?
  - ¿Qué sentiste al ver por primera vez los productos con sellos negros en un producto?
  - ¿Dejaste de consumir algún producto o reducir su consumo debido a la presencia de los sellos negros? ¿Cuáles?
  - ¿Reemplazaste un producto por otro más saludable?
- e)** A continuación, leer el siguiente artículo publicado en el portal de noticias *Ámbito* el 14 de julio de 2023. Reflexionar en grupo acerca de sus respuestas.
- f)** En base a todo lo visto hasta aquí ¿qué piensas acerca del etiquetado frontal en las frutas y verduras? ¿deberían contenerlo?

DOMINGO,  
14 DE JULIO  
DE 2023

# Noticias

Núm.  
314

[HTTPS://ACORTAR.LINK/CNNEFF](https://acortar.link/cnneff)

## LEY DE ETIQUETADO: EL 76% LEE LOS OCTÓGONOS, PERO SOLO UN 33% CAMBIÓ SUS HÁBITOS.

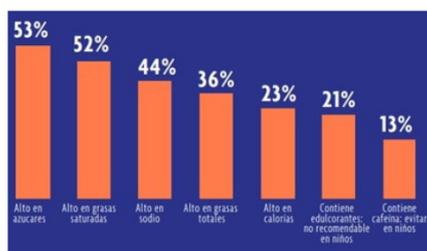
Una consultora monitoreó cómo están impactando en el consumo la aparición de productos con sellos en las góndolas. Conoce las respuestas de los y las argentinas/os.

La consultora privada ShopApp realizó un monitoreo sobre la Ley de Etiquetado con el fin de averiguar cómo están impactando en el consumo la aparición de productos con sellos en las góndolas. Los resultados del estudio online que se realizó a finales de junio e incluyó la opinión de 1.000 consumidores argentinos ponderados por sexo, rango etario y nivel socioeconómico.

Frente a la pregunta "¿Escuchaste hablar de la Ley de Etiquetado Frontal de alimentos?", la mayoría de los entrevistados (75%) respondió que "Sí", mientras que un 25% aseguró que "No". La curva de conocimiento creciente a lo largo del tiempo demuestra que en diciembre 2021 -promulgación de la ley- un 64% estaba informado sobre la medida. En tanto, en febrero de este año, con el inicio de implementación, la cifra de informados llegaba al 70%.

Acerca del conocimiento sobre la Ley de Etiquetado Frontal, los niveles se mantienen similares a los registrados en febrero: solo un 28% declara saber bastante o mucho al respecto. Y, respecto a la frecuencia de lectura de las etiquetas, la cantidad de personas que declaran hacerlo asciende a un 77%, siete puntos más que en el relevamiento conducido en febrero de 2023. Eso podría indicar que la ley tiene un impacto sobre el comportamiento en la búsqueda de información nutricional.

"¿Qué canales utilizas usualmente para informarte sobre nutrición y salud?" Casi la mitad de los encuestados asegura informarse por redes sociales, seguido de medios de comunicación masivos (televisión, radio, diarios, etc), y página y redes del Ministerio de Salud. Hay un grupo (13%) que no busca informarse sobre temas de nutrición y salud.



Sellos que más preocupan

Por otro lado, el nivel de acuerdo con la Ley de Etiquetado cayó rotundamente desde su implementación. El 67% acuerda con la ley, 13 puntos menos que el acuerdo registrado en febrero. Acerca de las razones para estar conforme, casi la mitad de los entrevistados (43%) dijo que "creo que ayuda a conocer mejor lo que comemos". Otro grupo (21%) asegura que "creo que va a obligar a las empresas a vender alimentos más sanos", "creo que incrementa mi libertad como consumidor/a" (19%) y "creo que va a contribuir positivamente a resolver problemas con la obesidad o malnutrición" (16%). En contraposición, la principal razón de rechazo a la ley tiene que ver con dos razones: "No confío en su correcta implementación" (35%) y "No creo que contribuya a corregir problemas como la obesidad o la malnutrición" (34%). En febrero, la principal razón de rechazo a la ley era la preocupación por cómo afectaría a las compañías productoras de alimentos.

### Impacto inicial de los sellos

Otro punto para destacar del informe tiene que ver con la pregunta "¿Qué sentiste al ver por primera vez los productos con sellos negros en el packaging?". El impacto inicial de los sellos es mayoritariamente positivo, alcanzando a 6 de cada 10 consumidores. Más de la mitad de los encuestados aseguró que "me impactó positivamente porque considero que los mismos me proveen más información nutricional". Un cuarto de los entrevistados dijo que les resulta indiferentes y un 13% admitió que el impacto fue negativo.

### Cambios de hábitos desde la implementación

Más de la mitad de los entrevistados aseguraron no haber dejado de consumir o reducir el consumo de alimentos/bebidas por la cantidad de sellos en su empaque. Acerca del tipo de alimentos/bebidas que las personas dejaron de consumir o redujeron su consumo, se encuentra en el primer puesto las Galletitas dulces (55%), seguido de Gaseosas (44%), Mermeladas y untables dulces (32%), Snacks salados (31%), Cereales, granolas, barras de cereal (29%), Aderezos y salsas (28%), Postres, golosinas y chocolates (26%), Alimentos congelados (22%), Jugos (20%), Quesos y fiambres (18%), Panificados y galletas saladas (17%) y, en último puesto, Pastas, arroz, legumbres (12%).

El 33% declara haber cambiado sus hábitos en, al menos, una categoría desde la implementación de la ley. En promedio, el cambio de hábitos afectó a 3,3 categorías por consumidor.

A la hora de reemplazar estos productos, casi la mitad de los entrevistados admitió "elegir un producto de otra marca, pero con menos sellos". Mientras que otros grupos (34% y 22%, respectivamente) dijeron seguir eligiendo la "misma marca, pero con menos sellos" y "dejar de comprar la categoría de producto por los sellos".

Respecto al momento de elegir por sellos, calidad le gana a cantidad. El 56% elige por el contenido de los sellos más que por su cantidad, mientras que el grupo restante (44%) aseguró que se guía por la cantidad de sellos. A su vez, la mayoría de los entrevistados (82%) dijo que, en el marco de un evento social, como un cumpleaños o un viaje con amigos/familia, comería un producto que dejó de consumir por los sellos. El informe describió a estas personas con "actitudes relajadas".

Por último, más de la mitad de los entrevistados (54%) confesó que la ley no cambió su "interés por el aspecto nutricional de los productos". Mientras que los restantes grupos (26% y 20%, respectivamente), admitieron que, "desde que existe la ley, buscan informarse más acerca del aspecto nutricional de alimentos y bebidas" y, en contraposición, "antes de la ley, leía más la información nutricional de los productos".

Fuente: <https://www.ambito.com/informacion-general/ley-etiquetado-el-76-lee-los-octogonos-pero-solo-un-33-cambio-sus-habitos-n5770357>

## **Explicación en el pizarrón**

### **Valor energético de los alimentos.**

Nuestra especie obtiene energía a través de una combinación de alimentos de origen vegetal y animal. Esta energía es utilizada en múltiples procesos. Por ejemplo, en la transmisión de mensajes desde el cerebro a los músculos para desarrollar la actividad muscular, en la regulación de la temperatura basal y en la circulación sanguínea.

Para desarrollar las actividades normales diariamente una persona necesita aproximadamente 2.500 kcal/día. Estos valores están sujetos a modificaciones dependiendo de las actividades particulares que realice la persona.

Un nutriente posee dos características: es un compuesto que interviene en las reacciones metabólicas de un organismo y es captado por este del medio que lo rodea. Desde el punto de vista de la composición, los nutrientes pueden clasificarse en orgánicos (vitaminas, proteínas, hidratos de carbono, grasas) e inorgánicos (agua, minerales, oxígeno). A excepción del oxígeno, todos los nutrientes se obtienen mediante la comida y la bebida. Pero ¿qué hay en lo que las personas comen y beben?

Según las cantidades en las que deben consumirse, los nutrientes se clasifican en macronutrientes y micronutrientes. Mientras el consumo diario de los primeros debe rondar el orden de los gramos, solo se necesitan miligramos de los segundos. El primer grupo se compone de las proteínas, hidratos de carbono y grasas, y constituye la fuente de energía requerida por el metabolismo. Las vitaminas y los minerales integran el segundo grupo y participan de diversas formas en las reacciones metabólicas.

El valor energético o valor calórico de un alimento es proporcional a la cantidad de energía que puede proporcionar al quemarse en presencia de oxígeno. Se mide en calorías, que es la cantidad de calor necesario para aumentar en un grado la temperatura de un gramo de agua.

Cada grupo de nutrientes energéticos –hidratos de carbono, lípidos o proteínas– tiene un valor calórico diferente y más o menos uniforme en cada grupo. Los alimentos ricos en grasa tienen un contenido energético mucho mayor que los formados por hidratos de carbono o proteínas. De hecho, toda la energía que acumulamos en el organismo como reserva a largo plazo se almacena en forma de grasas.

No todos los alimentos que ingerimos se queman para producir energía, sino que una parte de ellos se usa para reconstruir las estructuras del organismo o facilitar las reacciones químicas necesarias para el mantenimiento de la vida. Las vitaminas y los minerales, así como los oligoelementos, el agua y la fibra se considera que no aportan calorías.

**Actividad n° 4: Conozcamos los Macronutrientes.**

Los macronutrientes son la fuente de energía que el cuerpo necesita. Además, pueden tener funciones estructurales y/o participar en la producción de elementos que cumplen con dichas funciones, intervenir en la absorción de otros nutrientes, entre otras.

Con el apoyo de la bibliografía completar el siguiente cuadro.

	Proteína	Hidrato de Carbono	Grasas
Elementos que la forman			
Fuentes de obtención			
Funciones que cumplen en el organismo			
Energía aportada por gramo (en kilocalorías)			
Ejemplo (nombre y formula)			

**Actividad n° 5: Micronutrientes.**

Los micronutrientes son fundamentales para el metabolismo debido a que participan en innumerables reacciones enzimáticas, en la producción de glóbulos rojos, en el mantenimiento de funciones del sistema nervioso, en la producción de anticuerpos, entre otras.

- 1) Para esta actividad necesitaremos conformar seis grupos de no más de cuatro personas. Cada uno deberá investigar y armar una presentación en PowerPoint sobre determinados micronutrientes seleccionados en la siguiente lista.

Grupo 1: tiamina, riboflavina, niacina y ácido pantoténico.

Grupo 2: vitaminas B6, B12, biotina y folacina.

Grupo 3: vitaminas A, D, E, K y C.

Grupo 4: calcio, magnesio, fósforo y cobre.

Grupo 5: sodio, azufre, cromo y potasio.

Grupo 6: flúor, yodo, hierro, selenio y zinc.

- 2) Los puntos a desarrollar son:

- Función.
- Fuente de obtención.
- Formula química, función química o tipo de elemento.
- Trastornos en la salud debido al consumo deficiente de micronutrientes.

- 3) En el caso de las vitaminas, nos encontraremos con la distinción de hidrosoluble o liposolubles. ¿Qué significa que sea una o la otra? Relacionar esta propiedad con la estructura química de los compuestos en cuestión.

### **Actividad n° 6: La ciencia siempre haciendo de las suyas.**

A continuación, te propongo que leas el siguiente texto “*Peras, levaduras, nuestra universidad y la investigación*”. Finalmente completaremos la actividad con consignas de investigación y reflexión.

# Peras, levaduras, nuestra universidad y la investigación.



Comer peras es un buen plan. Comer peras todo el año, uno mucho mejor. ¿Sabías que, en nuestra región, el Alto Valle del Río Negro, se localiza la principal área productora de peras del país? Excelente combinación para los amantes de esta fruta: vivir en el Alto Valle y poder conseguirlas en cualquier momento del año. Sin embargo, hay algo que aclarar. La producción de pera se concentra en determinado periodo, por lo que para asegurar la demanda anual de la misma es necesario conservarla después de su cosecha, almacenándola en frío.

Y así empiezan los problemas. Y claro, también las soluciones.

Durante la conservación de la pera, la fruta queda expuesta a diferentes enfermedades, provocadas por hongos filamentosos. Hay dos grandes "enemigos" que ocasionan que el noble fruto se pudra: El moho azul y el moho gris. Cada uno de estos es producido por dos hongos llamados *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, respectivamente. Para evitarlo, es decir para lograr que la pera no se pudra y se conserve sin enfermedades en las cámaras frigoríficas, lo que se busca es combatir estos hongos. En otras palabras: aniquilarlos.

Históricamente, en este combate, el uso de fungicidas sintéticos ha sido la primera medida de control. No obstante, en este último tiempo se ha reconsiderado su uso, dado que presenta problemas de toxicidad para las personas y el medio ambiente. Dos cosas, que como imaginaran queremos evitar, sobre todo para utilizar en algo que vas a comerte.

Como alternativa a este problema, se utiliza un mecanismo de control llamado control biológico. ¿Qué implica? Consiste en emplear organismos vivos o inactivados, tales como bacterias o levaduras, con el fin de evitar el crecimiento de otros organismos vivos indeseables para el consumo humano. Para lograrlo se deben atravesar pruebas de selección y evaluación de microorganismos que puedan ser utilizados con tal fin.

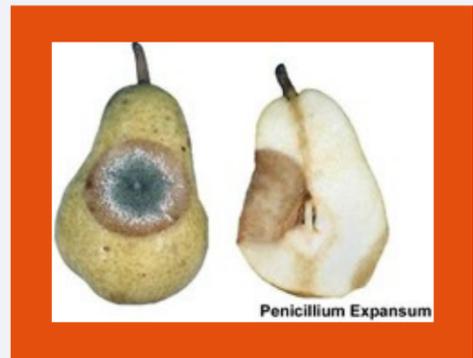
Como verán, el problema no es sencillo. Por eso se necesita gente con conocimiento dispuesta a trabajar en esta alternativa. Por suerte las hay y no es necesario irse muy lejos para encontrarlas.

En nuestra Universidad Nacional del Comahue, en conjunto con el CONICET, se creó el Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN). El mismo viene realizando estudios en esta materia hace algunos años y han logrado, gracias a su investigación, demostrar que el uso del Control Biológico resulta una alternativa efectiva para el control de las podredumbres de postcosecha en la pera de nuestra región.

Dentro del instituto se encuentra el grupo de Biodiversidad y Biotecnología de Levaduras, donde llevan a cabo esta tarea. Coordinado por la Dra. Marcela Paula Sangorrín y conformado por la Dra. Ana Ferrari, Dra. Betina Gramisci, Dra. María Eugenia Rodríguez, Dr. Christian Ariel Lopes y Dra. Florencia Gorordo, entre otras personas. Allí se trabaja en diferentes líneas de investigación vinculadas a las levaduras nativas. Producto de las mismas, han conseguido patentar el desarrollo y la aplicación de dos levaduras nativas como agentes de control biológico en enfermedades de postcosecha de la pera. Este avance sería capaz de ayudar al sector productivo en la conservación de su producto, agregándole valor en los mercados locales e internacionales. Parece una gran oportunidad ¿no?



El trabajo investigativo es arduo y conlleva tiempo, pero avanza a paso firme a través del cumplimiento de distintos objetivos. El principal: desarrollar a largo plazo un producto alternativo de carácter biológico con levaduras nativas que permitan reducir el uso de los fungicidas sintéticos para la utilización en el control de enfermedades de postcosecha de la pera.



## Investigación y reflexión

- 1) ¿Qué es un fungicida?
  - a) ¿Cuáles son los fungicidas que se usan comúnmente en la región del Alto Valle de Río Negro en la producción agrícola?
  - b) Comentar sus efectos sobre la salud y el medio ambiente.
  - c) Escribir sus fórmulas químicas.
  - d) Clasificarlos según su función química.
- 2) ¿A qué se debe la necesidad de desarrollar nuevos conocimientos?
- 3) ¿Por qué son importantes las contribuciones de un grupo de científicos/as? ¿Qué pensás sobre el trabajo en equipo en el ámbito científico?
- 4) En el texto se menciona a varias personas que dedican su vida a la ciencia, entre ellas hay muchas mujeres.
  - a) ¿Podrías mencionar a las científicas que escuchaste nombrar en tu vida?
  - b) Seguramente en el punto anterior, solo hayas logrado nombrar a unas pocas personas. En base a la lectura, y a la respuesta inciso anterior ¿podrías explicar por qué ocurre esto? ¿qué pensás que pudo haber pasado?
- 5) En las imágenes presentes en el texto, hay dos hongos que se busca combatir, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. ¿Te resultan familiares? ¿Dónde, y en qué condiciones pudiste apreciarlos? ¿Conoces otro tipo de hongos?
- 6) Estos trabajos para desarrollar un mecanismo de control biológico apuntan a la producción de fruta orgánica en nuestra región
  - a) ¿Qué significa que un alimento sea orgánico o producido orgánicamente?
  - b) ¿Cómo consideras que la elaboración de alimentos orgánicos afecta su posibilidad de comercialización y exportación?
  - c) ¿Qué beneficios otorgaría al ambiente la producción de alimentos orgánicos?

## VI. Conclusiones

En este capítulo se ha elaborado una propuesta áulica para ser trabajada con estudiantes en el Nivel Secundario en el Área de Ciencias Naturales perteneciente al nuevo Diseño Curricular basada en los experimentos y en los resultados obtenidos de la investigación descrita en los capítulos anteriores. Esta propuesta se basó en utilizar como tema disparador el de las levaduras como agente de control biológico, a fin de profundizar el trabajo de diferentes contenidos de la disciplina. La conclusión principal a la que se puede arribar es que *las levaduras y su aplicación en la conservación de la pera* es un tema sumamente versátil y posibilita el planteo de numerosas actividades sencillas de llevar a cabo en diferentes espacios áulicos. Por otra parte, este tema permite trabajar sobre una amplia gama de contenidos de la química. Asimismo, por la familiaridad de las sustancias utilizadas es una propuesta sencilla y que puede generar gran interés en los estudiantes independientemente de su edad.

## BIBLIOGRAFÍA

Consejo Provincial de Educación, Ministerio de Educación, Provincia de Neuquén (2018).

*Diseño curricular jurisdiccional nivel secundario*. [https://www.neuquen.edu.ar/wp-content/uploads/2019/12/r\\_1463\\_18\\_1\\_parte\\_I.pdf](https://www.neuquen.edu.ar/wp-content/uploads/2019/12/r_1463_18_1_parte_I.pdf)

Fernández, C. L., & Aguado, M. I. (2017). Aprendizaje basado en problemas como complemento de la enseñanza tradicional en Físicoquímica. *Educación química*, 28(3), 154-162.

Furman, M., & De Podestá, M. E. (2009). *La aventura de enseñar Ciencias Naturales*. Buenos Aires, Argentina. Aique.

Gellon, G. (2008). Los experimentos en la escuela la visión de un científico en el aula. *Revista I2ntes*, 24,13-14.

Gellon, G., Feher, E. R., Furman, M., & Golombek, D. (2019). *La ciencia en el aula: lo que nos dice la ciencia sobre cómo enseñarla*. Siglo XXI Editores.

Massarini, A. (2011). El enfoque CTS para la enseñanza de las ciencias: una clave para la democratización del conocimiento científico y tecnológico. *La Revista del Plan Fénix*, 2(8), 14-18.

Monereo Font, C., & Pozo Muncio, J. I. (2001). *¿En qué siglo vive la escuela?: el reto de la nueva cultura educativa*. Cuadernos de pedagogía.

Sanmartí, N. (2002). *Didáctica de las ciencias en la educación secundaria obligatoria*. Madrid, España. Síntesis educación.

Villalobos Delgado, V., Ávila Palet, J. E., & Olivares, S. L. (2016). Aprendizaje basado en problemas en química y el pensamiento crítico en secundaria. *Revista mexicana de investigación educativa*, 21(69), 557-581.

Zabala, A. (1999). *Enfoque globalizador y pensamiento complejo: una respuesta para la comprensión e intervención en la realidad* (Vol. 139). Graó.

Zabala, A., & Arnau, L. (2007). *11 ideas clave. Cómo aprender y enseñar competencias* (Vol. 3). Graó. Barcelona. España.