

RECOLECCIÓN DE ESPORAS CON LÍQUIDO HIDROFÓBICO Y USO

CORRESPONDIENTE DE LAS ESPORAS RECOLECTADAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. número de serie 63/399.445, presentada el 19 de agosto de 2022, que se incorpora en la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se dirige a un método para recolectar esporas al poner en contacto las esporas con un líquido hidrofóbico, tal como aceite. La presente descripción se dirige además a materiales cementosos que incluyen las esporas recolectadas.

ANTECEDENTES

Las esporas, tales como aquellas producidas por hongos, se recolectan convencionalmente de los respectivos microorganismos mediante técnicas que incluyen combinar los microorganismos y las esporas con agua. El contacto de las

esporas con el agua es un factor que puede, al menos parcialmente, desencadenar una germinación prematura de las esporas y/o activar algunas enzimas en las esporas.

Dado que el uso de agua por sí sola puede resultar inefectiva, otros esfuerzos convencionales incluyen añadir un surfactante al agua. Los surfactantes, debido a sus actividades superficiales, pueden debilitar la cubierta y/o la membrana plasmática de las esporas. Estos efectos pueden reducir la estabilidad de almacenamiento a largo plazo y la capacidad de germinación de las esporas. Incluso las técnicas que se basan en surfactantes tienden a recolectar porcentajes relativamente más bajos del total de esporas generadas en un sistema de producción.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de un método mejorado de recolección de esporas.

SUMARIO

En un aspecto, un método para recolectar esporas fúngicas comprende las etapas de producir esporas fúngicas mediante células fúngicas dentro de un cultivo fúngico; combinar un líquido hidrofóbico con el cultivo fúngico; mezclar el cultivo fúngico después de la etapa de combinar el líquido hidrofóbico con el cultivo fúngico, para liberar

de esta manera al menos una porción de las esporas fúngicas como esporas fúngicas liberadas que se liberan de las células fúngicas, donde las esporas fúngicas liberadas se dividen dentro de al menos una porción del líquido hidrofóbico; recolectar la al menos una porción del líquido hidrofóbico que incluye las esporas fúngicas liberadas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Al menos ciertos esfuerzos convencionales para recolectar esporas fúngicas a partir de células fúngicas/micelios productores de esporas incluyen el uso de agua, que puede incluir la adición de un surfactante al agua. Aspectos de la presente descripción se dirigen a métodos mejorados para recolectar esporas fúngicas que incluyen combinar o poner en contacto las esporas con un líquido hidrofóbico.

La superficie de las esporas fúngicas es de naturaleza hidrofóbica. Con esta propiedad hidrofóbica, cuando se combinan con agua, las esporas fúngicas son difíciles de separar de sus micelios correspondientes, por lo tanto, dificulta la recolección de las esporas del agua. Como resultado, los intentos convencionales de recolectar esporas con agua requieren el uso de volúmenes relativamente grandes

de agua y, no obstante, todavía resultan en bajas concentraciones de esporas recolectadas. Además, el contacto de las esporas con el agua y, si están presentes, con los surfactantes durante la recolección puede desencadenar una o más germinaciones de esporas no deseadas, activación inicial no deseada, y efectos negativos en las propiedades de las esporas.

Uno o más aspectos de la presente descripción incluyen recolectar esporas fúngicas utilizando un líquido hidrofóbico. Es decir, se puede combinar un líquido hidrofóbico con un material que incluya las esporas fúngicas, lo que también se puede denominar poner en contacto las esporas fúngicas con el líquido hidrofóbico. Como se analiza además en la presente descripción, los líquidos hidrofóbicos adecuados incluyen varios aceites y, por lo tanto, el método de recolección descrito en la presente se puede denominar recolección de esporas fúngicas con aceite o se puede denominar método de recolección a base de aceite.

Se espera que la recolección de esporas fúngicas a través del líquido hidrofóbico mejore la estabilidad de las esporas fúngicas frente a condiciones ambientales más duras en relación con las esporas fúngicas que se recolectan con agua y un surfactante. La recolección con el líquido hidrofóbico también mejora la estabilidad en almacenamiento

de las esporas fúngicas en relación con las esporas fúngicas que se recolectan con agua y un surfactante. Aun más, se espera que el líquido hidrofóbico permita que las esporas se separen mejor de los micelios/células fúngicas productoras y de cualquier fase acuosa que pueda estar presente. Además, no se espera que el líquido hidrofóbico sea perjudicial para las esporas fúngicas y las células fúngicas correspondientes. Generalmente se cree que estos y/u otros beneficios resultantes de recolectar esporas con el líquido hidrofóbico surgen de evitar o minimizar el contacto de las esporas con agua, se cree que dicho contacto con agua debilita las esporas.

Las esporas fúngicas generalmente son producidas por células fúngicas/micelios dentro de un cultivo, al que se puede hacer referencia como un medio de cultivo. En uno o más aspectos, el cultivo comprende hongos, por lo tanto, dicho cultivo se puede denominar un cultivo fúngico. El cultivo incluirá inicialmente un sustrato, que se puede denominar alimento principal o fuente de carbono, para el consumo de las células fúngicas para el crecimiento de las células fúngicas y/o la esporulación de las esporas fúngicas. Asimismo, cuando no se consume todo el sustrato, un cultivo posterior podría incluir sustrato residual. El cultivo incluirá además las esporas fúngicas producidas hasta que se

recolecten las esporas fúngicas producidas. El sustrato ilustrativo, que se puede denominar sustrato sólido, incluye soja, arroz, cebada, trigo, maíz, otros granos, coco, frijoles, otra biomasa agrícola y mezclas. El sustrato puede ser una o más cáscaras, cascarillas, o vainas de estos materiales, incluidas las piezas de estos.

Como se mencionó anteriormente, la superficie de las esporas fúngicas es de naturaleza hidrofóbica. En relación con la evolución y supervivencia de los microorganismos, esta propiedad hidrofóbica permite que las esporas abandonen los sistemas acuosos naturales donde generalmente crecerán las células fúngicas. Por lo tanto, las esporas que abandonan estos sistemas acuosos naturales pueden ser transportadas por el viento para su dispersión a nuevos hábitats. Al contrario de los sistemas acuosos basados en la naturaleza, que tienden a extenderse y germinar, el uso del líquido hidrofóbico de la presente descripción facilita la recolección de las esporas y, además, protege de una germinación temprana no deseada. Dicho de otra manera, los métodos de la presente descripción ayudan a proteger y retrasar la germinación de las esporas recolectadas para un momento posterior.

En relación con los aspectos de la presente descripción, esta propiedad hidrofóbica permite que las

esporas se recolectan fácil y efectivamente de las células/micelios productores mediante combinación con el líquido hidrofóbico. Uno o más aspectos incluyen combinar el líquido hidrofóbico con células/micelios. Esto puede incluir primero separar las células/micelios que contienen esporas de un cultivo general. Otros aspectos incluyen una etapa de combinar el líquido hidrofóbico con un cultivo general que incluye las esporas. El cultivo global comprende generalmente esporas fúngicas y opcionalmente cualquier sustrato residual, células fúngicas/micelios residuales y/o líquidos residuales. Uno o más aspectos incluyen un método que carece de una etapa de separar las esporas de las células/micelios antes de la etapa de combinar el líquido hidrofóbico con las esporas.

Si bien en la presente descripción se hace referencia a recolectar las esporas sin utilizar agua, en uno o más aspectos, el cultivo fúngico se puede cultivar en un medio acuoso. En estos aspectos, la una o más etapas particulares relacionadas con la recolección de las esporas generalmente no incluirán la adición de más agua. Es decir, el líquido hidrofóbico (p. ej., aceite) se podría añadir al medio acuoso para recolectar las esporas de este. Para cultivos cultivados en un medio acuoso, se puede usar un tanque de agitación para recibir el medio acuoso y el líquido

hidrofóbico se puede añadir directamente al tanque de agitación.

En otros aspectos, el cultivo fúngico se puede cultivar en un sustrato sólido húmedo mediante fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés). Nuevamente, la una o más etapas particulares relacionadas con la recolección de las esporas generalmente no incluirán la adición de más agua. En estos aspectos, el líquido hidrofóbico se podría añadir a un lecho de sustrato sólido de SSF (es decir, a un recipiente de SSF) para la recolección de esporas de este.

Otros aspectos podrían incluir la producción continua de esporas, tal como con un transportador y/o un horno giratorio. En estos aspectos, la recolección de las esporas con el líquido hidrofóbico puede ser continua o semicontinua.

Para estos u otros posibles métodos adecuados para producir las esporas, la recolección de las esporas con el líquido hidrofóbico ofrece una variedad de ventajas. Es decir, ahora se entiende que el método de recolección de esporas puede afectar a las propiedades de las esporas recolectadas. Es deseable mejorar las propiedades de las esporas recolectadas ya que las aplicaciones finales de las esporas recolectadas pueden depender de la capacidad de las esporas para germinar en células vivas después de permanecer

estables durante períodos de tiempo mientras resisten y/o toleran factores ambientales tales como uno o más de sequedad, humedad, temperatura alta, temperatura baja, pH alto y salinidad.

Los métodos de recolección descritos en la presente, con la etapa de combinar el líquido hidrofóbico con las esporas, y sin agua o con una cantidad mínima de agua utilizada para la etapa de recolección en sí, mejoran la estabilidad de las esporas recolectadas frente a condiciones ambientales más duras en relación con las esporas fúngicas que se recolectan con agua y un surfactante. Esto proporciona a las esporas recolectadas una estabilidad de almacenamiento adecuada para la vida útil del producto. Además, esto proporciona a las esporas recolectadas la capacidad de tolerar las condiciones que pueden ocurrir durante la formulación e implementación.

Como se sugirió anteriormente, el líquido que se combina con las esporas para la recolección de estas debería ser generalmente hidrofóbico. La superficie hidrofóbica de las esporas fúngicas permite una mejor recolección con el líquido hidrofóbico. El líquido hidrofóbico sirve además para prevenir o minimizar el contacto de esporas y células con cualquier fase acuosa, incluso para aplicaciones finales posteriores de las esporas. El líquido hidrofóbico puede

servir además como un líquido portador para permitir la carga de las esporas en un sustrato poroso para usar dentro de un material cementoso, como se describe con más detalle en la presente. Además, el líquido hidrofóbico también puede servir para que sea consumible por las células fúngicas para apoyar el crecimiento y la biomineralización de las células fúngicas, tal como después de que las esporas hayan germinado dentro de un material cementoso agrietado (p. ej., hormigón, mortero).

Para el líquido hidrofóbico se pueden usar muchas sustancias y mezclas adecuadas. Los materiales ilustrativos para el líquido hidrofóbico incluyen aceites, ácidos grasos libres y grasas fundidas. Estos incluyen soluciones y mezclas de estas. El experto también entenderá que el término aceite, como se usa en la presente descripción, se puede referir a composiciones que tienen una variedad de constituyentes químicos. Los aceites ilustrativos incluyen aceite de frijol de soya, aceite de palma, aceite de semilla de colza, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuate, aceite de cártamo, aceite mineral, aceite de parafina, hidrocarburos líquidos y sus mezclas con longitudes de cadena de aproximadamente C10 a aproximadamente C25, y aceite de silicona. Los ácidos grasos libres ilustrativos

incluyen ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico y ácido linolénico. Los ácidos grasos libres ilustrativos también se pueden denominar ácidos grasos de cadena larga, que generalmente se refiere a longitudes de cadena de aproximadamente C10 a aproximadamente C25. Otros líquidos hidrofóbicos adecuados incluyen líquidos hidrofóbicos sintéticos, derivados de petróleo y de origen animal. Aun otros líquidos hidrofóbicos adecuados incluyen otros lípidos y compuestos solubles en aceite o compatibles con aceites tales como alcoholes grasos, éteres, ésteres, glicolípidos y lipopéptidos. Otros materiales más adecuados incluyen monoglicéridos y diglicéridos.

Otros materiales adecuados para el líquido hidrofóbico incluyen aquellos compuestos con un grupo funcional, donde el compuesto con el grupo funcional proporciona una solubilidad en agua suficientemente baja. Los grupos funcionales ilustrativos incluyen alcohol, aldehído, éster, amina y amida. La solubilidad en agua suficientemente baja puede ser generalmente menor que 1 g/l, tal como en condiciones ambientales. Aun otros líquidos hidrofóbicos adecuados incluyen aquellos compuestos que tienen un grupo funcional ácido carboxílico (-COOH).

El material para el líquido hidrofóbico se puede elegir dependiendo de la aplicación final deseada. Por ejemplo,

se pueden elegir uno o más aceites determinados basados en que también sean consumibles por el microorganismo como un nutriente o en que tengan un punto de fusión adecuado. Además, uno o más ácidos grasos libres pueden formar sales insolubles con álcalis y alcalinos, lo que tendría ventajas cuando las esporas recolectadas se utilicen dentro de un material cementoso, tal como neutralizar localmente el pH alto y minimizar el daño a las esporas. Cualquier formación de sales insolubles con álcalis y alcalinos, lo que también se puede denominar saponificación, también se debe equilibrar con las propiedades del material cementoso. Como se sugirió anteriormente, se podrían utilizar mezclas de uno o más aceites, uno o más ácidos grasos libres y/o una o más grasas fundidas para lograr más de uno de estos beneficios particulares.

En uno o más aspectos, el líquido hidrofóbico tiene una hidrofobicidad que es similar o sustancialmente similar a la hidrofobicidad superficial de las esporas fúngicas. Esta similitud en la hidrofobicidad puede servir generalmente para maximizar la compatibilidad de las esporas con el líquido hidrofóbico. Es decir, esta similitud en la hidrofobicidad generalmente maximiza la dispersión y adherencia del líquido hidrofóbico sobre la superficie de las esporas y la dispersión de las esporas en el líquido hidrofóbico. En consecuencia, esto

mejora la efectividad en la recolección de esporas. Esta similitud en la hidrofobicidad puede servir además para minimizar la cantidad de líquido hidrofóbico necesaria para recolectar una fracción deseada (p. ej., 90 %) de las esporas con respecto a todas las esporas presentes en un cultivo fúngico. Esta similitud en la hidrofobicidad puede servir además para minimizar el tiempo y/o la fuerza de cizallamiento/mecánica utilizada para la recolección de esporas. En uno o más aspectos, la similitud en hidrofobicidad se basa en la temperatura ambiente o ambiental (p. ej., 20 °C a 22 °C), aunque la similitud en hidrofobicidad también se puede adaptar para diferentes temperaturas.

Después de combinar las esporas con el líquido hidrofóbico, las esporas se pueden recolectar en una etapa de recolección posterior.

En relación con los aspectos de una etapa de recolección, las esporas fúngicas son generalmente más densas que el líquido hidrofóbico (p. ej., aceite). Como un resultado, si una suspensión que incluye las esporas y el líquido hidrofóbico se mantiene quieta durante un período suficiente, generalmente todas las esporas eventualmente se depositarán en el fondo debido a las diferentes densidades y gravedad. Esto dejaría una capa líquida hidrofóbica encima de una capa inferior que incluye las esporas. La capa inferior,

incluidas las esporas depositadas, se puede recolectar del fondo. El tiempo que tardan determinadas esporas en asentarse puede variar y, por lo tanto, se podrían utilizar otras etapas. Las esporas fúngicas también son generalmente más densas que el agua, así como una combinación de líquido hidrofóbico y agua, y esta sedimentación también se puede utilizar para suspensiones que incluyen agua además de esporas y líquido hidrofóbico.

En uno o más aspectos de la presente descripción, las esporas se podrían recolectar con la fase líquida hidrofóbica (p. ej., aceite) antes de que las esporas se asienten completamente en el fondo de la fase líquida hidrofóbica debido a la diferencia de densidad. Esta recolección antes de la sedimentación completa podría permitir una recolección relativamente más rápida de las esporas. Además, un producto recolectado que incluye aceite y esporas puede tener aplicaciones finales ventajosas.

En uno o más aspectos de la presente descripción, se puede mezclar un medio que incluye las esporas y el líquido hidrofóbico antes de una etapa específica de permitir que las esporas se sedimenten. Los ejemplos de técnicas de mezclado incluyen agitación, agitación en vórtex o mezclado con paletas. El tiempo y la fuerza de mezclado deben ser suficientes para liberar una cantidad deseada de esporas para

su recolección, evitando al mismo tiempo, generalmente, dañar las esporas.

Los detalles particulares de mezclar un medio que incluye las esporas y el líquido hidrofóbico, y posteriormente recolectar las esporas, pueden depender de cómo se producen las esporas.

Como se mencionó anteriormente, en uno o más aspectos, el cultivo fúngico se puede cultivar en un medio acuoso. Para estos aspectos, después de añadir el líquido hidrofóbico al medio acuoso, se puede usar la mezcla para crear cizallamiento para liberar las esporas de las células/micelios, que resulta de esta manera en esporas fúngicas liberadas. Las esporas fúngicas liberadas generalmente se dividirán en la fase del líquido hidrofóbico, que se puede denominar fase oleosa. Una vez que se detiene la mezcla, la mezcla generalmente se separa en dos fases líquidas: una fase superior de aceite más ligero que contiene esporas y una fase inferior de agua que contiene otra biomasa y sustrato hidrofílico. Después, se puede recolectar la fase superior de la suspensión de esporas en el líquido hidrofóbico.

Como se mencionó anteriormente, otros aspectos incluyen que el cultivo fúngico se cultive sobre un sustrato sólido húmedo mediante fermentación en estado sólido (SSF).

Para estos aspectos, después de añadir el líquido hidrofóbico al sustrato sólido mediante SSF, se puede usar la mezcla para crear cizallamiento para liberar las esporas de las células/micelios, que resulta de esta manera en esporas fúngicas liberadas. Las esporas fúngicas liberadas generalmente se dividirán en la fase oleosa. Una vez que se detiene la mezcla, se pueden eliminar los sólidos más grandes y no hidrofóbicos (es decir, el sustrato y la biomasa restantes). Esta eliminación se puede realizar mediante filtración (p. ej., malla de cribado) o permitiendo que estos materiales se sedimenten en el fondo. Cuando se permite que estos materiales se depositen en el fondo, puede ocurrir una primera recolección de estos materiales más grandes sin recolectar muchas esporas liberadas. Las esporas serán más pequeñas que estos materiales más grandes y, por lo tanto, se sedimentarán mucho más lentamente que las partes más grandes de sustrato y biomasa restantes. Entonces puede tener lugar una segunda recolección para la fase oleosa que contiene las esporas fúngicas liberadas. Algunas partículas más pequeñas de la celda y los restos del sustrato pueden permanecer en la fase de aceite recolectada, lo que puede ser tolerable para ciertas aplicaciones finales. En otros aspectos, estas partículas más pequeñas de restos celulares y de sustrato se podrían separar más de las esporas fúngicas liberadas.

Después de la recolección de un producto que incluye esporas (p. ej., esporas fúngicas liberadas) dentro de un líquido hidrofóbico, el producto recolectado se puede concentrar más en relación con la concentración de esporas. Esto puede incluir permitir que las esporas del producto recolectado se depositen más en el fondo, lo que se puede denominar dejar reposar el producto recolectado. La etapa de sedimentación puede ocurrir en una condición no mezclada, que también se puede denominar la etapa de permitir que las esporas del producto recolectado se sedimenten después de la etapa de mezcla. Entonces, después de la etapa de permitir que las esporas se sedimenten, se puede recolectar o eliminar la capa superior de líquido hidrofóbico de la que se habían sedimentado las esporas, el líquido superior, al que se puede hacer referencia como aceite aclarado. Esto produce de esta manera un líquido inferior restante que se concentra más con las esporas fúngicas liberadas en relación con el producto recolectado original. A continuación se puede recolectar el líquido inferior restante, que se concentra más con las esporas fúngicas liberadas. La utilización del sedimento y la cantidad de sedimento que se usará pueden depender de la concentración deseada para una suspensión de esporas en relación con la aplicación prevista para el producto.

En comparación con las técnicas de recolección que utilizan agua, la sedimentación de las esporas después de la recolección con un líquido hidrofóbico se producirá relativamente más rápido, lo que también se puede denominar sedimentación rápida de las esporas. Las esporas se sedimentarán más rápido en el aceite que en el agua, por dos razones principales: diferencia de densidad e hidrofobicidad.

En el caso del agua que contiene esporas, muchas esporas flotarían en la superficie superior (es decir, en la interfaz aire-agua) debido a la hidrofobicidad. Además, las esporas en el agua se sedimentarían lentamente debido a una menor diferencia de densidad, ya que la densidad de las esporas no es mucho mayor que la densidad del agua de aproximadamente 1 g/cm^3 . Por el contrario, para el aceite que contiene esporas, las esporas generalmente no permanecerán flotando en la superficie superior y la diferencia de densidad entre las esporas y el aceite será mayor, ya que la densidad del aceite es de aproximadamente $0,9 \text{ g/cm}^3$.

Con respecto a las especies de células fúngicas y esporas fúngicas que se usarán en aspectos de la presente descripción, las especies de células fúngicas y esporas fúngicas se pueden seleccionar y elegir en relación con las características de la presente descripción. Es decir, las especies para las células fúngicas y las esporas fúngicas se

pueden cribar y elegir en relación con mejorar la recolección de estas mediante combinación con un líquido hidrofóbico. La idoneidad de ciertas células fúngicas y esporas fúngicas también se puede elegir basado en una aplicación final, tal como cuando las esporas recolectadas se van a utilizar dentro de un material cementoso para la autorreparación de este.

En aspectos de la descripción, las especies adecuadas para las esporas fúngicas incluyen hongos alcalofílicos y/o alcalotolerantes. En aspectos de la descripción, las especies adecuadas para los microorganismos y esporas fúngicas incluyen *Scopulariopsis brevicaulis*, *Purpureocillium lilacinum*, *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus nidulans*, y combinaciones de estas. Con referencia a la Colección de cultivos del USDA-ARS (NRRL), los ejemplos incluyen *Aspergillus nidulans* NRRL 187, *Scopulariopsis brevicaulis* NRRL 1100, *Myrothecium verrucaria* NRRL 2003, y *Purpureocillium lilacinum* NRRL 895.

La concentración de las esporas en el producto recolectado, al que se puede hacer referencia como una suspensión de aceite concentrada, será relativamente alta. La concentración de esporas en un producto recolectado, antes de cualquier etapa específica de sedimentación, puede ser de aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ esporas/ml a 10×10^{11} esporas/ml, o aproximadamente 5×10^{10} esporas/ml a 5×10^{11} esporas/ml, o

aproximadamente $1,5 \times 10^{10}$ esporas/ml a 8×10^{10} esporas/ml, o aproximadamente 1×10^{11} esporas/ml a 6×10^{11} esporas/ml, o aproximadamente 2×10^{11} esporas/ml a 5×10^{11} esporas/ml.

La concentración de esporas en un producto concentrado adicional, es decir, después de una etapa específica de sedimentación, puede ser aproximadamente 2 veces, o aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 5 veces, o aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 20 veces, la concentración antes de la etapa de sedimentación. En uno o más aspectos, la concentración de esporas en un producto concentrado adicional, es decir, después de una etapa específica de sedimentación, puede ser al menos 2 veces, o al menos 3 veces, o al menos 5 veces, o al menos 10 veces, o al menos 15 veces, la concentración antes de la etapa de sedimentación.

La combinación del líquido hidrofóbico con las esporas puede ocurrir un tiempo relativamente corto después de que las células fúngicas produzcan las esporas. Este tiempo para combinar el líquido hidrofóbico con las esporas también se puede caracterizar con respecto al momento en que las células fúngicas se añaden a un recipiente para la producción de las esporas. En uno o más aspectos, la combinación del líquido hidrofóbico con las esporas fúngicas se produce menos de aproximadamente 5 horas, o menos de aproximadamente 2 horas, o

menos de aproximadamente 1 hora, o menos de aproximadamente 30 minutos, después de que se produzcan las esporas fúngicas. En uno o más aspectos, la combinación del líquido hidrofóbico con las esporas fúngicas ocurre menos de aproximadamente 5 horas, o menos de aproximadamente 2 horas, o menos de aproximadamente 1 hora, o menos de aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, después de que las células fúngicas se añaden a un recipiente de producción.

En uno o más aspectos, una etapa de mezcla se produce durante menos de aproximadamente 2 horas, o menos de aproximadamente 1 hora, o menos de aproximadamente 30 minutos. En uno o más aspectos, la mezcla se produce durante de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos. La mezcla puede utilizar agitación/cizallamiento constante.

En uno o más aspectos, una etapa de sedimentación se produce durante menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos. En uno o más aspectos, la sedimentación se produce durante de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 15 minutos.

En uno o más aspectos, la etapa de recolección de esporas fúngicas incluye recolectar esencialmente todas las esporas fúngicas que se producen. En uno o más aspectos, recolectar las esporas fúngicas incluye recolectar al menos 80 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, de las esporas fúngicas que se producen. En uno o más aspectos, recolectar las esporas fúngicas incluye recolectar aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de las esporas fúngicas que se producen. Como se mencionó anteriormente, se puede utilizar una cierta cantidad objetivo de recolección en relación con otros factores, tales como la cantidad de aceite que se utiliza.

Como se mencionó anteriormente, una aplicación final adecuada para las esporas recolectadas es dentro de un material cementoso. Una composición para un material cementoso generalmente comprende un aglutinante (p. ej., cemento), agregado, agua y opcionalmente otros aditivos deseables, generalmente conocidos por el experto. Los materiales cementosos, tales como hormigón, revestimientos cementosos, y mortero, tienden a sufrir grietas, grietas que pueden provocar una variedad de efectos indeseables. Al incorporar las esporas recolectadas en un material cementoso, las esporas proporcionarán la capacidad de

autorreparación al material cementoso. Los materiales cementosos que comprenden las esporas recolectadas serán capaces de contrarrestar una grieta mediante biomineralización, específicamente iniciando la germinación de las esporas, después logrando el crecimiento vegetativo de las células fúngicas resultantes de la germinación, después relleno de la grieta con materiales sólidos resultantes del crecimiento vegetativo.

Como se mencionó anteriormente, en aspectos de la descripción, las esporas recolectadas se pueden mantener con una porción del líquido hidrofóbico. Esta porción del líquido hidrofóbico generalmente puede servir como una capa protectora para proteger las esporas fúngicas de condiciones adversas, lo que se puede denominar protección química.

Las esporas recolectadas, que pueden ser las esporas recubiertas, se pueden después impregnar o incorporar dentro de un material portador. El material portador debe ser poroso para poder impregnar o incorporar las esporas en este. Esta inclusión de las esporas recolectadas dentro del soporte sirve como una forma de protección física de las esporas. El material portador puede recibir las esporas dentro de poros en este y/o dentro de poros en la superficie. En uno o más aspectos, el material portador poroso es una pluralidad de partículas porosas. Es decir, se puede dispersar una

pluralidad de partículas porosas dentro del material cementoso. Cada una de la pluralidad de partículas porosas incluiría generalmente esporas para reparar grietas en una variedad de ubicaciones de la pluralidad de partículas porosas.

Los materiales portadores porosos ilustrativos incluyen espumas. Las espumas adecuadas incluirán generalmente células abiertas. Una espuma ilustrativa es poliuretano. Otros materiales ilustrativos para espumas incluyen poliésteres y poliamidas. Otros materiales ilustrativos para espumas incluyen EPDM (terpolímero de etileno propileno dieno), PVC/nitrilo (mezcla de cloruro de polivinilo y caucho de nitrilo), cerámica y metal (tal como aluminio y níquel). El experto en la técnica también puede conocer generalmente otras espumas adecuadas que tienen suficiente absorción y resistencia.

Cuando un material portador poroso es espuma, la espuma puede incluir cemento incorporado dentro y/o sobre el material portador poroso. Esto puede incluir infundir, que también se puede denominar impregnación o incorporación, el componente cementoso en el material portador poroso en la forma de una suspensión de cemento húmeda.

Además de las espumas, otros materiales ilustrativos para el material portador poroso incluyen arcilla expandida, celita, perlita, y vidrio expandido.

El material portador poroso que comprende las esporas también se puede proteger de condiciones adversas mediante una capa protectora sobre este. El recubrimiento protector puede incluir uno o más ácidos grasos libres. El recubrimiento protector puede incluir otras sustancias adecuadas tales como uno o más aceites.

Como se mencionó anteriormente, el método de recolección descrito en la presente puede proporcionar esporas recolectadas que tienen propiedades mejoradas en relación con las esporas fúngicas que se recolectan con agua y un surfactante. Esto puede permitir tiempos de almacenamiento más prolongados para las esporas recolectadas, cuando se desee, en relación con las esporas que se recolectan con agua y un surfactante. En uno o más aspectos, una etapa de utilización de esporas recolectadas como un producto final ocurre de aproximadamente 1 mes a 2 años, o de aproximadamente 2 meses a 1 año, o de aproximadamente 4 meses a 10 meses, después de una etapa de combinar el líquido hidrofóbico con las esporas. En otros aspectos, las esporas recolectadas se pueden utilizar antes, tal como menos de 1 mes, o menos de 2 semanas, o menos de 1

semana, después de una etapa de combinar el líquido hidrofóbico con las esporas.

Además de los aspectos relacionados con la utilización de las esporas recolectadas dentro de un material cementoso tal como el concreto, otras aplicaciones incluyen aplicaciones foliares de esporas biopesticidas. Se espera ventajosamente que las suspensiones de aceite recolectadas que incluyen esporas se adhieran a superficies hidrofóbicas de plantas (p. ej., hojas) y superficies hidrofóbicas de insectos/plagas (p. ej., capa exterior cerosa) para usar como biopesticida.

Como se sugirió anteriormente, uno o más aspectos de la presente descripción incluyen un método que carece, o sustancialmente carece, de añadir una solución acuosa (p. ej., agua destilada/refinada estéril) para recolectar esporas fúngicas. Como se sugirió anteriormente, uno o más aspectos incluyen un método que carece, o sustancialmente carece, de añadir un surfactante (p. ej., Tween 20, Tween 80 y Triton X-100) para recolectar esporas fúngicas.

Como se sugiere en la presente descripción, si bien los aspectos pueden incluir el almacenamiento de las esporas que se recolectan con el líquido hidrofóbico, se debe apreciar que las técnicas de recolección descritas en la presente son generalmente distintas de combinar un líquido

hidrofóbico con esporas ya recolectadas para almacenar, formular y/o aplicar las esporas que ya se han recolectado. Es decir, uno o más aspectos incluyen un método que carece de una etapa específica de recolectar las propias esporas antes de combinarlas con el líquido hidrofóbico.

Uno o más aspectos de la presente descripción incluyen un método donde las esporas fúngicas nunca están en forma de polvo. Uno o más aspectos de la presente descripción incluyen un método donde la etapa de recolección se produce en un mismo recipiente que la combinación de las esporas y el líquido hidrofóbico. Uno o más aspectos de la presente descripción incluyen un método donde la etapa de recolección se produce en un recipiente diferente al de donde se produce la combinación de las esporas y el líquido hidrofóbico.

Si bien aspectos de la descripción se analizan anteriormente, en la presente descripción se proporcionan ciertos aspectos ilustrativos.

Aspecto 1. Un método para recolectar esporas fúngicas, el método que comprende las etapas de producir esporas fúngicas mediante células fúngicas dentro de un cultivo fúngico; combinar un líquido hidrofóbico con el cultivo fúngico; mezclar el cultivo fúngico después de la etapa de combinar el líquido hidrofóbico con el cultivo fúngico, para liberar de esta manera al menos una porción de

las esporas fúngicas como esporas fúngicas liberadas que se liberan de las células fúngicas, donde las esporas fúngicas liberadas se dividen dentro de al menos una porción del líquido hidrofóbico; y recolectar la al menos una porción del líquido hidrofóbico que incluye las esporas fúngicas liberadas.

Aspecto 2. El método del Aspecto 1, donde las esporas fúngicas y células fúngicas son de una especie seleccionada de *Scopulariopsis brevicaulis*, *Purpureocillium lilacinum*, *Myrothecium verrucaria*, *Aspergillus nidulans*, y combinaciones de estos.

Aspecto 3. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, en donde el cultivo fúngico comprende además un sustrato sólido residual que queda de la etapa de producción de las esporas fúngicas.

Aspecto 4. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, en donde el método carece de una etapa para recolectar las esporas fúngicas antes de la etapa de combinar el líquido hidrofóbico con el cultivo fúngico.

Aspecto 5. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el líquido hidrofóbico comprende un aceite, o un ácido graso libre, o una combinación de estos.

Aspecto 6. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el líquido hidrofóbico comprende un aceite

seleccionado de aceite de frijol de soya, aceite de palma, aceite de semilla de colza, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite mineral, aceite de parafina, aceite de silicona, y mezclas de estos.

Aspecto 7. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el líquido hidrofóbico comprende un ácido graso libre seleccionado de ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, y mezclas de estos.

Aspecto 8. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el cultivo fúngico se realiza dentro de un medio acuoso.

Aspecto 9. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el cultivo fúngico se cultiva en un sustrato sólido húmedo en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF).

Aspecto 10. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende además las etapas de concentrar adicionalmente las esporas fúngicas liberadas permitiendo que las esporas fúngicas liberadas se asienten en una condición no mezclada, y recolectar una capa superior de líquido hidrofóbico a partir de la cual se asientan las

esporas fúngicas liberadas, produciendo de esta manera un líquido inferior restante que se concentra más en relación con las esporas fúngicas liberadas.

Aspecto 11. El método del Aspecto 10, que comprende además una etapa de recolectar el líquido inferior restante que se concentra más en relación con las esporas fúngicas liberadas.

Aspecto 12. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde la etapa de combinar el líquido hidrofóbico con el cultivo fúngico carece sustancialmente de añadir un medio acuoso, añadir un surfactante, y añadir un emulsionante.

Aspecto 13. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el líquido hidrofóbico tiene una hidrofobicidad sustancialmente similar a una hidrofobicidad superficial de las esporas fúngicas a temperatura ambiente de 20 °C a 22 °C.

Aspecto 14. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde las esporas fúngicas liberadas tienen estabilidad mejorada en relación con las esporas fúngicas que se recolectan con agua y un surfactante.

Aspecto 15. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde la etapa de recolección incluye

recolectar al menos 95 % de las esporas fúngicas producidas en la etapa de producción.

Aspecto 16. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, donde la etapa de mezclar comprende agitar o agitar en vórtex.

Aspecto 17. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende además una etapa de combinar las esporas fúngicas liberadas de la etapa de recolección con un material cementoso.

Aspecto 18. El método de cualquiera de los aspectos anteriores, que comprende además una etapa de combinar la al menos una porción del líquido hidrofóbico de la etapa de recolección con un material cementoso.

Aspecto 19. El método de cualquiera de los Aspectos 1 a 16, que comprende además una etapa de aplicar la al menos una porción del líquido hidrofóbico que incluye las esporas fúngicas liberadas de la etapa de recolección a una planta como un biopesticida.

A la luz de lo anterior, se debe apreciar que la presente invención avanza la técnica al proporcionar un método mejorado de recolección de esporas. Si bien en la presente descripción se han descrito en detalle aspectos particulares de la invención, se debe apreciar que la invención no se limita a estos, en la medida en que los expertos en la técnica

apreciarán fácilmente las variaciones de la presente invención. El alcance de la invención se apreciará a partir de las reivindicaciones que siguen.

Ejemplos

Control 1: Recolección con surfactante

Se inocularon células fúngicas de *Scopulariopsis brevicaulis* en el centro de una placa de Petri con agar dextrosa de papa. La placa se dejó para el crecimiento fúngico y esporulación durante 14 días. Después, se recolectaron asépticamente las esporas añadiendo 20 ml de solución acuosa de Tween 80 de 1 g/l a la placa de Petri y agitando suavemente para mezclar. La suspensión de esporas generada se transfirió a un vial de recolección. Usando este procedimiento, la concentración de esporas de *Scopulariopsis brevicaulis* en la suspensión de esporas recolectada fue $2,6 \pm 0,5 \times 10^6$ esporas/ml. Esta baja concentración de esporas mostró la baja afinidad de las esporas fúngicas hidrofóbicas para pasar a soluciones acuosas incluso con la adición de 1 g/l del surfactante Tween 80.

Control 2: Recolección con surfactante y raspado

Se repitió el método de Control 1 excepto que se incluyó una etapa de raspar la superficie de cultivo con un bucle de inoculación estéril después de añadir 20 ml de solución acuosa de Tween 80 a la placa esporulada. Con esta etapa de raspado físico adicional, la concentración de esporas en la suspensión de esporas recolectada para *S. brevicaulis* aumentó a $10,7 \pm 0,3 \times 10^9$ esporas/ml.

El raspado descrito en el Control 2 y en otros lugares de la sección de Ejemplos se utiliza particularmente en relación con el uso de cultivos cultivados en una superficie continua de material sólido o semisólido (p. ej., una placa de agar). En estos casos, el raspado generalmente sirve para liberar las esporas del cultivo fúngico. Las esporas liberadas se pueden entonces recolectar del cultivo restante todavía adherido a la superficie sólida/semisólida. Como se mencionó, algunos de los ejemplos específicos incluyen el raspado junto con la utilización de otro componente para recolectar las esporas.

Ejemplo 1: Recolección con surfactante y raspado

Se repitió el método de Control 2 excepto que se utilizaron 10 ml de aceite de frijol de soya estéril en lugar de 20 ml de la solución surfactante Tween 80 acuosa. Es decir, se añadieron 10 ml de aceite de frijol de soya para recolectar

las esporas de *S. brevicaulis* del cultivo esporulado en la placa de Petri. Se utilizó una etapa de raspado físico. Este método de recolección de esporas de *S. brevicaulis* dio una concentración de $1,7 \pm 0,3 \times 10^{10}$ esporas/ml.

Ejemplo 2: Sedimentación

En un esfuerzo por concentrar más las esporas de *S. brevicaulis* recolectadas del Ejemplo 1, el Ejemplo 2 incluyó permitir que el aceite que contenía esporas recolectadas se sedimentara. Es decir, después de recolectar el material del Ejemplo 1, este material recolectado se dejó reposar durante aproximadamente 5 minutos para que se sedimentaran las esporas. Se observó que esta sedimentación ocurría con relativa rapidez en comparación con otras observaciones de esporas que se sedimentaban en el agua. Después de la sedimentación, se eliminó la capa superior de aceite en la que se habían sedimentado las esporas, que se podría denominar aceite aclarado. Se analizó la concentración de esporas del aceite restante que contenía las esporas. Este método de recolección y sedimentación de esporas de *S. brevicaulis* dio una concentración de $3,4 \pm 0,6 \times 10^{11}$ esporas/ml.

Las concentraciones resultantes del Control 1, Control 2, Ejemplo 1 y Ejemplo 2 se resumen en la siguiente Tabla 1.

	Concentración
Control 1	2,6 + / - 0,5 x 10 ⁶ esporas/ml
Control 2	10,7 + / - 0,3 x 10 ⁹ esporas/ml
Ejemplo 1	1,7 + / - 0,3 x 10 ¹⁰ esporas/ml
Ejemplo 2	3,4 + / - 0,6 x 10 ¹¹ esporas/ml

Tabla 1

Control 3: Recolección en seco mediante raspado, sin utilizar agua ni aceite

La tolerancia a la temperatura de las esporas de *S. brevicaulis* se evaluó para esporas recolectadas en seco de una placa de agar de dextrosa de papa con cultivo fúngico esporulado y recién cultivado. Se usaron pipetas Pasteur esterilizadas para raspar suavemente el cultivo fúngico de tal manera que algunas esporas se adhirieran a la superficie de las puntas de las pipetas. Estas pipetas se colocaron en matraces esterilizados individualmente y después se trataron durante 2 horas en un horno seco ajustado a diferentes temperaturas: 51 °C, 53 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C y 70 °C. Para cada temperatura se usaron 4 pipetas Pasteur. Se pincharon placas de agar de dextrosa de patata fresca con estas pipetas para inocular las esporas tratadas térmicamente. La

inoculación se realizó dentro de una campana de flujo laminar bajo un flujo de aire esterilizado por filtro. Las placas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente para observar la germinación de esporas en estos puntos inoculados. Los resultados mostraron que las esporas tratadas a todas las temperaturas sometidas a pruebas, hasta 70 °C, podían germinar. Se encontró que las esporas de *S. brevicaulis* recolectadas en seco toleraban al menos 70 °C durante 2 horas en las condiciones de calor seco usadas en nuestro procedimiento de prueba.

Si bien se demostró que estas esporas recolectadas en seco tienen esta tolerancia en todas las temperaturas sometidas a pruebas, la recolección en seco de esporas generalmente no es práctica para la recolección a gran escala. Por ejemplo, un procedimiento de recolección en seco solo mueve las esporas a la superficie del objeto seco usado para raspar el cultivo, y las esporas se deberían recolectar de la superficie. Además, con esta técnica solo se puede recolectar una fracción muy pequeña de esporas producidas, sin usar una cantidad perjudicialmente grande de objetos de raspado para raspar el cultivo repetidamente. Además, para determinadas aplicaciones finales, el almacenamiento o utilización de esporas recolectadas que se adhieren a la

superficie de objetos raspados es muy poco práctico o inverosímil.

Control 4: Recolección con surfactante y raspado

El método de Control 3 generalmente se repitió excepto que se usó una solución surfactante acuosa (1 g/l de Tween 80) para la recolección, y las esporas de *S. brevicaulis* recolectadas se trataron a 60 °C, 65 °C y 70 °C en un horno seco durante 2 horas. La capacidad de germinación de las esporas recolectadas usando la solución surfactante acuosa fue deficiente. Las esporas tratadas durante 2 horas a 60 °C tuvieron dificultades para germinar; germinaron 3 de 5 puntos de inoculación. Aquellas tratadas a 65 °C y 70 °C no pudieron germinar en absoluto.

Ejemplo 5: Recolección con aceite de frijol de soya y raspado

El método de Control 3 generalmente se repitió excepto por el uso de aceite de frijol de soya para la recolección, y las esporas de *S. brevicaulis* recolectadas se trataron a 60 °C, 65 °C y 70 °C en un horno seco durante 2 horas. Para las esporas recolectadas en aceite, aquellas tratadas a 60 °C germinaron rápidamente, lo que fue comparable a las esporas recolectadas en seco en el Control 3 a esta temperatura. Aquellas tratadas a 65 °C y 70 °C también

germinaron, pero la germinación se produjo después de 7 días, lo que fue más tarde que los 3 días observados para las esporas recolectadas secas en el Control 3. Sin embargo, esta germinación mejoró en relación con el Control 4 con la recolección usando una solución surfactante acuosa. Nuevamente, como se mencionó anteriormente, la recolección seca de esporas generalmente no es práctica para la recolección a gran escala.

Ejemplo 6: Estabilidad de esporas dentro de una mezcla de ácidos grasos libres y aceite de frijol de soya y dentro de aceite de frijol de soya

La estabilidad de las esporas de *S. brevicaulis* se sometió a pruebas después de que las esporas hubieran estado en contacto con una mezcla de ácidos grasos libres y aceite de frijol de soya, que contenía 9 g de ácido oleico, 3 g de ácido esteárico, 2 g de ácido palmítico, y 3 ml de aceite de frijol de soya, durante 2 meses. También se sometieron a pruebas las esporas mantenidas en aceite de frijol de soya durante 51 y 93 días. Estas esporas se inocularon en placas de agar de dextrosa de papa. Todas las inoculaciones germinaron, lo que demuestra la estabilidad a largo plazo de las esporas en una suspensión de aceite.

Ejemplo 7: Estabilidad de las esporas en partículas portadoras porosas

Las esporas de *S. brevicaulis* en aceite de frijol de soya y en la mezcla de aceite y ácidos grasos libres del Ejemplo 6 se cargaron en partículas portadoras porosas y después se colocaron en una mezcla de mortero húmeda. En un sistema más, las partículas portadoras porosas se cargaron con esporas en aceite de frijol de soya y después se colocaron en una mezcla de mortero húmedo. Las partículas portadoras porosas estaban elaboradas de espuma de poliuretano e incluían cemento incorporado en estas para mayor resistencia. Las partículas de espuma de poliuretano cargadas se recubrieron con una fina capa de la mezcla de aceite y ácidos grasos libres sobre la superficie de las partículas portadoras antes de colocarlas en el mortero húmedo. El mortero húmedo tenía una relación en peso de 0,5: 1: 2,75 de agua: cemento: arena para crear el mortero. Durante el período de curado, se cree que el mortero tuvo un pH de > 12.

Después de que el mortero con las partículas se curó y almacenó durante diferentes cantidades de días, las muestras se rompieron, y las partículas portadoras cargadas de esporas se colocaron en placas de agar de dextrosa de papa para

examinar la germinación de las esporas. Incluso después de haber sido sometidas al ambiente duro y húmedo del mortero, se encontró que las esporas en el aceite de frijol de soya germinaban después de 8, 51, 66, 106, 335 y 569 días (no se sometió a pruebas un tiempo más largo); las esporas en la mezcla de aceite y ácidos grasos libres germinaron después de 17, 36, 51, 66, 81, 93, 106, 116, 133, 153, 213, 335, y 569 días (no se sometió a pruebas un tiempo más largo); y las esporas en aceite con partículas portadoras recubiertas de aceite y ácidos grasos libres germinaron después de al menos 7 meses (no se sometió a pruebas un tiempo más largo).

Diversas modificaciones y alteraciones que no se apartan del alcance y espíritu de esta invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Esta invención no se debe limitar debidamente a los aspectos ilustrativos expuestos en la presente descripción.