

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

**CAMPUS TUXTEPEC**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Desarrollo de un formulado con aceite a base de  
conidios de *Beauveria bassiana* producidos por  
fermentación bifásica**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

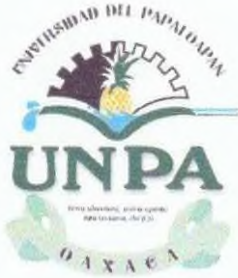
**Ingeniera en Biotecnología**

**PRESENTA:**

**CELENIA GOMEZ VASQUEZ**

**Director: Dr. Oscar Núñez Gaona**

**SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, 2019**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 18 de junio de 2018 a las 16 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Desarrollo de un formulado con aceite a base de conidios de *Beauveria bassiana* producidos por fermentación bifásica**" presentada por la alumna **Celenia Gomez Vasquez**, con número de matrícula **12090061**, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 18 de junio de 2018

ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

**Dr. Óscar Núñez Gaona**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

**Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia**  
Cátedras CONACyT  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

**Dra. Alma Xochil Avila Alejandre**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

**Dra. María de Jesús García Gómez**  
Profesor Investigador Titular  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

**M.B. Alejandro Hernández López**  
Profesor  
Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan  
Revisor de Tesis



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de febrero de 2019  
Oficio No. JCIB/008/02/2019

**Lic. Yesenia Barrientos Arenal**  
Jefe de Servicios Escolares  
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Celenia Gomez Vasquez** titulado "**Desarrollo de un formulado con aceite a base de conidios de *Beauveria bassiana* producidos por fermentación bifásica**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

**Presidente:** Dra. María de Jesús García Gómez (Universidad del Papaloapan)  
**Secretaria:** Dra. Alma Xóchitl Ávila Alejandre (Universidad del Papaloapan)  
**Vocal:** Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Universidad del Papaloapan)  
**Primer Suplente:** Dr. Enrique Villalobos Amador (Universidad del Papaloapan)  
**Segundo suplente:** M.B. Alejandro Hernández López (Instituto Tecnológico de la Cuenca del Papaloapan)

Sin mas por el momento le envío un cordial saludo.



**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Catedrático de Carrera de Ingeniería en Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

**Atentamente**

*Terra uberima, mens aperta  
Bou Lo-tama, chí jí jú*



**Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona**  
Vice Rector Académico  
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dr. Óscar Núñez Gaona. Director de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Celenia Gomez Vasquez, Alumna, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

HOJA DE ORIGINALIDAD

---

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por permitirme llegar a este momento tan importante de mi vida, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía antes y durante todo el periodo de estudio.*

*Al Dr. Oscar Núñez Gaona, de principio por aceptarme en su equipo de trabajo. Por todo el tiempo dedicado, los consejos brindados, la confianza cedida para realizar las actividades del presente trabajo con libertad y sobre todo más que un instructor un amigo que encontré para resolver problemas, no siempre académicos pero siempre con el interés que brinda una persona de grandeza intachable. Muchas gracias por tantas palabras de aliento y motivación en el momento idóneo.*

*A mis revisores, por aceptar formar parte del comité. La Dra. María de Jesús García Gómez, por estar siempre pendiente de mis necesidades, dudas y complicaciones resueltas con su apoyo. La Dra. Ana Karin Navarro Martínez por la ayuda y la paciencia brindada. La Dra. Jacqueline Capataz Tafur por instruirme y orientarme en el proceso de desarrollo de mi protocolo. La Dra. Alma Xochitl Ávila Alejandre por su amabilidad en el momento de presentar mis dudas y ayudarme con reactivos. El M. en C. Alejandro Hernández López por estar siempre pendiente de la revisión y la Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia por aceptar, dada las circunstancias, ser parte del comité de revisión de tesis. A cada uno, muchísimas gracias por ser más que un apoyo profesional siempre mostrando su parte humana que hace que uno se motive día a día a ser mejor en lo que hace.*

*A mis amigos; Nuria, amiga incondicional desde el primer día del propedéutico hasta ahora, compartiendo momentos increíbles en las buenas y en las malas. Betzayda, compañera y amiga que a pesar del poco tiempo de tratarla, descubrí a una persona fuerte y con un corazón enorme. Daniel compañero y amigo en quien siempre encontré un apoyo para llevar acabo ciertas tareas. Liria, amiga que conocí en el laboratorio y que a pesar del poco tiempo de convivir con ella, descubrí que es un ser humano en toda la extensión de la palabra con un corazón tan enorme y sin prejuicios.*

*A mi familia, como pilar fundamental en mi desarrollo y a todas esas personas que sin motivo ni razón creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente.*

DEDICATORIAS

---

*Dedico este trabajo principalmente a mi familia, que siempre fue una fortaleza indispensable y ha hecho de mí la persona que soy en este momento.*

*A mis papás, Marciano Gomez Hernández e Isidora Vasquez Melchor por darme la vida y con ella la oportunidad de forjarme como una persona capaz de realizar sus sueños. Siempre me apoyaron, aconsejaron y lo siguen haciendo a pesar de que en el momento de comenzar este trayecto fue difícil por la separación, pero son mi fortaleza en momentos difíciles y les agradezco por creer en mí, en mi valor y en mi deseo de realizar algo que quería a pesar de cualquier obstáculo.*

*A todos mis hermanos que siempre me han apoyado, Balbina, Oscar, Baldomero y sobre todo a Ramiro, porque más que un hermano siempre ha sido como otro padre para mí, con el apoyo incondicional, siempre mostrando interés en mis necesidades y mis dificultades, alentándome a ser mejor cada día. Aunque algunos estén lejos sé que siempre tendré su apoyo.*

*A Orlando Oscar García Cruz por formar parte de mi vida, por su compañía y apoyo incondicional que pese a la gran distancia que siempre nos separó, estuvo y esta tan cerca de mí. Por ser mi inspiración, por apoyarme siempre, por creer en mí y sobre todo por recordarme siempre lo mucho que valgo como mujer y como persona.*

*A mi hijo Gustavo por darme la fuerza suficiente para retomar mi trabajo, porque con el simple hecho de mirarte, me doy cuenta que cueste lo que cueste y tarde lo que tarde todo valdrá la pena, porque al final la recompensa será la satisfacción de lograr mis metas y tenerte a mi lado siempre (te amo).*

*A mis primas Inés y Valentina que desde el momento que pise Tuxtepec por primera vez, estuvieron ahí siempre como apoyo en todos los sentidos y me animaron a seguir adelante.*

## RESUMEN

La revolución verde en un inicio abasteció la demanda de alimentos de la población mundial, pero con el paso del tiempo esto alteró el equilibrio ecológico, generando problemas que impactan a la agricultura. El manejo integrado de plagas (MIP) es una estrategia ecológica, económica y social para enfrentar estos problemas, en él encontramos al control biológico que emplea enemigos naturales para disminuir la densidad poblacional de las plagas. *Beauveria bassiana* presenta características que la destacan como agente de control biológico. Los formulados biológicos aun presentan problemas como la comparación en cuanto al tiempo de acción, vida de anaquel y costos con los insecticidas sintéticos. Este trabajo evaluó el efecto de hacer un formulado con conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica, mezclados con aceites vegetales como adherentes, sobre la viabilidad y TL 50. También se evaluó el efecto de un medio económico con base en el jugo de verduras (V8) en la fermentación líquida sobre la producción de biomasa, conidios y producción de enzimas hidrolíticas, comparando los resultados obtenidos con un medio comercial y definido, caldo Dextrosa Sabouraud (SD). Los conidios sumergidos producidos en fase líquida, se emplearon como inóculo para la fermentación sólida sobre arroz como sustrato. Al final de la fermentación sólida, los conidios aéreos se secaron y se separaron del sustrato para mezclarlos con agua destilada estéril y aceites de girasol o soya al 15 %, evaluando la viabilidad de estos productos durante 5 meses, finalizado este tiempo se llevó a cabo un bioensayo para determinar el tiempo letal 50 de los formulados. Se observaron diferencias significativas para la producción de conidio, biomasa y la actividad enzimática entre ambos medios de cultivo, en cuanto la viabilidad fluctuó entre 69.5 y 78.1 % en medio SD y entre 65.5 y 72.95 % en medio V8, en el día de máximo crecimiento durante la fermentación líquida. Sin embargo, después de 10 días de secado al final de la fermentación sólida, el valor de la viabilidad disminuyó un 3.1 % para el medio SD y un 2.8 % para el medio V8. Finalmente para los formulados con los aceites se observó que la viabilidad se mantuvo durante los 5 meses, a diferencia de los polvos almacenados en agua que presentaron una disminución de 21 y 27 % para SD y V8, respectivamente. Para el TL<sub>50</sub>, el mejor valor fue de  $9.44 \pm 0.968$  días con los conidios producidos en medio SD mezclados con aceite de soya, posteriormente de  $13.339 \pm 1.159$  días con los conidios producidos en medio SD mezclados con aceite de girasol.

ABSTRACT

---

The Green revolution initially satisfied the food demand of the population; however, it eventually altered the ecological balance, causing problems that impacted the agriculture. The Integrated Pest Management (IPM) is an ecological, economic and social strategy to face this issues, in it we have the biological control that uses natural enemies to reduce the population density of the pest. *Beauveria bassiana* presents characteristics that stand out as a biological control agent. Biological formulations still present problems such as action time, shelf life and costs in comparison with synthetic insecticides. This work evaluated the effect of a formula with conidia of *Beauveria bassiana* 885.2 produced by biphasic fermentation, mixed with vegetable oils as adherents, on the viability and LT<sub>50</sub>. The effect of an economic medium based on vegetable juice (V8) in the liquid fermentation on the production of biomass, conidia and production of hydrolytic enzymes was also evaluated, comparing the results obtained with a commercial and defined medium, Saboraud Dextrose broth (SDB). The submerged conidia produced in liquid phase were used as inoculum for the solid fermentation with rice as substrate. At the end of the solid fermentation, the aerial conidia were dried and separated from the substrate to mix them with sterile distilled water and 15% of sunflower seed oil or soybean oil, evaluating the viability of these products for 5 months, at the end of this time a bioassay was carried out to determine the lethal time 50 of the formulates. Significant differences were observed for the production of conidia, biomass and enzymatic activity between both culture media, as the viability fluctuated between 69.5 and 78.1% in the SDB medium and between 65.5 and 72.95% in the V8 medium, on the day of maximum growth during liquid fermentation. However, after 10 days of drying at the end of the solid fermentation, the viability value decreased by 3.1% for the SDB medium and 2.8% for the V8 medium. Finally, for those formulated with the oils, it was observed that the viability was maintained during the 5 months, unlike the powders stored in water that showed a decrease of 21 and 27% for SDB and V8, respectively. For the LT<sub>50</sub>, the best value was of  $9.44 \pm 0.968$  days with the conidia produced in SDB medium mixed with soybean oil, and later of  $13.339 \pm 1.159$  days with the conidia produced in SDB medium mixed with sunflower seed oil.

ÍNDICE

HOJA DE ORIGINALIDAD .....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIAS .....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT .....	V
ÍNDICE.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XI
1. GENERALIDADES .....	1
1.1 AGRICULTURA.....	1
1.2 MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS (MIP) .....	2
1.2.1 Control biológico (CB) .....	4
2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (HEP) .....	5
2.1.1 Modo de acción de los hongos entomopatógenos .....	6
2.1.2 Enzimas infectivas.....	6
2.1.3 Etapas de infección .....	7
2.2 FERMENTACIÓN .....	9
3. ANTECEDENTES.....	12
3.1 <i>BEAUVERIA BASSIANA</i> .....	12
3.1.1 <i>Beauveria bassiana</i> 885.2.....	12
3.2 FORMULADOS BIOLÓGICOS.....	13
3.2.1 Formulados con <i>Beauveria bassiana</i> .....	15
3.2.2 Evaluación de formulados biológicos.....	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. HIPÓTESIS.....	18
6. OBJETIVOS .....	19
6.1 GENERAL .....	19
6.2 ESPECÍFICOS .....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
7.1 MICROORGANISMO.....	21
7.2 FERMENTACIÓN BIFÁSICA.....	21
7.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO .....	22
7.3.1 Conteo de conidios y determinación de biomasa en medio líquido .....	22
7.4 DETERMINACIONES .....	22
7.4.1 Viabilidad.....	22
7.4.2 Proteínas totales.....	23
7.4.3 Actividad N-acetilhexosaminidasa .....	23
7.4.4 Actividad endoquitinasa.....	23
7.4.5 Proteasas.....	24

7.5	FORMULACIÓN.....	24
7.6	BIOENSAYOS.....	25
7.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
8.1	BIOMASA EN MEDIO LÍQUIDO.....	27
8.2	PRODUCCIÓN DE CONIDIOS EN MEDIO LÍQUIDO.....	28
8.3	DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.....	29
8.3.1	Actividad exoquitinasas y endoquitinasas.....	29
8.3.2	Proteasas.....	33
8.4	PH EN MEDIO LÍQUIDO.....	35
8.5	FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO.....	37
8.5.1	Cinética de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2.....	37
8.6	FORMULADO.....	39
8.7	PARÁMETROS DE CALIDAD.....	40
8.7.1	Viabilidad.....	40
8.7.2	Bioensayos.....	45
9.	CONCLUSIONES.....	49
10.	APORTACIONES.....	51
11.	PERSPECTIVAS.....	52
12.	PRODUCTOS OBTENIDOS.....	53
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	54
A.	ANEXOS.....	60
A.1	CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	60
A.2	ARTÍCULO.....	63

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Regulación de la población plaga por un enemigo natural en relación con un umbral económico. ....	3
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos.....	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida del <i>Tenebrio molitor</i> .....	16
<b>Figura 4.</b> Producción de biomasa de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 en fermentación líquida en dos medios diferentes: SD y V8. ....	28
<b>Figura 5.</b> Producción de conidios por <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 en fermentación líquida en dos medios diferentes: SD y V8. ....	29
<b>Figura 6.</b> Actividad de quitinasas en fermentación líquida con <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 A) actividad de exoquitinasas, B) actividad de endoquitinasas en dos medios diferentes: SD y V8. ....	32
<b>Figura 7.</b> Producción de proteasas de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 en fermentación líquida en dos medios diferentes:SD y V8 .....	34
<b>Figura 8.</b> Comportamiento del pH en fermentación líquida con <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 en dos medios diferentes: SD y V8. ....	37
<b>Figura 9.</b> Concentración de conidios producidos por <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 en fermentación sólida con inóculos provenientes de fermentación líquida en dos medios diferentes: SD y V8. ....	38
<b>Figura 10.</b> Apariencia de los formulados después de 5 meses, A) formulados con aceite de girasol, B) formulados con aceite de soya. ....	40
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de viabilidad para los conidios de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 provenientes de la A) fermentación líquida, B) fermentación sólida y C) después del secado.....	42
<b>Figura 12.</b> Porcentajes de viabilidad A) de testigos al inicio (Oct) y al final (Mar) de los conidios de la fermentación bifásica con base líquida en dos medios diferentes: SD y V8. B) de formulados V8GIRASOL, DSGIRASOL, V8SOYA y SDSOYA durante 5 meses (noviembre-marzo). ....	44
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de mortalidad de los formulados con aceite a base de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2: SDSOYA, SDGIRASOL, V8SOYA, V8GIRASOL.....	46

- Figura 14.** Larvas de *Tenebrio molitor* micosadas por *Beauveria bassiana* 885.2 provenientes de los formulados: A) V8GIRASOL, B) SDGIRASOL, C) V8SOYA, D) SDSOYA, E) caja de bioensayo del formulado SDSOYA, F) caja de bioensayo del formulado SDGIRASOL.48
- Figura 15.** Curva de calibración estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) 100 µg/mL por el método de micro ensayo de Bradford (1976). ..... 60
- Figura 16.** Curva de calibración estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman, (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de 100µg/mL para la determinación de la actividad exoquitinasa. .... 61
- Figura 17.** Curva de calibración estándar de tirosina 50mg/mL para la determinación de unidades de proteasas (Ichishima, 1970). ..... 62

## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Métodos para el Manejo integrado de plagas (MIP) .....	2
<b>Tabla 2.</b> Composición de los formulados de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 obtenidos por fermentación bifásica. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Actividades específicas (AE) de exoquitinasas, endoquitinasas y proteasas de <i>Beauveria bassiana</i> producidas en fermentación líquida.....	35
<b>Tabla 4.</b> TL <sub>50</sub> estimados para cada formulado de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> 885.2 producidos por fermentación bifásica utilizando el modelo estadístico probit.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
SD	Dextrosa Sabouraud
V8	Medio de 8 verduras
SDA	Agar sabouraud dextrosa
ACB	Agente de control biológico
<i>Bb 885.2</i>	<i>Beauveria bassiana 885.2</i>
FML	Fermentación en medio líquido
FMS	Fermentación en medio sólido
FBF	Fermentación bifásica
CB	Control biológico
HEP	Hongos entomopatógenos
MIP	Manejo integrado de plagas
AE	Actividad específica
TL <sub>50</sub>	Tiempo letal 50
SDSOYA	Formulado con aceite de soya y conidios del medio SD
SDGIRASOL	Formulado con aceite de girasol y conidios del medio SD
V8SOYA	Formulado con aceite de soya y conidios del medio V8
V8GIRASOL	Formulado con aceite de girasol y conidios del medio V8

---

## 1. GENERALIDADES

---

### 1.1 Agricultura

El sector primario se basa en las actividades que explotan los recursos naturales para obtener productos sin ninguna transformación para consumo directo o como materia prima para otros sectores. La agricultura, es parte de este sector, se compone de técnicas para cultivar la tierra y obtener productos para el consumo humano (Universidad en el campo, 2011). En las últimas décadas se ha incrementado la densidad poblacional de forma exponencial y se espera que mantenga esta tendencia (United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2015), a su vez conlleva un aumento en la demanda de las necesidades básicas. Esto ocasiona que la agricultura busque la manera de resolver los problemas de abasto de alimentos mediante la revolución verde (empleo tecnológico como: plaguicidas, herbicidas y fertilizantes para obtener mayores rendimientos en los cultivos). De igual manera se ha dedicado a extender las áreas de cultivo para plantaciones intensivas de una sola especie (Pichardo y González, 2006).

Al introducir el uso de tecnologías en los ecosistemas agrícolas, estos se transforman en agroecosistemas que buscan obtener el máximo rendimiento. Lo cual aconteció en un principio pero a largo plazo produjo daños colaterales que afectan a la sociedad debido a que la mayor parte de los recursos usados en la revolución verde no son renovables, y que con el paso del tiempo han ido degradando al ecosistema. Esto ha generado que la productividad en la agricultura no se eleve sino por el contrario, de manera que el valor de los alimentos no aumenta con relación a su producción (Rodríguez, 1997).

A continuación, se enumeran una serie de problemas que se han generado a raíz de la transformación de los ecosistemas agrícolas:

- Sobreexplotación de territorios y recursos naturales: el suelo se agota, las áreas con monocultivos deterioran la materia orgánica en él (Rodríguez, 1997). Ligado a esto su extensión destruye el hábitat natural de muchas especies, plantas y animales, reduciendo la biodiversidad (Cabello *et al.*, 1990).

- Emisión de contaminantes: esto en parte al uso de productos químicos sobre cultivos agrícolas que dejan residuos, los cuales se infiltran a los acuíferos (Vera y Romero, 1994).
- Contaminación atmosférica: causada por la producción de fertilizantes y pesticidas químicos, así como los fertilizantes nitrogenados que liberan amoníaco, ácido nítrico, nitrato amoniacal y urea (Rodríguez, 1997).
- Toxicidad a población no objetivo, como esterilidad y cáncer en el humano (Chong, 2003).

## 1.2 Manejo integrado de plagas (MIP)

Debido a todos los problemas que se han generado por el manejo de los agroecosistemas, ya no es posible obtener los rendimientos necesarios para satisfacer las necesidades alimentarias. Ante esto, se han desarrollado métodos que emplean procedimientos aceptables desde el punto de vista económico, ecológico y toxicológico, denominados por la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), como Manejo integrado de plagas (Zavaleta-Mejía, 1999). El cual comprende los métodos enumerados en la Tabla 1.

**Tabla 1. Métodos para el Manejo integrado de plagas (MIP)**

<b>Método</b>	<b>Características</b>
Control químico	Matar a organismos plaga con productos químicos es el método usado ampliamente para el control, pero los principales problemas que surgen a raíz de su empleo han restringido su uso como último recurso y en momentos específicos en el ciclo de vida de la plaga.
Cultivos resistentes	Implica generar variedades resistentes con características deseadas tanto para la producción como para no ser atractivas para las plagas.
Prácticas culturales	Conocer el proceso de desarrollo del cultivo para enfocar la atención en las etapas que son vulnerables, y mantener siempre la fertilidad del suelo con residuos orgánicos.

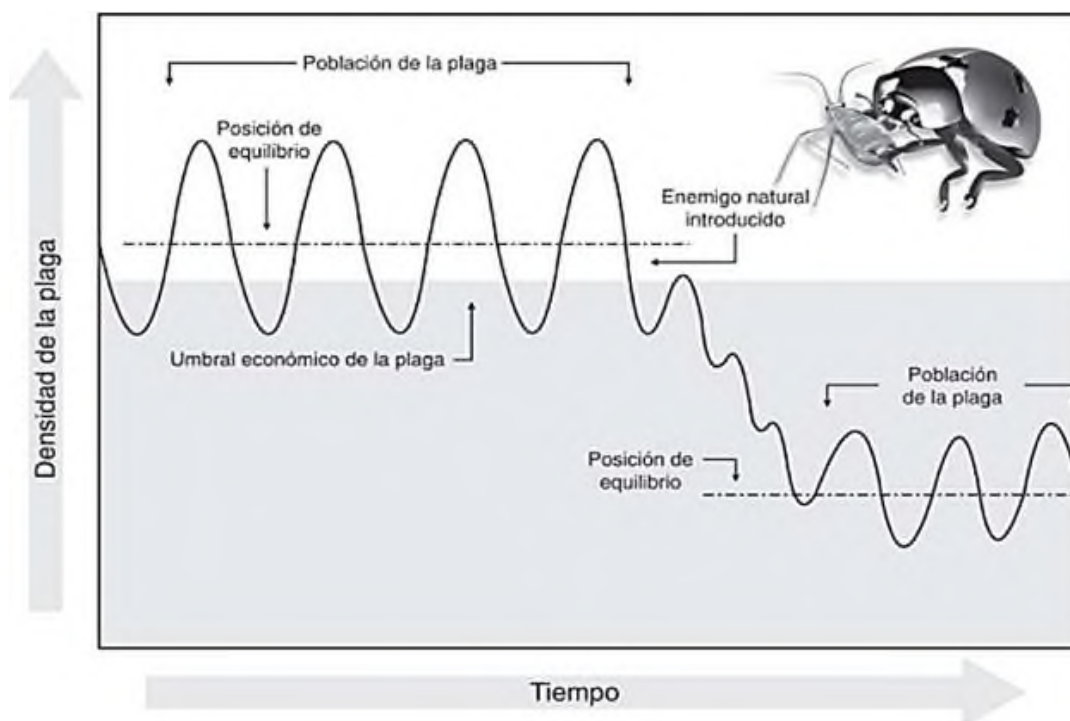
Control mecánico Es el uso de herramientas y maquinarias para reducir la población plaga como: labranza, tala, quema, el deshierbe manual y poda de partes infestadas de las plantas.

Control sanitario En este apartado entran las prácticas preventivas. La siembra de semillas certificadas y la cuarentena de cultivos o tierras, esto para prevenir la introducción de plagas.

Control biológico Empleo de enemigos naturales que pueden ser introducidos o manipulados para la regulación de población plaga.

Fuente: Modificado de Ehi-Eromosele *et al.*, (2013).

Pero para llevar a la práctica estos métodos hay que tener en cuenta dos consideraciones: un umbral económico que es la cantidad de pérdida en un cultivo traducido en dinero y otro de acción que es la intervención del agricultor para combatir los efectos de la plaga y que no supere el económico. El control biológico, pretende reducir la población de la plaga sin causar daños económicos preservando al controlador (Estrada, 2008) como se muestra (Figura 1).



**Figura 1. Regulación de la población plaga por un enemigo natural en relación con un umbral económico (modificado de Estrada, 2008).**

### 1.2.1 Control biológico (CB)

El MIP va dirigido principalmente al uso del control biológico. Los organismos vivos, en su mayoría no son plagas, son benéficos como los que ayudan a polinizar las flores, a controlar los organismos plagas o restaurar sistemas naturales que son afectados por plagas no nativas (Vélez *et al.*, 2000), así como los de consumo humano. El hombre llamó plaga a un organismo que reduce la disponibilidad, calidad o valor de recursos valiosos para sí mismos, recursos que pueden ser plantas, animales o bien pueden ser la salud y el bienestar de una persona (Cano *et al.*, 2004).

Los organismos que controlan y restauran sistemas naturales también son llamados enemigos naturales, los cuales se clasifican como:

**Depredadores;** insectos que atacan a otro insecto para alimentarse de ellos.

**Parasitoides;** organismos que viven parte de su vida (estado larvario) como parásitos de otro insecto huésped y la otra parte (estado adulto) vive de manera libre. La diferencia entre un parásito y el parasitoide es que este último en la mayor parte de los casos mata a su hospedero cuando pasa a su fase adulta (Bernal, 2007).

**Patógenos;** microorganismos que enferman a su huésped, dentro de los cuales se encuentran hongos, bacterias, virus y nematodos (Driesche *et al.*, 2006).

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1 Hongos entomopatógenos (HEP)

El control biológico con hongos entomopatógenos representa una alternativa que rescata y fortalece el equilibrio ecológico que existía antes del uso de agroquímicos. La principal ventaja de los HEP es su modo de acción; tienen la capacidad de infectar al insecto por contacto, a diferencia de los otros que necesitan ser ingeridos (Montesinos-Matias, 2008). Esto los coloca con potencial para ser usados como bioinsecticidas.

Los hongos entomopatógenos son microorganismos con filogenia diversa, heterotróficos, eucariontes, unicelulares o hifales (filamentosos), que se reproducen por esporas de manera sexual, asexual o ambas (Maranhão y Maranhão, 2008-2009). Los hongos que pertenecen al reino Mycota, son agrupados en cuatro subdivisiones: Quitridiomycota, Glumeromycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Inglis *et al.*, 2001). Estos llegan a causar epizootias en poblaciones objetivo, regulándolas al aumentar la mortalidad en ellas. De las 700 especies que se conocen, poco menos de 10 son empleadas para el control biológico de insectos plaga (Hajeck y St. Leger, 1994). La mayoría de los hongos entomopatógenos con potencial para el control de insectos se encuentran en la división Eumycota y dentro de las subdivisiones: Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota. Entre de los cuales se encuentran los géneros de gran importancia como: *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Tolypocladium* y *Verticillium* (Monroy *et al.*, 2015). La gran ventaja de ellos es que enferman al insecto en cualquier etapa de su ciclo de vida, además de que se pueden encontrar en hábitats acuático, terrestre y subterráneo (Maranhão y Maranhão, 2008-2009). Se conoce también un amplio rango de ciclos de vida de estos hongos, que van desde el parasitismo obligado hasta patógenos oportunistas, donde este último es capaz de sobrevivir de manera saprofita sobre el huésped sin vida (Maranhão y Maranhão, 2008-2009). Lo que facilita la producción de estas especies *in vitro* en diferentes sustratos (medios nutritivos y soporte). A diferencia de los que tienen ciclos de vida como parásitos obligados que requieren un huésped para reproducirse.

Para que se desarrolle o se inhiba una epizootia, intervienen las interacciones del hongo con el medio, incluyendo la sensibilidad a la radiación solar, comportamiento del huésped, fisiología,

temperatura, humedad, etc. Entonces, para incrementar la probabilidad de que se desarrolle una epizootia no únicamente se tiene que considerar la virulencia del hongo sino también el empleo correcto del mismo, el proceso de producción, de formulación y la aplicación en la dosis y tiempos apropiados. Todos estos criterios trabajando de manera sinérgica aseguran el éxito en el manejo de la plaga (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014).

### 2.1.1 Modo de acción de los hongos entomopatógenos

Los hongos son los únicos patógenos que invaden a sus hospedantes por contacto entre la espora con el tegumento, de manera general el ciclo de vida de los hongos entomopatógenos se dividen en dos fases importantes; la fase infectiva que comienza con la germinación de las esporas y penetración a través de la cutícula, seguido de la proliferación de la células fúngicas en el interior del insecto causándole la muerte, y la fase reproductiva en la que se da la producción de esporas infectivas a través del exoesqueleto para repetir el ciclo nuevamente (Maranhão y Maranhão, 2008-2009; Montesinos-Matias, 2008). Dentro de las características de los hongos se encuentran la patogenicidad y la virulencia (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). La patogenicidad es un término que define la capacidad del hongo para causar la enfermedad. Mientras que la virulencia es el grado de patogenicidad de un microorganismo. Es por ello que la excreción de metabolitos es muy importante para determinar la virulencia del hongo (Maranhão y Maranhão, 2008-2009).

### 2.1.2 Enzimas infectivas

La virulencia de los hongos entomopatógenos está ligada a la producción de enzimas que favorecen la penetración (Borges *et al.*, 2010) pues les permiten mediante hidrolisis romper las biomoléculas que conforma la cutícula (principalmente quitina) hasta fragmentos más pequeños para poder ser asimilados y de esta manera continuar con el proceso de infección. Dentro del insecto, los hongos pueden producir metabolitos secundarios, cuya actividad insecticida les permite matarlo más rápido (Clarkson y Charnley, 1996). Se ha encontrado una correlación positiva cercana al 50 % entre la producción de enzimas y la patogenicidad (Kaur *et al.*, 2008).

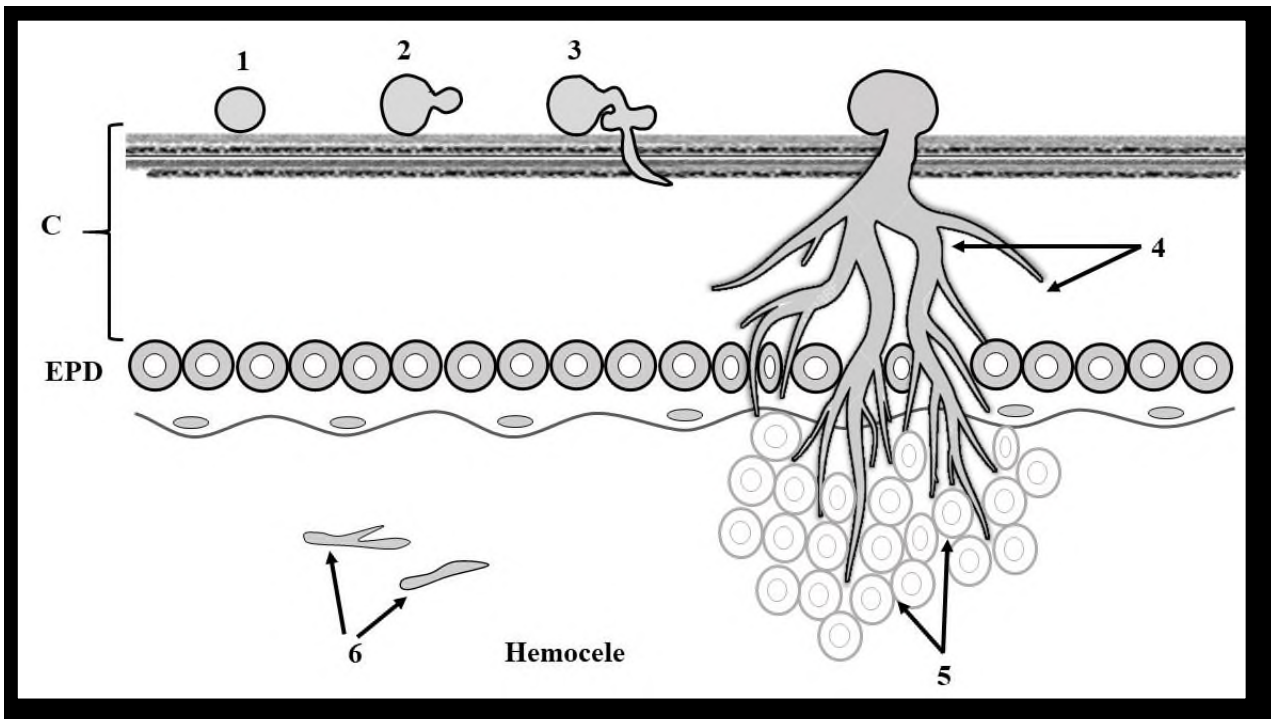
Las lipasas son las primeras enzimas sintetizadas por los hongos entomopatógenos, estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, y se encuentran en microorganismos, plantas y animales. Recientemente, una subfamilia del citocromo P450 denominadas CYP52XI y

MrCYP52 han sido identificadas en *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii*, respectivamente. Estos descomponen alquenos de cadena larga y ácidos grasos para convertirse en nutrientes iniciales (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). Cuando la epicutícula se descompone por las lipasas, el hongo produce grandes cantidades de proteasa Pr1, que degrada el material proteico ya que la proteasa pr1 es un indicador de virulencia para hongos entomopatógenos (Wang *et al.*, 2002). La proteína proteolítica más estudiada son la serina-proteasa Pr1 de tipo subtilisina y la proteasa Pr2 de tipo tripsina, las actividades de Pr1 y Pr2 se han determinado en *Beauveria bassiana*, *Metarhizium*, *Lecanicillium lecanii* y *Metarhizium flavoviride* (Bidochka y Melzer, 2000), estas proteasas son secretadas en la primera etapa de degradación de la cutícula y están sujetas a un mecanismo de transducción de señales con la activación de la proteína quinasa A (PKA) mediada por AMPc (Fang *et al.*, 2009). Las quitinasas están ampliamente distribuidas en plantas, bacterias, hongos, insectos y vertebrados, hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 del polímero de quitina produciendo una N, N'-diacetilquitobiosa predominante, han sido reconocidas como poderoso agente de control biológico debido a su actividad fungicida y se caracterizan por la capacidad de hidrolizar enlaces glicosídicos en la cadena de quitina mediante un mecanismo endolítico o exolítico. La primera hidroliza la quitina en oligosacáridos y la última en el extremo terminal no reductor (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014; Muthukrishnan *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Etapas de infección

La mayoría de los insectos tienen una estructura cilíndrica fragmentada. El tegumento se compone de tres capas: cutícula, epidermis y membrana basal. La cutícula trabaja como barrera física ante parásitos y enfermedades, y su componente principal es la quitina. Esta es un polímero compuesto por  $\beta$ -1,4 N-acetil glucosamina, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa. La capa externa de la cutícula (epicutícula) es el sitio inicial de contacto entre el hongo y el huésped (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014).

las etapas de la infección se describen a continuación (Figura 2):



**Figura 2. Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos: 1) Adhesión 2) Germinación 3) Penetración 4) perforación de la cutícula y epidermis hasta llegar al hemocele, 5) Reacción de defensa celular del insecto, 6) cuerpos hifales C: cutícula, EPD: epidermis. (modificado de Quesada, 2015)**

Adhesión (1): proceso de fijación de las esporas sobre la epicutícula del insecto (capa más externa e impermeable) compuesta por una mezcla heterogénea de lípidos, alquenos de cadena larga, ésteres y ácidos grasos (Sánchez-Pérez *et al.*, 2014). Por tanto en esta fase es donde las lipasas actúan para la degradación de la mezcla de lípidos para convertirse en nutrientes iniciales.

Germinación (2): ocurre si las condiciones del medio: humedad, temperatura y requerimientos nutricionales, son favorables. Comienza con la generación de un tubo germinativo para facilitar la penetración, aunque estos tubos no siempre se pueden formar ya que dependen de las características físicas y químicas del hongo para llevar a cabo su multiplicación (Maranhão y Maranhão, 2008-2009).

Penetración (3): a través de los tubos germinativos se puede llevar a cabo la penetración de las hifas, de esa manera perfora la cutícula y epidermis para finalmente llegar al hemocele (Maranhão y Maranhão, 2008-2009).

Multiplicación del hongo (4): durante esta fase se excretan enzimas. da Silva *et al.*, (2010) y Huang *et al.*, (2009) reportaron la importancia de las lipasas en el proceso de penetración y multiplicación así como la adhesión de las esporas sobre la epicutícula. Mientras se da la degradación por las lipasas, el hongo produce grandes cantidades de proteasas consideradas como iniciadores importantes de virulencia en el proceso infeccioso (Mustafa *et al.*, 2009). Estas trabajan en conjunto con las quitinasas que degrada la quitina de la cutícula asociándose en diferentes etapas del ciclo de los hongos sobre el insecto: crecimiento de hifas, morfogénesis, nutrición, defensa contra competidores (Adams, 2004) y para combatir la reacción de defensa celular (5) que genera el insecto, esto; cuando los hongos alcanzaron el hemocele.

Desarrollo de cuerpos hifales (6): se generan cuando los hongos alcanzan el hemocele consumiendo los nutrientes de este y degradando los tejidos, principalmente el intestino. Provocando que el insecto pierda el apetito para después morir de hambre. Finalmente los hongos emergen y esporulan tomando el color característico del hongo por el cual fue infectado, blanco en el caso de *Beauveria bassiana* (Monzón, 2001).

La muerte del insecto es debida en muchos casos a que los hongos sintetizan metabolitos que actúan como toxinas, que juegan un papel importante en el proceso de infección. Entre las toxinas producidas por los hongos se encuentra destruxinas (las más estudiadas) de *Metarhizium anisopliae*, de las cuales existen más de 27 tipos (Maranhão y Maranhão, 2008-2009). Además de las beauvericinas, bassianinas, tenellinas, oosporeinas, producidas por *Beauveria bassiana* (Vey *et al.*, 2001).

## 2.2 Fermentación

Cheng, (2013) definió la fermentación como el proceso mediante el cual los microorganismos catalizan nutrientes, sintetizan metabolitos secundarios y completan otras actividades fisiológicas en condiciones anaeróbicas o aeróbicas.

La producción de hongos se basa en la multiplicación masiva de conidios en un sustrato natural que se puede obtener de residuos agroindustriales, esto se lleva a cabo mediante producción tradicional: fermentación en sustrato líquido; fermentación en sustratos sólidos; o

fermentación bifásica. En esta última se produce el inóculo en cultivo líquido, y luego se pasa a un soporte sólido (Elósegui, 2006).

Para llevar a cabo el proceso de producción es necesario considerar algunos criterios como:

- La cepa: garantizar la estabilidad genética y fenotípica a través de pruebas bioquímicas y moleculares.
- Los parámetros: porcentaje de humedad en el sustrato, inóculo, aireación, temperatura de incubación, régimen luz-oscuridad y monitoreo de la contaminación (Hallsworth y Magan, 1999; Núñez-Gaona *et al.*, 2010).

La fermentación en medio líquido (FML) permite el cultivo de microorganismos en condiciones anaeróbicas o aeróbicas, con una densidad moderada de biomasa pero con características de importancia durante el proceso de producción, como el aumento de la transferencia de oxígeno (Righelato, 1975; Solomon, 1975; Raimbault, 1998), aprovechamiento de nutrientes (Elósegui, 2006), además requiere tiempos cortos de cultivo (Chong, 2003). Generalmente denominados cultivo semilla o de arranque, en el caso de los hongos entomopatógenos, al micelio, conidios sumergidos y/o blastosporas (Gómez, 2017). Aunque estos presentan la desventaja de no soportar condiciones adversas para poder ser empleados directamente como formulados biológicos (Gómez, 2017).

La fermentación en medio sólido (FMS) son cultivos en condiciones anaeróbicas o aeróbicas de microorganismos que crecen sobre sustratos sólidos porosos (Roussos y Perraud, 1996), como los granos de arroz. Los cuales son los más usados (Monzón, 2001) y los de mejor rendimiento en producción masiva (Espinell *et al.*, 2008). La FMS es principalmente empleadas para la producción de compuestos con valor agregado como antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de vegetales, entre otros. Además es un proceso atractivo por los productos estables que se generan y también, se obtienen conidios de alta calidad con concentraciones elevadas (Elósegui, 2006). Sin embargo presenta desventajas como el control de pH y temperatura lo que incrementa el costo de producción (Pérez-Guerra *et al.*, 2003).

La fermentación bifásica (FBF) consta de dos fases secuenciales, la primera una fermentación líquida donde el hongo crece hasta su fase de crecimiento exponencial para ser transferida después a un sustrato sólido (Aponte *et al.*, 2000). Barajas *et al.*, (2010) mostraron que la

fermentación bifásica tiene potencial para la producción masiva de hongos entomopatógenos reduciendo tiempo y costos, e incrementando la concentración y calidad de los conidios.

Por otro lado, los costos de producción juegan un papel importante en el desarrollo de los formulados. Por esto se buscan alternativas para mantener los criterios de calidad, con el empleo de sustratos más económicos. Siordia *et al.*, (2003) evaluaron el efecto de 6 medios de cultivo sólido sobre el crecimiento radial (mm/día) y producción de conidios (conidios/cm<sup>2</sup>) por cepas nativas de sinaloa de *Trichoderma harzianum*, donde demostraron que el medio V8 fue el segundo mejor en la velocidad radial y el tercero en producción de conidios. En este sentido, el uso de un medio económico como el jugo de ocho verduras (V8) puede disminuir costos de producción manteniendo la calidad de los conidios, empleando la fermentación bifásica como método de producción.

### 3. ANTECEDENTES

---

#### 3.1 *Beauveria bassiana*

Es un hongo entomopatógeno descubierto en el año de 1835 por el entomólogo y botánico italiano Agostino Bassi como causante de la muerte del gusano de seda. *Beauveria bassiana* es un género cosmopolita que engloba a hifomicetos haploides que habitan en el suelo de forma natural (Porter, 1973). También es conocido por su capacidad de infectar a un amplio rango de órdenes de insectos como coleópteros, dípteros, heterópteros, homópteros, lepidópteros y tisanópteros. Por esta razón es uno de los hongos más usados en el mundo de manera comercial (Zavaleta-Mejía, 1999).

Seleccionar un agente entomopatógeno para el control biológico es complejo. Pero de manera general hay que considerar al insecto, al microorganismo y al ecosistema donde residen, esto porque la virulencia y la especificidad de cada microorganismo varían. Montesinos-Matias, (2008) reportó que las características que hacen que *Beauveria bassiana* tenga potencial como controlador biológico, son la viabilidad, la velocidad de crecimiento radial, y la densidad superficial de conidios. Estas variables influyen en la virulencia, el tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) y el porcentaje de mortalidad de los hongos entomopatógenos. Las condiciones ambientales que influyen sobre la germinación de esporas, crecimiento micelial y esporulación son: humedad y temperatura. (Walstad *et al.*, 1970).

##### 3.1.1 *Beauveria bassiana* 885.2

Actualmente en México no está permitido la liberación de organismos genéticamente modificados (OGM) (Gutiérrez *et al.*, 2015). Sin embargo la biotecnología ha desarrollado, por genética clásica o biología molecular, estrategias para incrementar la virulencia de los controladores. El Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) patrocinaron investigaciones sobre la inducción de mutaciones para impulsar el mejoramiento genético de cultivos alimentarios e industriales con el fin de obtener nuevas variedades mejoradas. Con el uso de sustancias químicas o radiaciones se inducen mutaciones al azar en el genoma que generan cambios en los organismos

y luego se seleccionan los individuos que presenten las características deseadas. De hecho las mutaciones espontáneas amplían artificialmente la diversidad genética, esto sin salir del régimen de bioseguridad establecida en México. Robledo-Monterrubio *et al.*, (2009) aislaron una cepa virulenta de *Beauveria bassiana* desarrollando la mutagénesis inducida por radiación. Esta cepa (*Beauveria bassiana* 885.2) aumentó la virulencia directamente proporcional a la mejora de los rasgos fisiológicos. La cual puede ser la forma más eficiente para incrementar la efectividad de un controlador dentro de su ambiente y del régimen de bioseguridad. La mutación inducida para el mejoramiento de organismos ha tenido consecuencias económicas favorables en la agricultura y la producción de alimentos, valoradas en miles de millones de dólares, y se ha traducido en millones de hectáreas de tierra cultivada (Gutiérrez *et al.*, 2015).

### **3.2 Formulados biológicos**

Es una mezcla de componentes, de tal manera que el producto final tiene como ingrediente activo un controlador biológico, pero que también sea de fácil aplicación en campo. La mayoría de los formulados con hongos entomopatógenos usan disolventes o diluyentes como vehículo, sólidos o líquidos (Góngora *et al.*, 2009), derivados de fuentes naturales, minerales o sintéticas. Al tener como base un microorganismo vivo muestran potencial para disminuir los daños que ocasionan los químicos (Feng *et al.*, 1994)

La producción y comercialización de estos productos han estado limitadas por: la estabilidad del controlador en el medio; por el contenido de humedad, que es uno de los factores más atendidos en la formulación de hongos entomopatógenos; por el almacenamiento en atmósferas con nitrógeno y CO<sub>2</sub>; por los tiempos prolongados en el proceso de producción; por el tiempo de fijación sobre insectos; por la temperatura de almacenamiento de los formulados (Mata, 2008). Además en el mercado estos productos deben de competir tanto en precio como en efectividad con los productos químicos disponibles. Sin embargo la mayor parte de la información generada en esta área no está disponible en la literatura científica, pues forma parte del acervo privado de las empresas que los producen (Serrano y Galindo, 2007). El costo de producción juega un papel importante en el precio del producto final, en el cual se encuentran barreras que no permiten disminuir los costos. Por ejemplo, debido a la naturaleza biológica del agente se requiere de un manejo adecuado durante su producción y aplicación. Además aunque

un agente de control biológico sea más efectivo que un producto químico, la comercialización se ve limitada porque el mercado no es lo suficientemente grande para justificar los costos de registro dado que los tiempos para llevar a cabo las evaluaciones del producto y los costos de registro son generalmente altos (Serrano y Galindo, 2007). Esto hace que los formulados biológicos tengan una participación muy pequeña del mercado en México. Sin embargo, las expectativas que existen para el uso del control biológico harán que aumente esta fracción de manera lenta pero continua debido a los problemas a los que se enfrenta el mundo actualmente (Guerra *et al.*, 2001).

Generalmente existen dos clases de formulaciones de agentes de control biológico, las formulaciones sólidas, en donde se usan materiales inertes como: talcos, arcillas, bentonitas, tierra de diatomeas, silicatos, harinas de diferentes clases para prepararse como polvos humectables y para espolvoreo (Palacios, 2014). Para elaborar estas formulaciones hay que seleccionar el soporte mas adecuado para matener la estabilidad del principio activo. Para esto es importante tener en cuenta el pH, capacidad de absorcion de agua, las propiedades de intercambio ionico y el tamaño de partícula del material inerte a seleccionar, para ser mezcladas y obtener el producto final (Palacios, 2014).

En el caso de las formulaciones líquidas, se emplean alcoholes etílico, isopropílico, butílico como disolventes. Se han obtenido resultados favorables con gel de sílice pero su principal desventaja es el costo de producción a nivel industrial (Palacios, 2014). Por otro lado, se han presentado problemas como la baja persistencia del hongo en el medio debido a su susceptibilidad a la radiación solar, por tanto la búsqueda se ha centrado en protectores para luz ultravioleta (UV). En este sentido el uso de aceites vegetales (soya, girasol, canola, cacahuate, etc.) por ser aceptables para sistemas de producción orgánicos, y como estrategia para incrementar la vida de anaquel del formulado, son buenos candidatos para mejorar las formulaciones (Palacios, 2014; Wraight *et al.*, 2001). Estos aceites funcionan como adherente y al efecto del agua contenida en la formulación favorece al hongo en el proceso de germinación. Mientras que en la formulación sólida, la germinación del hongo depende de las condiciones de humedad del ambiente.

### 3.2.1 Formulados con *Beauveria bassiana*

Las unidades infectivas de *Beauveria bassiana* varían dependiendo del tipo de cultivo, las blastosporas o conidios sumergidos se obtienen en cultivos líquidos, los conidios aéreos se forman sobre sustratos porosos. Actualmente los formulados con base en conidios aéreos son los más estudiados y aplicados (Doelle *et al.*, 1992).

El micelio es sensible a las condiciones ambientales por lo que requiere ser encapsulado, para obtener esta protección y poder ser usado (Walker y Connick, 1983). Las blastosporas presentan al igual que el micelio, sensibilidad a las condiciones ambientales. Además en la formulación se pueden aglomerar impidiendo su aplicación con equipos convencionales. Los conidios son los que presentan más ventajas en el manejo, formulación y aplicación, ya que son más resistentes y de mejor aplicación (Doelle *et al.*, 1992).

Bastidas *et al.*, (2009) al evaluar preformulados de *Beauveria bassiana* (bálsamo) sobre el control de la broca de café, observaron que la mortalidad de la broca de café a nivel laboratorio ocurrió entre los días 4-7 después de la inoculación. En las pruebas de campo la combinación de las esporas con coadyuvantes como tween 80, glicerina y carboximetilcelulosa permitieron alcanzar una mortalidad del 32.32 % comparado con 15.09 % presentado por las esporas en polvo. Por su parte Hidalgo *et al.*, (1998) evaluaron diferentes formulados de *Beauveria bassiana* sobre el control de *Sitophilus zeamais* encontrando que las formulaciones basadas en aceites mostraron ser mejores a las basadas en agua. Por ejemplo, el aceite de soya al 15 % mostro ser eficaz para formulaciones con *Beauveria bassiana* causando el 100 % de mortalidad en picudo negro del plátano (Carballo, 2001).

### 3.2.2 Evaluación de formulados biológicos

Para determinar la patogenicidad y virulencia de un microorganismo se llevan a cabo bioensayos donde se determina la letalidad en el tiempo, dosis y concentración que maten al 50 % la población afectada (Monzón, 2001). El bioensayo se lleva a cabo sobre organismos vivos en condiciones controladas de humedad y temperatura. Las características de los insectos modelo que se emplean son: reproducción durante todo el año, facilidad de establecimiento y manejo (Soto, 2003).

Entre los insectos modelo se encuentran: gallinita ciega (*Phyllophaga spp.*), chapulines (*Sphenarium purpurascens*), gusano de la harina (*Tenebrio molitor*). Este último tiene una tasa de reproducción elevada de entre 500 a 1000 larvas por cada individuo. Cuando se almacenan las larvas maduras de *tenebrio molitor* a bajas temperaturas rápidamente se convierten en ninfas y adultos (Soto, 2003). Su ciclo de vida, dura aproximadamente de 4 a 5 meses a 28 °C y comprende 4 etapas (Figura 3).

- 1) Huevecillos: 10 días
- 2) Larvas: 2-3 meses creciendo hasta la madurez y mudando la cutícula
- 3) Ninfas: de 15-20 días, prácticamente inmóvil
- 4) Adulto: viven aproximadamente de 2 a 3 meses, al inicio son de color marfil, a los 2-3 días adquieren un color negro-marrón. Son sexualmente maduros a los 10-12 días y la ovoposición empieza a los 10 días. Lo que da un total de 4 a 5 meses para completar su ciclo de vida.

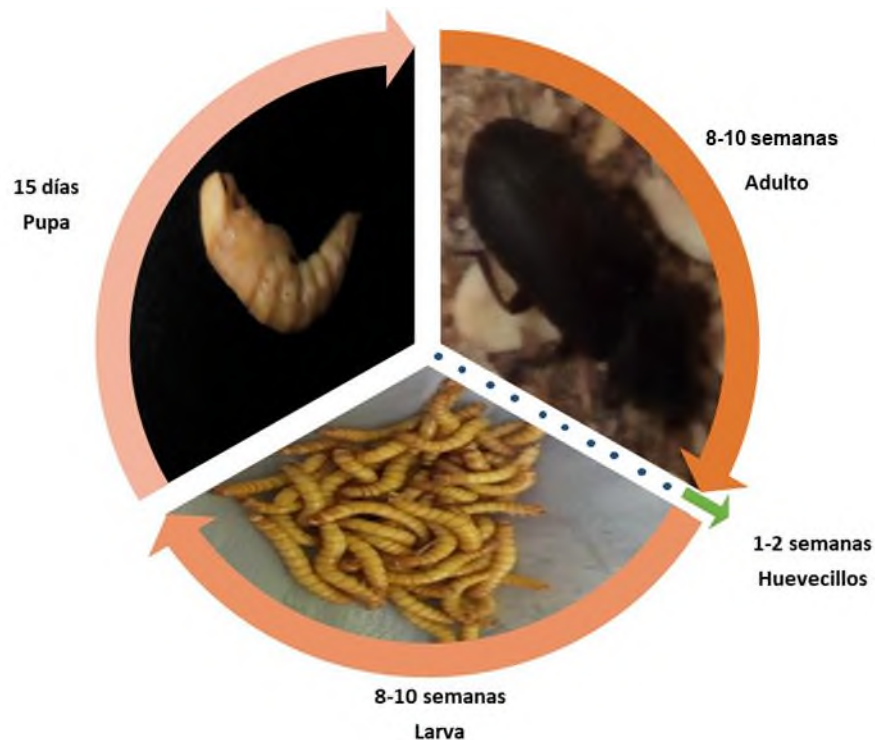


Figura 3. Ciclo de vida del *Tenebrio molitor*

#### 4. JUSTIFICACIÓN

---

La transformación del ecosistema agrícola tradicional en agroecosistemas, con la revolución verde, ha ocasionado problemas en el medio y en la salud humana. Aunados a la disminución en la productividad que se ha presentado por la sobreexplotación de los recursos naturales. Con el paso del tiempo estos problemas se han incrementado junto con la necesidad de solucionarlos, empleando métodos cada vez más agresivos. Para disminuir las consecuencias de estos problemas se han establecido una serie de técnicas que mantienen el equilibrio de manera económica, sustentable y social, denominadas manejo integrado de plagas (MIP). Con esta metodología se evitan los daños colaterales como los que producen los insecticidas sintéticos. Dentro de las técnicas de MIP encontramos al control biológico (CB) que emplea enemigos naturales para el manejo de poblaciones plaga. Dentro de estos enemigos naturales se encuentran los hongos entomopatógenos cuyo modo de acción es por contacto. Además, la biotecnología se ha encargado de mejorar las características deseables de estos microorganismos sin salir del régimen de bioseguridad en México, empleando técnicas de genética clásica por medio de radiación para la generación de mutantes, los cuales no son considerados organismos genéticamente modificados (OGM). Por ejemplo *Beauveria bassiana* 885.2, una cepa desarrollada por mutagénesis inducida por radiación para aumentar la virulencia. Ya se han empleado formulados biológicos a base de estos hongos generados por técnicas de genética clásica en la agricultura, pero presentan dificultades en cuanto a su producción y aplicación. En la producción, por los períodos prolongados del proceso; y en la aplicación, por la concentración variable y su baja prevalencia debido a los factores abióticos como radiación ultravioleta (UV), humedad y períodos cortos de vida de anaquel. Una estrategia para minimizar el efecto de los factores abióticos es la adición de aceites vegetales a los formulados; porque estos protegen a los conidios, facilitan su adhesión y el proceso de infección. Este trabajo se enfocó en generar un formulado con aceite vegetal como adherente a base de conidios de la cepa *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica (FBF), usando dos medios en la fermentación líquida, jugo V8 y Sabouraud dextrosa. Además se evaluó el uso de aceites vegetales sobre la vida de anaquel del formulado.

## 5. HIPÓTESIS

---

Los formulados adicionados con aceite vegetal tendrán un efecto positivo sobre la viabilidad, tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) y vida de anaquel de los conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica.

---

## 6. OBJETIVOS

---

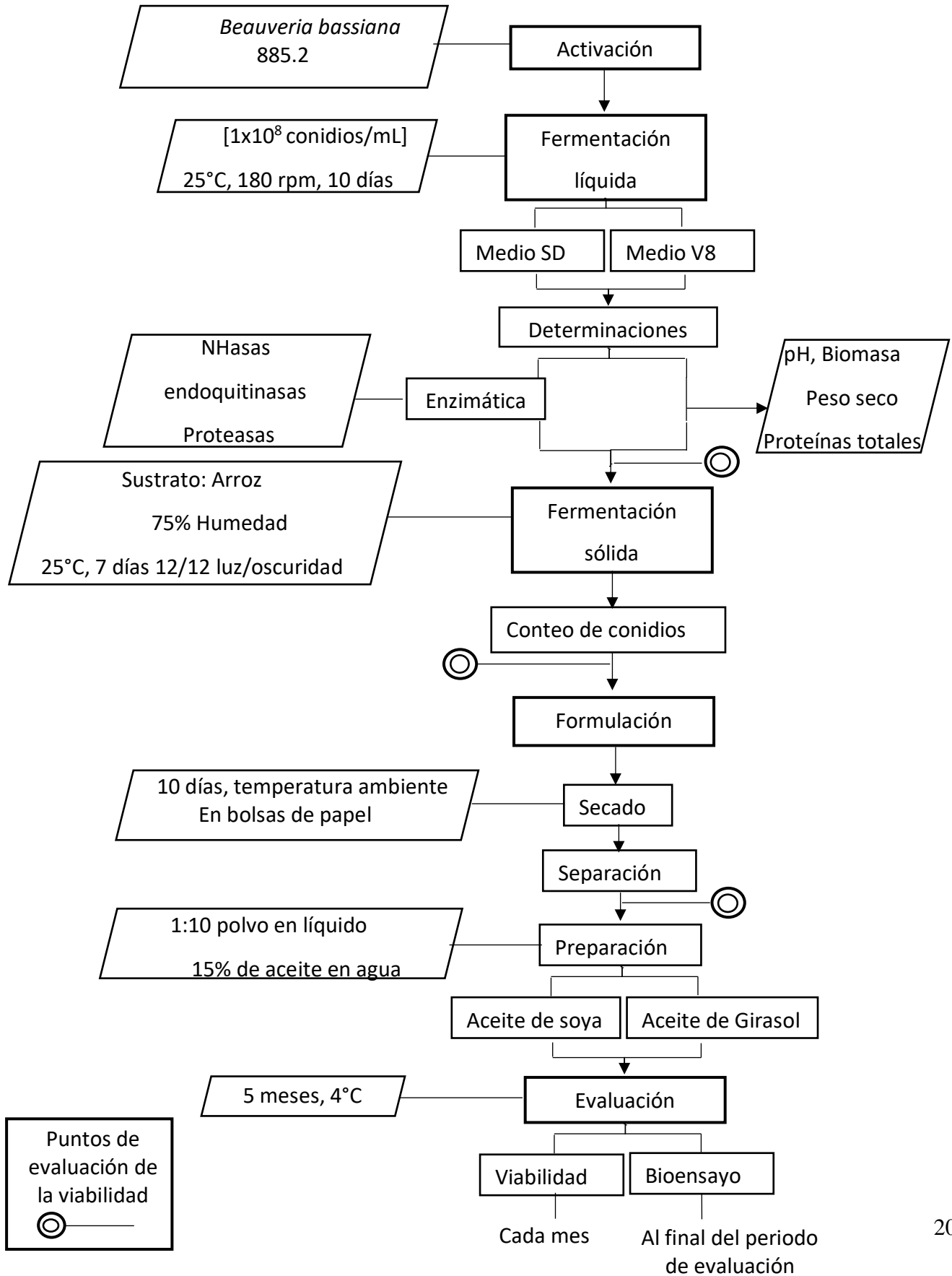
### 6.1 General

Evaluar el efecto de la adición de aceite vegetal sobre la viabilidad, tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) y vida de anaquel de los conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica.

### 6.2 Específicos

- ∞ Evaluación de dos medios de cultivo sobre la viabilidad y producción de quitinasas (exoquitinasas y endoquitinasas) y proteasas de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 en la fase líquida de la fermentación bifásica.
- ∞ Obtener conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 por fermentación bifásica.
- ∞ Evaluar el efecto de adición de dos tipos de aceites vegetales a un formulado de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica sobre la viabilidad, tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) y vida de anaquel.

7. MATERIALES Y MÉTODOS



## 7.1 Microorganismo

Se empleó la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2 (donada por el Dr. Octavio Loera de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa). Ésta se activó en cajas Petri con agar dextrosa Sabouraud (SDA) (SIGMA life science) al 4 % (p/v) enriquecido con 0.05 % de extracto de levadura (SIGMA life science), las cajas se incubaron por 8 días a 25 °C. Pasado ese tiempo, en un frasco con 30 ml de agua destilada estéril se agregaron cuadritos cortados de manera aséptica, del cultivo obtenido de la activación para generar un stock, el cual se conservó a 4 °C, asegurándose la integridad genotípica y fenotípica de la cepa (Montesinos-Matias, 2008 Núñez-Gaona, 2009).

## 7.2 Fermentación bifásica

Las fermentaciones líquidas se llevaron a cabo por triplicado en matraces con 100 mL de medio que se inoculó con una concentración de esporas de  $1 \times 10^8$  conidios/mL incubándose a 25°C y 180 rpm por 10 días. Se evaluó el efecto de 2 medios de cultivo sobre la viabilidad de los conidios producidos: caldo dextrosa Sabouraud (SD) al 4 % (p/v) enriquecido con 0.05 % de extracto de levadura (EL); y un medio basado en jugo de 8 verduras (200 mL/L) y glucosa (11.6 g/L) (Siordia *et al.*, 2003). Se tomaron muestras cada 24 horas para realizar las determinaciones correspondientes, extrayendo 5 mL de cada matraz, colocando 1 ml en 2 tubos eppendorf para las determinaciones enzimáticas y peso seco; el resto para determinar el pH y conteo de conidios. Se evaluó el pH del medio durante la fermentación con un potenciómetro (HI208 Hanna) calibrado a pH 4, 7 y 10. Las muestras se agitaron perfectamente y se le colocaron el electrodo hasta que alcanzó el equilibrio y registrando el valor obtenido.

La fermentación sólida se llevó a cabo con el inóculo obtenido de la fermentación líquida, con arroz (*Oryza sativa L.*) como sustrato, en contenedores de plástico de 500 mL a los cuales se adicionaron 100 g de arroz con una humedad final del 75 % (75 mL de agua destilada estéril y 75 mL de inóculo proveniente de la fermentación líquida), se inocularon con  $2.35 \times 10^{12}$  conidios/mL obtenidos en medio SD y  $1.02 \times 10^{12}$  conidios/mL del medio V8. Posteriormente las cajas con el sustrato inoculado se incubaron a 25 °C por 7 días con un fotoperiodo de 12/12 h (luz/oscuridad)

(Monzón, 2001). Cada 24 h se extrajeron muestras de 1 g de materia fermentada para determinar la concentración de conidios.

## 7.3 Cinética de crecimiento

### 7.3.1 Conteo de conidios y determinación de biomasa en medio líquido

El número de conidios en medio líquido se determinó mediante la metodología descrita por Monzón (2001) para el cual con 1 mL de muestra y se hicieron diluciones seriales  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  para facilitar el conteo. El conteo se realizó en un microscopio óptico (Motic Modelo DM45C-F) con objetivo 40X empleando una cámara de Neubauer (Núñez-Gaona 2009).

La biomasa se determinó por peso seco (Azamar, 2016), primero las muestras se centrifugaron a 11500 rpm por 10 min (Thermo Scientific, Modelo Heraeus Megafugue 16R), el sobrenadante se descartó. Después se añadió 1mL de agua destilada estéril y se centrifugó a las mismas condiciones, este ciclo se repitió dos veces. Posteriormente el precipitado se secó a 60°C por 72 horas en horno (Scorpion Scientific) pesando los tubos y la biomasa se obtuvo por diferencia de pesos entre los tubos con la muestra y el vacío.

En medio sólido el conteo de conidios se llevó a cabo empleando la metodología descrita por Monzón (2001). Para lo cual se extrajo aproximadamente 1g de muestra de cada contenedor, se le añadieron 20 mL de agua destilada y se hicieron diluciones seriales desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ . El conteo se realizó en un microscopio óptico (Motic Modelo DM45C-F) con objetivo 40X empleando una cámara de Neubauer (Núñez-Gaona 2009).

## 7.4 Determinaciones

### 7.4.1 Viabilidad

Esta se determinó al final de las fermentaciones con cada tratamiento, realizando una modificación a la técnica empleada por Monzón, (2001), ésta consistió en tomar alícuotas de 1 mL o 1 g de materia fermentada, dependiendo del tipo de cultivo, y se realizaron diluciones seriales hasta alcanzar una concentración entre 50 y 300 conidios en 500  $\mu$ L de agua destilada

estéril; este volumen se inoculó en placas de medio SDA que se incubaron a 25 °C, después de 24 h se observó la aparición de colonias. El porcentaje de viabilidad se definió como la relación del número de colonias que emergieron en este tiempo entre el número de conidios contados por cámara de Neubauer, multiplicado por 100.

#### **7.4.2 Proteínas totales**

Las proteínas totales se determinaron mediante el método de micro ensayo de Bradford (1976). Se agregaron 200 µL de una mezcla de reactivo de Bradford (0.01 % p/v azul de comassie-250, 4.7 % de etanol y 85 % p/v de ácido fosfórico, diluido 1:5) en cada pocillo de una microplaca de 96 pozos. Posteriormente se añadieron 10 µL de muestra por pocillo y se midió por triplicado. La mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 5 min y después de esto se midió la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas (Bio Rad iMark™ Microplate Reader). La concentración de proteína total se determinó con una curva estándar de seroalbúmina bovina (Equitech-Bio, Inc) (Anexo 1).

#### **7.4.3 Actividad N-acetilhexosaminidasa**

Se determinó mediante una modificación a la metodología propuesta por Tronsmo y Harman (1993). A 200 µL de muestra se le adicionaron 200 µL de solución amortiguadora de citratos-fosfatos 0.2 M, a pH 5.6 y 200 µL de una solución de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (pNAG) 1 mg/mL, la mezcla se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora en una incubadora con agitación orbital (New Brunswick Scientific Excella E24 Incubator Shaker Series). Después de este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 1mL de NaOH (0.02 M), se agito muy bien y se le midió la absorbancia a 400 nm con un lector de microplacas (Bio Rad iMark™ Microplate Reader). La cuantificación se determinó mediante una curva estándar de p-nitrofenol (Anexo 1). La actividad N-acetilhexosaminidasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1µmol de p-nitrofenol por mL de muestra por minuto bajo las condiciones de la reacción (Tronsmo y Harman, 1993).

#### **7.4.4 Actividad endoquitinasa**

Se determinó empleando como sustrato una suspensión de quitina coloidal al 1 % (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.7 (Tronsmo y Harman 1993). A 100 µL de la

muestra se le adicionaron 100  $\mu$ L de sustrato, esto se incubó a 30 °C y 180 rpm por 24 horas en una incubadora con agitación orbital (New Brunswick Scientific Excella E24 Incubator Shaker Series). Después de este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 1 mL de agua destilada, se agitó y se le midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro UV (Jenway 6700). Para los testigos, a 100  $\mu$ L de la muestra se le adicionó 100  $\mu$ L de sustrato y se aforó a 1mL, se agitó muy bien y se le midió la absorbancia a 510 nm en un espectrofotómetro UV (Jenway 6700). Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina coloidal en un 5 % a 30 °C por 24 horas. Esto se obtuvo restando las absorbancias de las muestras a las absorbancias de los testigos.

#### 7.4.5 Proteasas

A 250  $\mu$ L de muestra se adicionaron 250  $\mu$ L de solución de caseína al 1% (p/v) en amortiguador de fosfatos (50 mM a pH 7), y se incubó a 30 °C durante 10 minutos. Después de este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético 0.4 M y se centrifugó a 11100 g durante 15 minutos a 4 °C (Thermo Scientific, Modelo Heraeus Megafugue 16R). Posteriormente a 250  $\mu$ L del sobrenadante se le adicionaron 250  $\mu$ L del reactivo de folin al 20 % e incubando a 30 °C por 30 minutos. Pasando ese tiempo la mezcla se agito muy bien y se le midió la absorbancia a 665 nm con un lector de microplaca (Bio Rad iMark™ Microplate Reader) utilizando una curva estándar de tirosina. Una unidad proteolítica se define como la cantidad de enzima que produce el color equivalente a 1 micromol de tirosina por minuto en 2 ml de mezcla de digestión a pH 7 y 30 °C (Ichishima, 1970).

### 7.5 Formulación

Al final de la fermentación sólida, el sustrato de cada caja se colocó en bolsas de papel a temperatura ambiente por 10 días, lo cual representó una modificación a la metodología propuesta por Díaz *et al.*, (2016). Después de este periodo, el sustrato se tamizó para obtener un polvo fino que se empleó en la formulación.

Los formulados se realizaron por triplicado con una relación 1:10 de polvo/agua-aceite con una concentración de conidios de  $5 \times 10^{10}$  /gramo de sustrato fermentado seco, mezclados con 15 % de aceite de soya o girasol (Carballo, 2001) y agua destilada estéril (Tabla 2). Los testigos fueron

los polvos obtenidos de cada medio, sumergidos en agua destilada estéril. Los formulados y los testigos se almacenaron a 4 °C durante 5 meses, la viabilidad se evaluó mes con mes; al final de este tiempo se realizó un bioensayo con la metodología descrita a continuación.

**Tabla 2. Composición de los formulados de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 obtenidos por fermentación bifásica.**

Medio de origen en fase líquida	Concentración de conidios/g de polvo	Relación (polvo/agua-aceite)	Tipo de aceite	Volumen de agua (mL)	Volumen de aceite (mL)	% de aceite
V8						
V8GIRASOL						
SD			Girasol			
SDGIRASOL						
V8	5X10 <sup>10</sup>	1:10		7.65	1.35	15
V8SOYA						
SD			Soya			
SDSOYA						

De esta manera se obtuvieron 4 formulados con un volumen final de 10 mL cada uno.

## 7.6 Bioensayos

La viabilidad se evaluó empleando la metodología descrita por Montesinos-Matias (2008). Se extrajo 1 ml de cada formulado, se ajustó la concentración a 1x10<sup>8</sup> conidios/mL. Se emplearon larvas de *Tenebrio molitor* con un tamaño promedio de 2 a 2.5 cm. Los bioensayos consistieron en 4 grupos de 12 larvas cada uno, 1 testigo y 3 réplicas. Se tomaron las larvas, previamente desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 15 % (posteriormente se lavaron con agua destilada estéril), y se sumergieron 15 segundos en la suspensión de conidios, se secaron bajo condiciones asépticas y se colocaron en cajas Petri agregando 10 gramos de avena estéril. Las cajas se colocaron dentro de una cámara húmeda, incubándose a 25 °C con un foto periodo de 12/12 h luz/oscuridad. Cada 24 horas se retiraron los cadáveres, los cuales se colocaron en una cámara húmeda individual hasta observar la emergencia del hongo.

## 7.7 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 empleando un software estadístico (Minitab™).

Para la determinación del  $TL_{50}$  se empleó el método probit (la inversa de la función acumulada de la distribución normal estándar) con un límite de confianza del 95 %.

---

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 8.1 Biomasa en medio líquido

La fermentación es un proceso dinámico que constantemente sufre cambios, por tanto el medio de cultivo cambia conforme pasan los días de la fermentación, porque el medio se va deteriorando nutricionalmente durante el proceso de crecimiento del hongo, haciendo que cambie la apariencia del medio. La producción de biomasa en los dos medios de cultivo líquido evaluados, se observa en la Figura 4. Comenzó a generarse desde el primer día de la fermentación en ambos medios. La mayor producción de biomasa alcanzada fue de 8.6 mg/ml al día 6 en medio SD, comparado con 6.3 mg/ml a los 9 días de cultivo en el medio V8. El medio SD al ser definido y uno de los más usados para la producción de hongos, es fácilmente asimilado durante la fermentación, ya que contiene fuentes de carbono (dextrosa) y nitrógeno (extracto de levadura) en su composición (Gómez, 2017). Y el medio V8 al no estar definido, solo se sabe que contiene proteínas y carbohidratos, dificultando la descomposición de los nutrientes, ocasionando a su vez diferencias en la producción de biomasa. Respaldando lo anterior, existen diversos estudios que muestran el comportamiento de los microorganismos en relación al medio de cultivo en cual se desarrollan (Vidal *et al.* 1998; Ibraim *et al.*, 2002). El desbalance entre las fuentes carbonadas y nitrogenadas es un factor con un papel importante en el crecimiento, particularmente las fuentes de nitrógeno que favorecen el crecimiento micelial (Jenkins y Prior, 1993; Elósegui *et al.*, 2003).

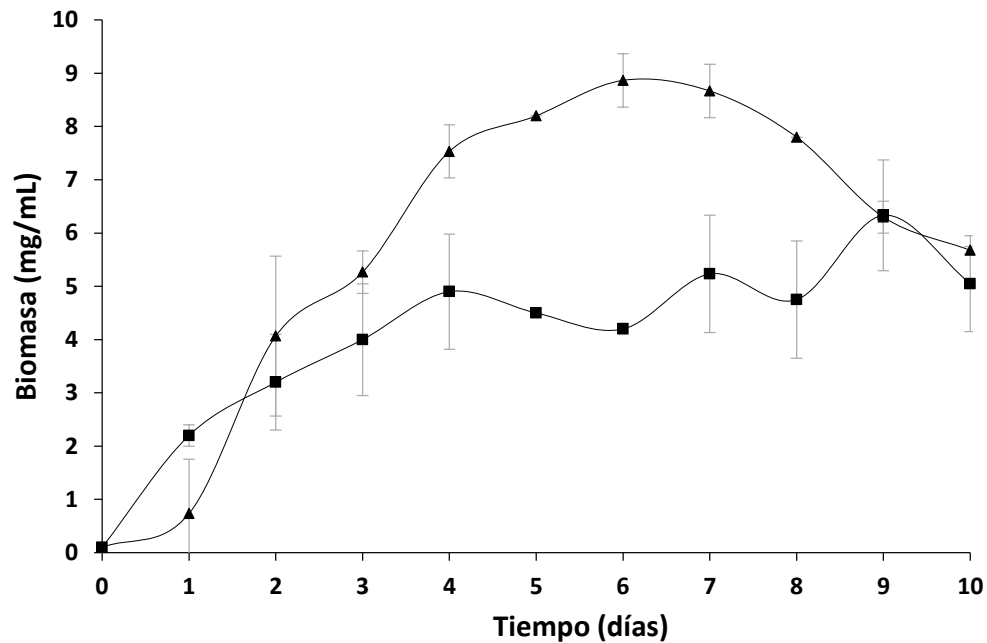


Figura 4. Producción de biomasa de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida en dos medios diferentes: SD (▲) Y V8 (■).

## 8.2 Producción de conidios en medio líquido

La figura 5, muestra la producción de conidios durante la fermentación en medio líquido con los medios evaluados. Se observó que ésta comenzó en el cuarto día, alcanzando los mayores títulos al séptimo día, independientemente del medio evaluado. Sin embargo, los valores obtenidos con el medio V8 fueron menores ( $1.02 \times 10^{12}$  conidios/mL.) en comparación con los alcanzados en el medio SD ( $2.35 \times 10^{12}$  conidios/mL.) siendo prácticamente el doble a los obtenidos en V8. Lo anterior, se atribuye a la composición del medio de cultivo, como se discute en el apartado anterior. Recientemente Gao *et al.*, (2007) también evaluaron la influencia de la concentración de carbono y la proporción de carbono a nitrógeno (C:N) en seis cepas fúngicas de control biológico. Donde sus resultados arrojaron que el crecimiento y la esporulación de hongos depende de la cepa y la composición del medio; por lo tanto, considerar que la complejidad de los requerimientos de nutrientes es esencial para mejorar los rendimientos de los agentes de control biológico. En este trabajo se alcanzó a observar diferencias en el tamaño de los conidios, siendo menores en el medio V8, esto estuvo relacionado con la producción de biomasa porque su tamaño afectó al peso de los mismos. Como se observó, la producción de conidios fue

directamente proporcional a la generación de biomasa (Figuras 4 y 5), que coincide con lo reportado por Garcia *et al.*, (2013). El análisis estadístico realizado mostró que existen diferencias altamente significativas ( $\alpha$ : 0.05) entre los medios, para la producción de biomasa y conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 en el séptimo día. Estableciendo este día de fermentación líquida en ambos medios, como el idóneo para la producción de conidios que se utilizaron como inóculo para la fermentación sólida.

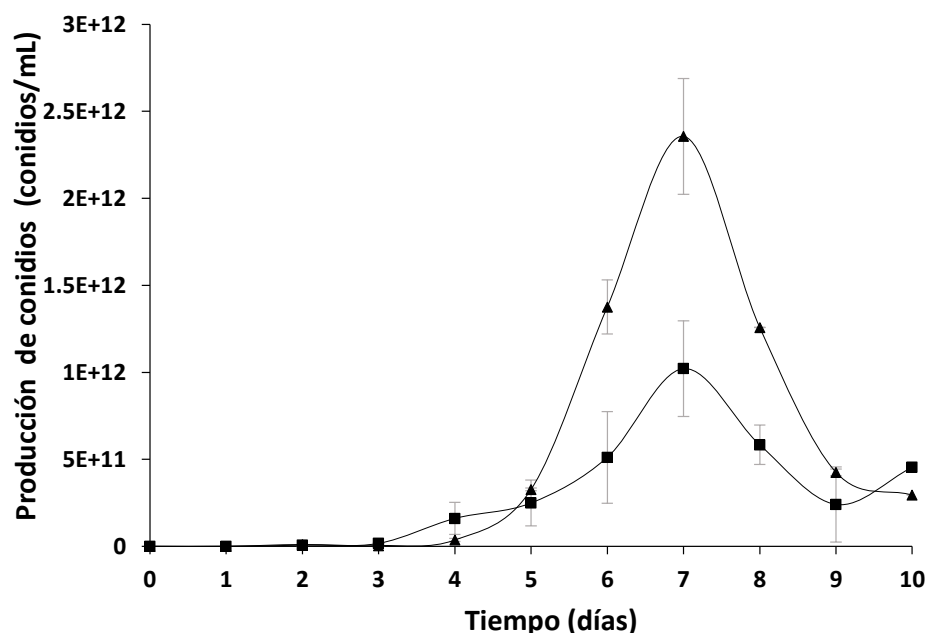


Figura 5. Producción de conidios por *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida en dos medios diferentes: SD (▲) Y V8 (■).

### 8.3 Determinaciones enzimáticas

#### 8.3.1 Actividad exoquitinasas y endoquitinasas

Existe una relación entre las quitinasas, dado que la acción de las endoquitinasas debe preceder a la de las exoquitinasas. Las exoquitinasas se dividen en dos subcategorías, quitobiosidasas y 1-4- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas, esta última actúa sobre los productos oligoméricos obtenidos de la acción de las endoquitinasas (Ramírez-Coutiño, 2009). Este proceso es utilizado por hongos para el crecimiento y germinación de conidios, formación de apresorios y

elongación de hifas (Ulhoa y Peberdy, 1991), heraminetas vitales para el éxito en el crecimiento general del hongo.

Bajo las condiciones empleadas en este trabajo fueron detectadas (0.09 U/mL en SD y 1.03 U/mL en V8) y (0.55 U/mL en SD y 0.32 U/mL en V8) las exoquitinasas y las endoquitinasas respectivamente desde el inicio de la fermentación, lo cual indicaría que son enzimas de naturaleza constitutiva (Ramírez-Coutiño, 2009). La Figura 6A muestra la actividad de las exoquitinasas. Para el medio SD, la mayor actividad específica se observó en el día 3 con 36.90 U/mg proteína (3.95 U/mL), disminuyendo posteriormente para mantenerse en un intervalo de 2.37 a 3.7 U/mL en los siguientes días. Para el medio V8, la actividad exoquitinasa incrementó en el primer día (2.04 U/mL), disminuyendo al siguiente, y a partir del tercero comenzó a incrementar gradualmente hasta alcanzar la máxima actividad al octavo día con 29.59 U/mg proteína (3.28 U/mL), posteriormente este valor disminuyó. Este incremento progresivo durante la fermentación, fue inversamente proporcional al observado para la actividad de las endoquitinasas. La actividad de las endoquitinasas (Figura 6B) disminuyó progresivamente en ambos medios a partir del día 3 para el medio SD y desde el segundo día para el medio V8. Sin embargo, la mayor actividad en el medio SD se alcanzaron en los días 2 y 3 con 3.50 U/mg proteína (0.70 U/mL) y en el medio V8 se alcanzó en el día 1 con 7.78 U/mg proteína (0.34 U/mL). Comparando los valores de actividad específica (Tabla 3) de las enzimas en medio SD con respecto a los obtenidos en medio V8, se observa que para las Endoquitinasas el valor fue mayor en un 55% a lo que corresponde al medio SD con respecto a los obtenidos en medio V8, para las exoquitinasas el valor fue mayores en un 19.82% a lo que corresponde al medio V8 con respecto a los obtenidos en SD. Aunque la información sobre la producción de enzimas quitinolíticas; endoquitinasas y exoquitinasas es escasa en fermentaciones líquidas con *Beauveria bassiana*. Se conoce que *Beauveria bassiana* tiene la capacidad de secretar estas proteínas en el medio en los primeros 4 días de crecimiento (Leopold y Samšičáková, 1970); similares a los resultados obtenidos en este trabajo, donde la concentración de estas enzimas se encuentran mayormente en los primeros días, posteriormente a diferencia de las Endoquitinasas que disminuyen a partir del quinto día, las exoquitinasas siguen aumentando durante los siguientes días de fermentación. El análisis estadístico realizado mostró que existen diferencias altamente significativas ( $\alpha$ : 0.05) entre estas determinaciones y entre los dos medios. Estas diferencias fueron mayores en el caso

de las endoquitinasas en medio V8, donde se obtuvieron valores muy bajos hasta el punto de no poder ser cuantificables. Por otro lado, el desarrollo de productos con agentes de control biológico han obligado a estudiar el modo de acción de los hongos entomopatógenos para determinar la importancia de las enzimas durante el proceso de infección, llevado consigo múltiples estudios sobre estas, resaltando la gran importancia de las enzimas quitinolíticas que actúan directamente sobre la quitina, la cual es el componente principal de la cutícula del insecto o de la pared celular del hongo. Se han empleado técnicas, como la inducción en medios de cultivo para optimizar la producción de estas enzimas, comprobando que medios suplementados con quitina aumentaron la producción de las proteínas totales y de quitinasa en *Beauveria bassiana* (Peteira *et al.*, 2011).

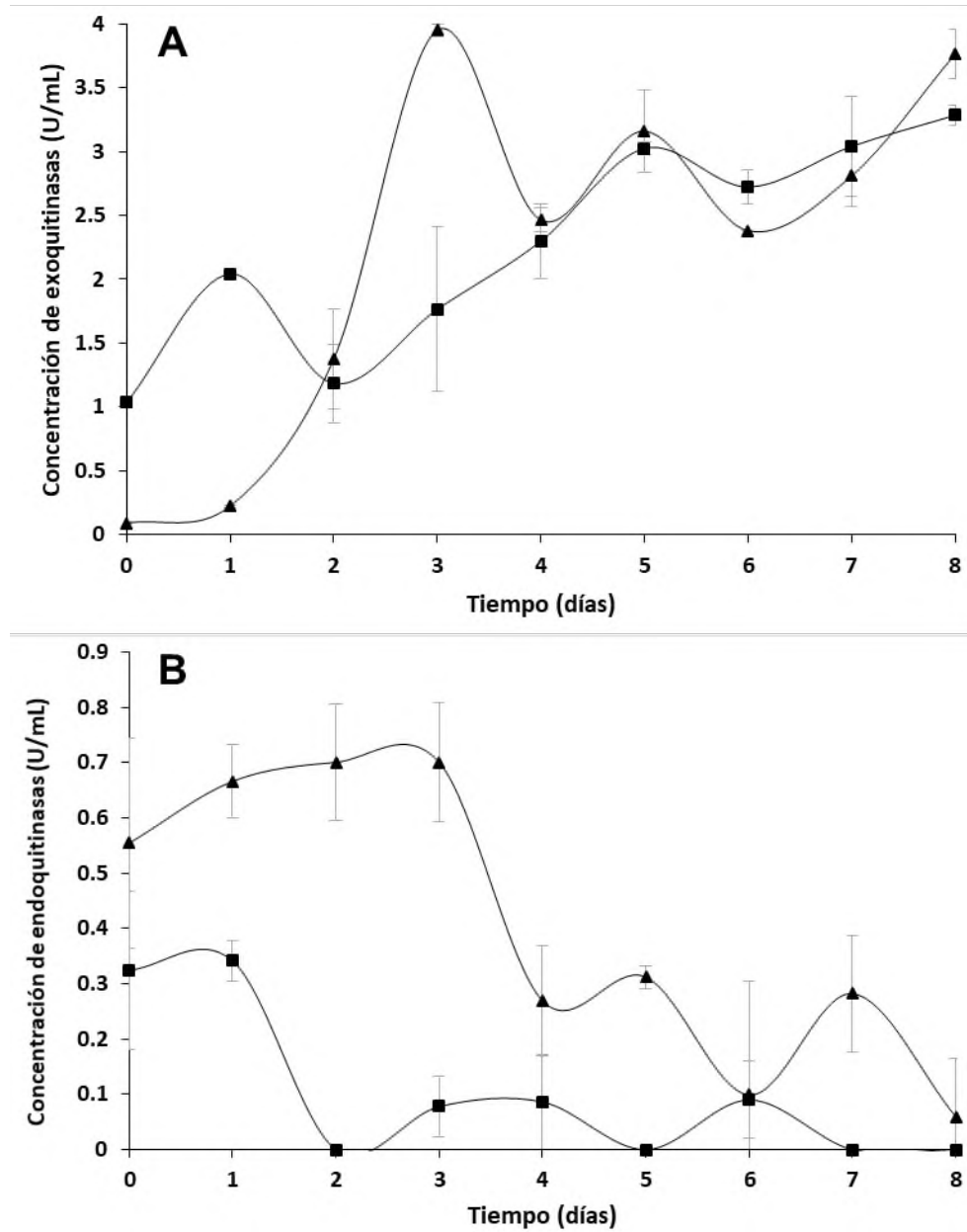
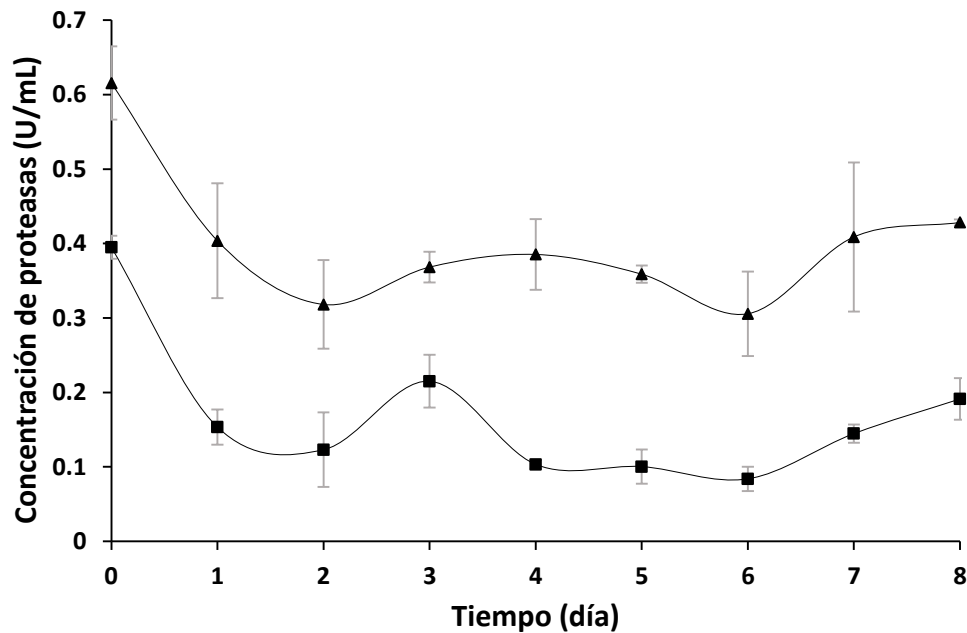


Figura 6. Actividad de quitinasas en fermentación líquida con *Beauveria bassiana* 885.2 A) actividad de exoquitinasas, B) actividad de endoquitinasas en dos medios diferentes: SD (▲) Y V8 (■).

### 8.3.2 Proteasas

El perfil para la producción de proteasas se muestra en la Figura 7. Se observó que la mayor concentración de proteasas se presentó al inicio de la fermentación (día cero), independientemente del medio empleado. A partir del día 1 esta concentración disminuyó, obteniéndose valores de 0.31 U/mL (medio SD) y 0.12 U/mL (medio V8) en el día 2, después las concentraciones se mantienen prácticamente constantes durante el resto de la fermentación en un intervalo de 0.30 U/mL a 0.42 U/mL para el medio SD. Aumenta a 0.21 U/mL en el tercer día y posteriormente mantenerse en el intervalo de 0.08 U/mL a 0.10 U/mL en los días 4-6, posteriormente comienza a ascender hasta 0.19 al octavo día para el medio V8. En cuanto a la actividad específica (Tabla 3) correspondientes a los valores máximos de actividad volumétrica para las proteasas en medio SD fueron 88.64 (U/mg proteína) en contraste con medio V8 que fueron 15.20 (U/mg proteínas) al principio de la fermentación en ambas. Comparando los valores de actividad específica de las proteasas en medio SD con respecto a los obtenidos en medio V8, se observa que el valor fue mayor en un 83.03% a lo que corresponde al medio SD con respecto a los obtenidos en medio V8. Respaldando lo anterior se tiene el reporte de Ballesteros (2013) en el que obtuvo mayor producción de micelio y bajas concentraciones de proteasas de *Beauveria bassiana* en medio líquido Sabouraud (MLS) y (MLS) con ácido bórico (MLS/AB) con cantidades de carbono y nitrógeno estables, ya que las proteasas hidrolizan moléculas de naturaleza proteica. Cuando existe un equilibrio nutricional, se presenta gran crecimiento micelial llevando a una represión en la producción de proteasas. Esto concuerda con nuestros resultados donde al ser el medio SD un medio definido con cantidades suficientes de carbono y nitrógeno (carbono por la dextrosa y nitrógeno por el extracto de levadura) se obtuvo concentraciones de proteasas al principio de la fermentación, disminuyendo en los días posteriores con gran aumento de biomasa en esos días, similar con lo obtenido en el medio V8 aunque con diferencias significativas entre sí con un nivel de significancia ( $\alpha$ : 0.05).



**Figura 7. Producción de proteasas de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida en dos medios diferentes: SD (▲) Y V8 (■).**

Todas las determinaciones que se realizaron durante la fermentación líquida mostraron diferencias significativas entre sí con niveles de significancia ( $\alpha$ : 0.05). Con esto el medio V8 no tiene efectos positivos sobre el crecimiento, producción de quitinasas y proteasas, estas dos últimas que son de importancia para el crecimiento como para la infección de hongos entomopatógenos. Por la misma importancia que tienen estas enzimas, se han desarrollado trabajos para incrementar la producción de las mismas y mejorar la virulencia de los hongos, tal como la adición de inductores en medios de cultivo (Peteira *et al.*, 2011; Jiménez-Alejandro, 2016). Esto puede complementar a nuestro trabajo, empleando cutícula de insectos como inductores para aumentar la producción enzimática en el medio de cultivo líquido V8, para obtener hongos más virulentos disminuyendo a su vez costos de producción masiva y desarrollar formulados para control biológico.

**Tabla 3. Actividades específicas (AE) de exoquitinasas, endoquitinasas y proteasas de *Beauveria bassiana* producidas en fermentación líquida.**

Enzima	AE (U/mg Proteína)*	
	DS	V8
Exoquitinasas	36.9 ± 2.4	29.6 ± 0.79
Endoquitinasas	3.5 ± 1.34	7.7 ± 1.8
Proteasas	88.6 ± 10	15.2 ± 0.35

\*AE determinada a los valores máximos de actividad volumétrica con los valores de proteína total al tiempo correspondiente.

#### 8.4 pH en medio líquido

El pH del medio juega un papel importante en los procesos fermentativos, directamente en el crecimiento y metabolismo microbiano sobre la producción, estabilidad y actividad de las enzimas, la Figura 8 muestra el perfil de este parámetro durante la fermentación líquida. Inicialmente en el medio SD fue de 6.7 hasta los 4 días, disminuyendo hasta un valor entre 4.5 y 4.2 manteniéndose constante durante 4 días. El medio V8 tuvo un pH inicial de 4.1, en el primer día incrementó hasta 5.8, manteniéndose constante durante 3 días, posteriormente disminuyó al cuarto día hasta 4.9, de igual manera que para el medio SD se mantiene constante durante 4 días más. Sin embargo el valor observado durante estos 4 días en medio V8, fue 1 unidad mayor al del medio SD. Por otro lado, durante este periodo donde el pH permaneció constante se observaron mayores concentraciones de conidios (Figura 5) en ambos medios. En cuanto a la producción de biomasa (Figura 4), en medio SD la biomasa iba aumentando conforme disminuía el pH. A partir del día 4, donde el pH se mantuvo constante la biomasa aumentó considerablemente. En el medio V8 en los primeros 4 días se observó la misma relación, sin embargo a partir del día 4 los valores del pH permanecieron constante durante los próximos pero con una unidad mayor al pH

alcanzado por el medio SD, haciendo que la biomasa en V8 no aumentó más si no por el contrario disminuyó. López-Flores *et al.*, (2016) consideraron que el pH en el medio influye en el crecimiento y metabolismo microbiano sobre la producción, estabilidad y actividad de las enzimas. Así mismo, *Beauveria bassiana* para germinar requiere de un pH entre 4 y 7 (Moore, 1996). Aun cuando el pH no se ajustó en los medios, se observó que durante la fermentación en medio SD con pH inicial de 6.7 disminuyó hasta alcanzar un valor de 4 durante los días 4-7, al igual que en medio V8 con pH inicial de 4.6 varió hasta alcanzar un valor de 5 durante el mismo periodo, mismos días en que se obtuvo el mayor crecimiento de *Beauveria bassiana* mostrando más la relación con la producción de biomasa.

En cuanto a la producción de enzimas tanto quitinasas y proteasas, el pH también fue un factor determinante, en el caso de las exoquitinasas alcanzaron mayor actividad al octavo día, en donde el pH a partir del día 4 se mantuvo con un valor de pH 4, siendo este valor el más ácido en la fermentación. Reforzando lo anterior Jiménez-Alejandro (2016) sostuvo que la mayor producción de exoquitinasas se obtuvo a pH 3 sobre *Beauveria bassiana* empleando cutícula de chapulín como inductor. Para la producción de proteasas la relación con el pH, dado que la mayor actividad se obtuvo en el primer día, este rápidamente disminuyó en los dos primeros días (0.31 y 0.12 U/mL) en medio SD y V8 respectivamente, cuando el pH aún era más alcalino, aumentando un poco más cuando el pH se mantuvo en los días posteriores a pH 4. Esto nos indicaría que la producción de proteasas también requiere de un pH más ácido.

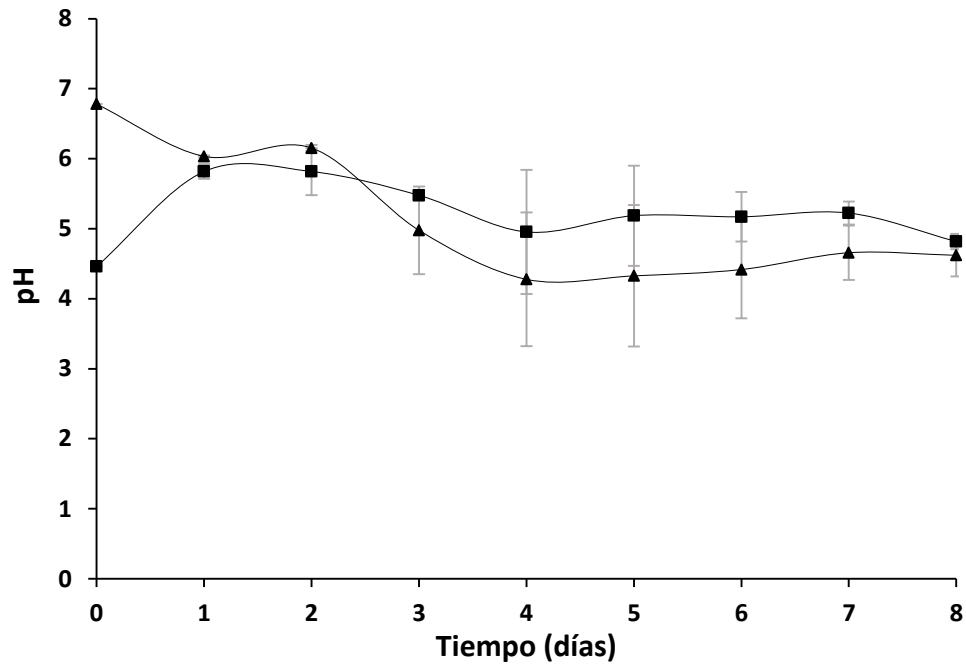


Figura 8. Comportamiento del pH en fermentación líquida con *Beauveria bassiana* 885.2 en dos medios diferentes: SD (-▲-) Y V8 (-■-).

## 8.5 Fermentación en medio sólido

### 8.5.1 Cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana* 885.2

Posterior a la fermentación líquida se llevó a cabo la fermentación sólida para la producción de conidios aéreos. La Figura 9 muestra la producción de conidios para la fermentación en medio sólido. En ella se observó que la concentración de conidios se incrementó gradualmente hasta alcanzar los valores máximos  $2.98 \times 10^{13}$  y  $2.2 \times 10^{13}$  conidios/g de materia fermentada húmeda, con el inóculo proveniente de la fermentación líquida en medio SD y en medio V8 respectivamente al séptimo día. Aun cuando el inóculo empleado es el doble en concentración de conidios en SD que en V8, la producción al final no mostró diferencias significativas ( $\alpha: 0.05$ ) en ambos medios, esto podría indicar que los conidios del V8 inoculados fueron más efectivos que los conidios obtenidos en SD, ya que este último aumentó 12 veces contra las 21.5 veces en medio V8 que fue casi el doble, aunado también a las características de la fermentación bifásica. Respaldao lo anterior se tiene el reporte de Barajas *et al.* (2010) donde mostraron que la

fermentación bifásica tiene el potencial para la producción masiva de hongos entomopatógenos. Esto debido a que al momento de transferir los productos de la fase líquida a la sólida van a crecer en un medio nuevo rico en nutrientes y sin compuestos inhibitorios. En este trabajo la fase sólida fue sobre arroz, que es el sustrato más usado en producciones masivas (Espinel *et al.*, 2008). Los títulos finales de conidios obtenidos fueron mayores en prácticamente cuatro órdenes de magnitud con lo reportado por Neves y Alves (2000) ( $2.7 \times 10^9$  conidios/g), obtenidos en fermentación sólida. En cuanto a este trabajo, los conidios en el día de mayor producción en los dos medios,  $2.9$  y  $2.4 \times 10^{13}$  conidios/g de sustrato húmedo en medio SD Y V8 respectivamente no mostraron diferencias significativas, concordando que la fase sólida de la fermentación bifásica aumenta el rendimiento, produciendo conidios de alta calidad y con elevadas concentraciones (Elósegui, 2006; Espinel *et al.*, 2008). Esto nos indica que aun cuando en la fase líquida con un medio no definido se obtuvo diferencia significativa con un medio definido, al pasar a la fase sólida, este aumenta la concentración de conidios, que se usaron para elaborar los formulados. Comprobando que el uso de un medio económico, como en este caso el jugo de 8 verduras en la fase líquida de la fermentación bifásica disminuiría el costo de producción de conidios en elevadas concentraciones.

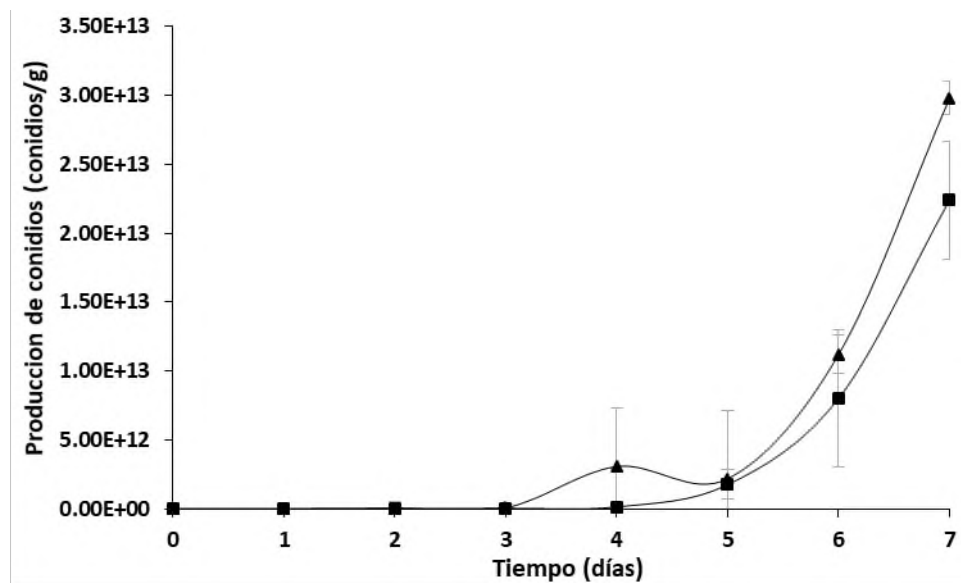


Figura 9. Concentración de conidios producidos por *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación sólida con inóculos provenientes de fermentación líquida en dos medios diferentes: SD (▲) Y V8 (■).

## 8.6 Formulado

Los formulados con conidios de *Beauveria bassiana* producidos por fermentación bifásica con aceite de soya, independientemente del medio en la fase líquida, conforme pasaban los meses desarrollaron una pigmentación roja como muestra la Figura 10. Esta coloración que se ha relacionado en la literatura con la presencia de una toxina, posiblemente una “oosporeina” con actividad bactericida y esta toxina está relacionada con el cambio de color en los cadáveres de insectos (Eyal *et al.*, 1994) así como evitar la proliferación de otros microorganismos dentro del cadáver (Sánchez, 2001). Aunque es de importancia la caracterización posterior de este pigmento para comprobar la relación con lo mencionado por la literatura, la producción de este pigmento en nuestro formulado podría indicar la eficiencia del aceite de soya para conservar la integridad de los conidios.

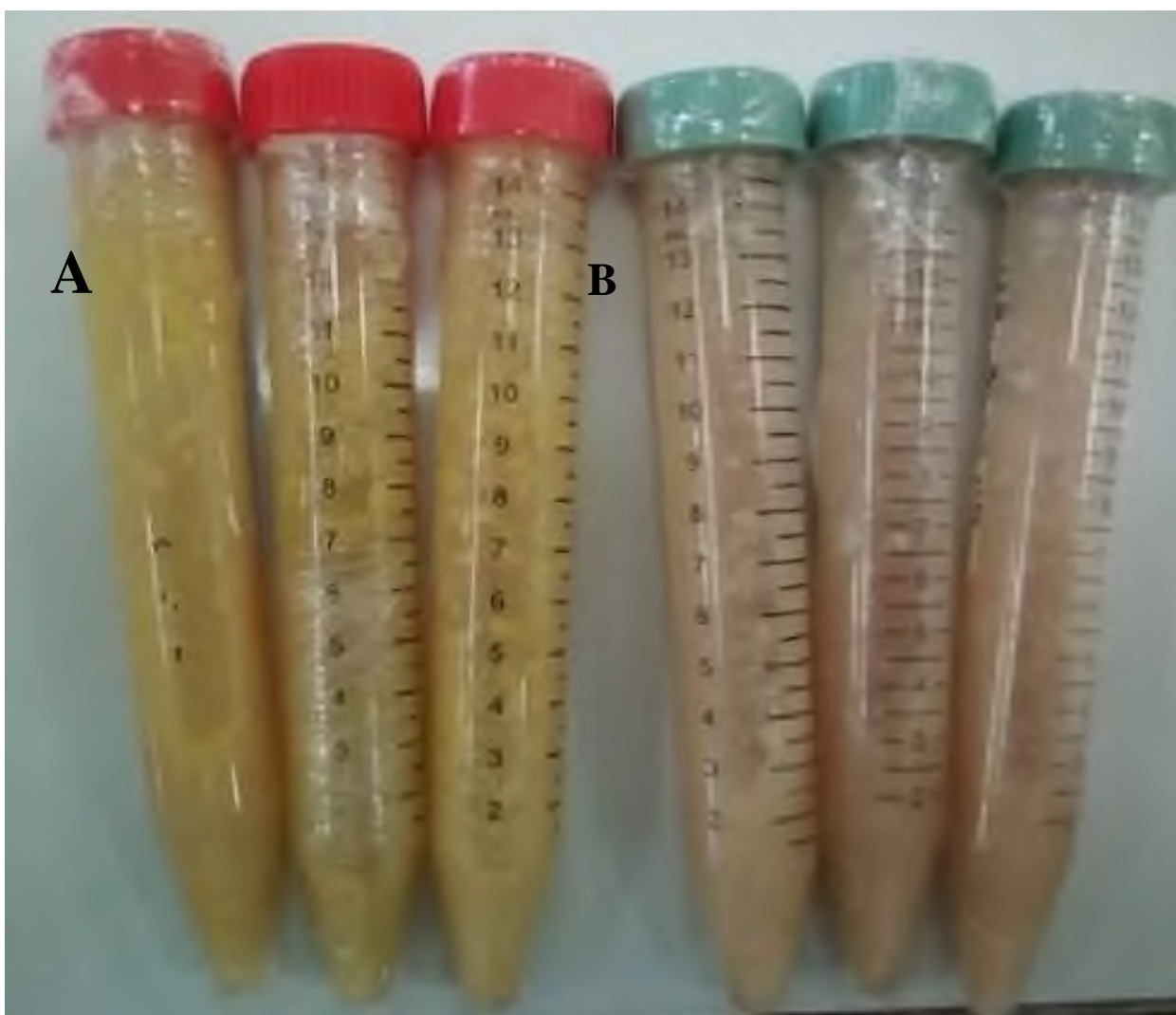


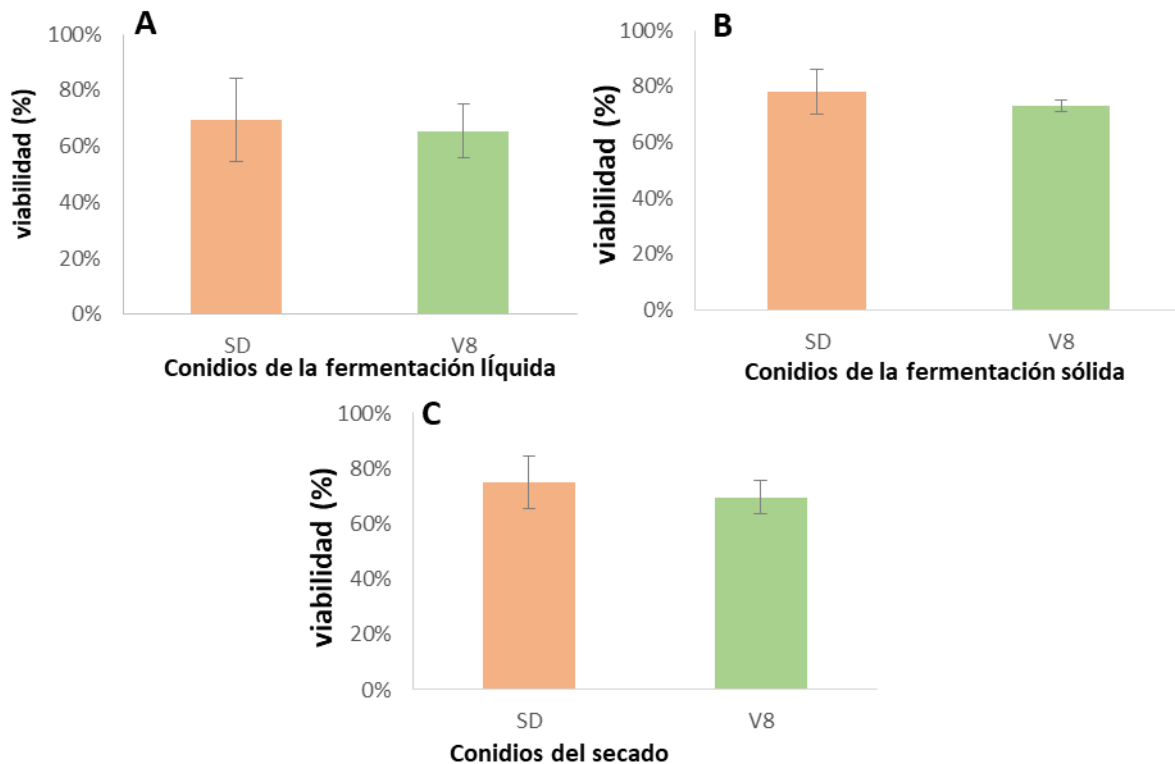
Figura 10. Apariencia de los formulados después de 5 meses, A) formulados con aceite de girasol, B) formulados con aceite de soya.

## 8.7 Parámetros de calidad

### 8.7.1 Viabilidad

Con base en los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento y producción de conidios en fermentación líquida (Figuras 4 y 5), se determinó el día 7 como el óptimo para el crecimiento y producción de conidios, calculándose el porcentaje de viabilidad para los conidios producidos hasta ese día. Los valores obtenidos fueron de  $69.56 \pm 12.2 \%$  para el medio SD y  $65.51 \pm 7.62 \%$  para el medio V8 como muestra la Figura 11A. Posteriormente los productos obtenidos de la fermentación líquida con cada medio se utilizaron como inóculo para la fermentación sólida sobre

arroz. Calculando el porcentaje de viabilidad para los conidios como se muestra en la Figura 11B, se obtuvieron valores de  $78.12 \pm 8 \%$  para los conidios provenientes de la fermentación sólida con el inóculo del medio SD en la fase líquida y de  $72.95 \pm 2 \%$  para los conidios provenientes de la fermentación bifásica con el inóculo del medio V8. Estos valores no difieren mucho del 80 % reportado por Montesinos-Matías, (2008) empleando la misma cepa (*Beauveria bassiana* 885.2). A su vez, significaron un incremento del 9.6 % para los conidios provenientes del medio SD y del 7.4% para los conidios provenientes del medio V8, esto con respecto a los valores de viabilidad obtenidos al final de la fermentación líquida. Finalmente después de la fermentación sólida y llevando a cabo el secado en bolsas de papel. La viabilidad disminuyó un 3.1 % para los conidios que provenían de la fermentación líquida con medio SD y 2.4% para los que provenían del medio V8 (Figura 11C), esta disminución observada con el método de secado en bolsas de papel fue similar al valor de 2.5 % reportado por Ramos, (2015) con el método de secado por aspersión. Comprobando que un método económico y más práctico como el secado en bolsas de papel no difiere en cuanto la efectividad con el método por aspersión que es un método con costos más elevados. Aunque las viabilidades no son significativamente diferentes ( $\alpha < 0.05$ ) entre los medios y entre los procesos sometidos, este no define la virulencia de los formulados.



**Figura 11. Porcentaje de viabilidad para los conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 provenientes de la A) fermentación líquida, B) fermentación sólida y C) después del secado.**

Los formulados fueron elaborados en el mes de octubre, evaluando cada mes, durante 5 meses el porcentaje de viabilidad, los resultados se muestran en la Figura 13. Los formulados con los conidios de la fermentación bifásica con base líquida en medio SD, con aceite de girasol (SDGIRASOL) obtuvieron los valores de viabilidad más elevados ( $87.5 \pm 1.5$  %) en el mes de marzo y con el aceite de soya (SDSOYA) el mayor valor para este parámetro ( $86.9 \pm 3.4$  %) se obtuvo en el mes de febrero. Para los formulados con los conidios de la fermentación bifásica con base líquida en medio V8, con aceite de girasol (V8GIRASOL) se obtuvieron los mayores porcentajes ( $88.9 \pm 10$  %) en el mes de noviembre y con el aceite de soya (V8SOYA) el mayor valor para este parámetro ( $88.3 \pm 4.53$  %) se obtuvo en el mes de diciembre. Aparentemente el formulado con los conidios con base líquida en medio V8 tuvo mejor viabilidad ( $87.5 \pm 1.5$  % y  $86.9 \pm 3.4$  %) en los 2 primeros meses (noviembre y diciembre). A diferencia de los obtenidos en el formulado con los conidios con base líquida en medio SD que mostraron los mejores porcentajes ( $87.5 \pm 1.5$  % y  $86.9 \pm 3.4$  %) en los 2 últimos meses (febrero y marzo) del análisis. A pesar de la diferencia observada, los dos aceites obtuvieron valores similares ya que con un nivel de significancia ( $\alpha$ :

0.05), no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de viabilidad para los cuatro formulados (SDSOYA, SDGIRASOL, V8SOYA, V8GIRASOL). Otro punto importante fue que independientemente del medio en fase líquida para los conidios, los formulados con aceite de girasol presentaron mayores porcentajes de viabilidad en comparación de los formulados con aceite de soya aunque significativamente no son diferentes entre sí, excepto por el mes de diciembre que fueron significativas las diferencias entre los aceites.

La viabilidad de los testigos a diferencia de la observada en los formulados con aceite, disminuyó al final del proceso (Figura 13A). Pasando de  $75 \pm 9.61$  a  $54 \pm 10.3$  % para los conidios con base líquida en medio SD y de  $69.6 \pm 5.92$  a  $42.6 \pm 6$  % para los conidios con base líquida en medio V8, indicando que los aceite tiene la capacidad de conservar y mantener a los conidios viables durante el almacenamiento. En cuanto a los formulados con aceite al final de los 5 meses de evaluación se obtuvieron porcentajes de viabilidad de  $78.91 \pm 12$  % para V8GIRASOL,  $87.5 \pm 1.5$  % para SDGIRASOL,  $85.38 \pm 14.62$  % para V8SOYA, y  $74.21 \pm 2.4$  % para SDSOYA, en comparación con los testigos esto significó una disminución al final de los 5 meses un 33.5 % y 20.21 % para los formulados con aceite de girasol y soya respectivamente de conidios con base líquida en medio SD y de un 36.31 % y 42.78 % con formulados con aceite de girasol y soya respectivamente de conidios con base líquida en medio V8, indicando que el aceite de soya en el formulado de conidios con base líquida SD tuvo la menor disminución seguido por el formulado con aceite de girasol con conidios con base líquida SD aunque con aceite de girasol se obtuvo el mejor resultado en formulados con base líquida en medio V8 observando una diferencia no significativa entre estos dos aceites, de igual manera indicando que la base líquida del que provienen los conidios juega un papel importante al final.

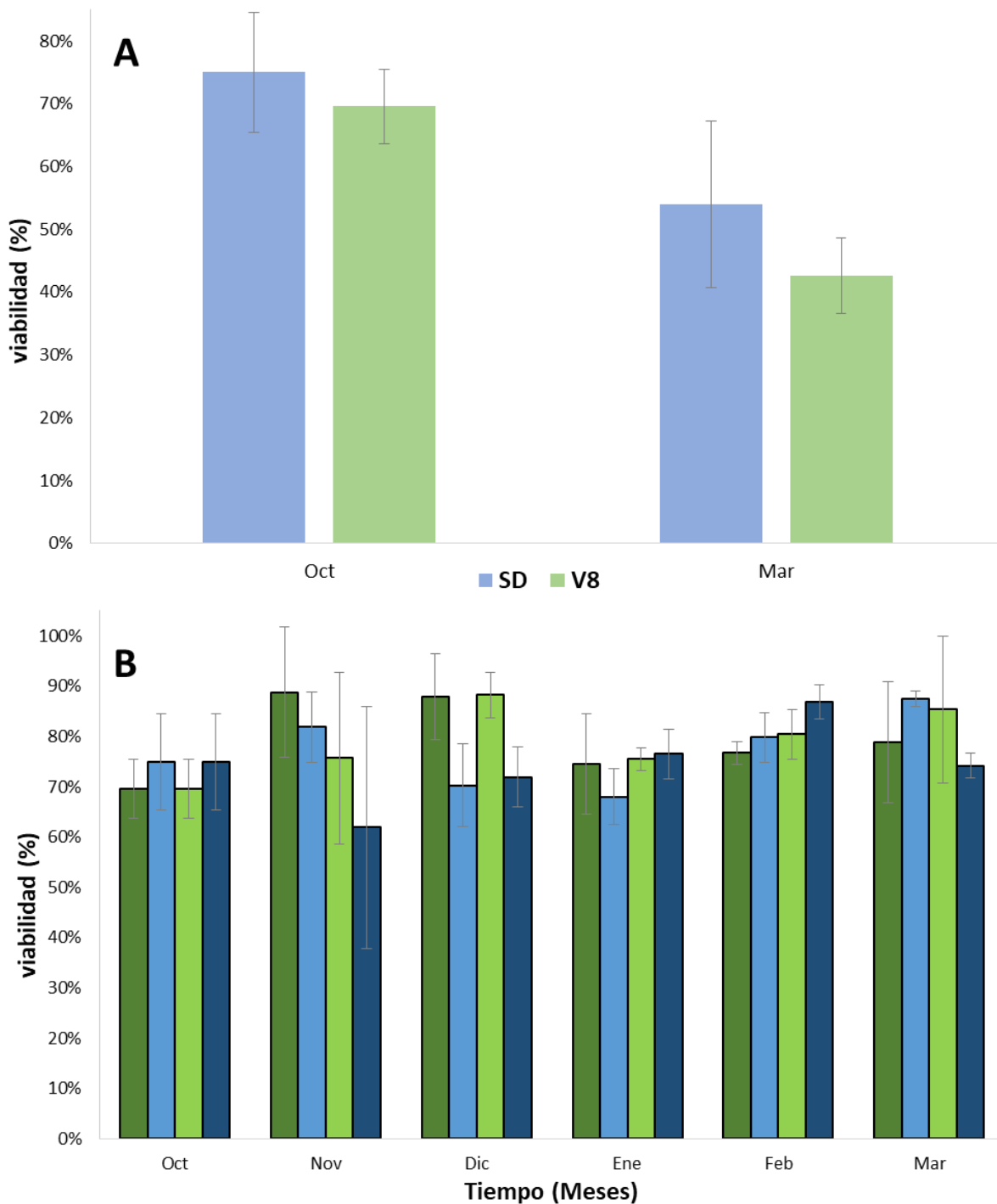


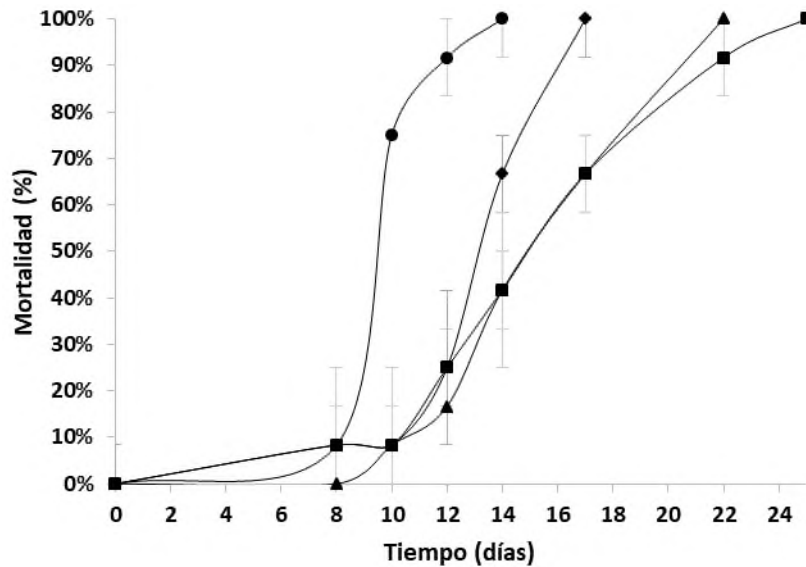
Figura 12. Porcentajes de viabilidad A) de testigos al inicio (Oct) y al final (Mar) de los conidios de la fermentación bifásica con base líquida en dos medios diferentes: SD y V8. B) de formulados V8GIRASOL (■), DSGIRASOL (■), V8SOYA (■) y SDSOYA (■) durante 5 meses (noviembre-marzo).

### 8.7.2 Bioensayos

Después de 5 meses de almacenamiento, se llevaron a cabo los bioensayos, empleando *Tenebrio monitor* como insecto modelo. La figura 13 muestra que las larvas comenzaron a morir a partir de los días 7 y 9 alcanzando la mortalidad total entre los días 14 y 22 para los formulados SDSOYA y V8SOYA respectivamente. Para los formulados SDGIRASOL Y V8GIRASOL comenzaron a morir a partir del día 9 y 13 alcanzando la mortalidad total entre los días 17 y 25 respectivamente, para la estimación del  $TL_{50}$  se empleó el método probit con un límite de confianza del 95 %. El formulado SDSOYA tuvo el menor  $TL_{50}$  ( $9.449.44 \pm 0.968$  días) y el V8GIRASOL presenta el mayor ( $15.272 \pm 1.231$  días), como se muestra en la Tabla 8. El  $TL_{50}$  es parte fundamental para determinar la virulencia de los hongos entomopatógenos (Monzón, 2001), esto significa que entre menor sea el  $TL_{50}$  es más virulento nuestro agente de control biológico. Aparentemente los mejores resultados arrojados no tiene que ver únicamente con el aceite sino también con el medio de la cual partió el proceso de producción, y al llevar a cabo las combinaciones se observó que los conidios de la fermentación bifásica con base líquida en medio SD son más eficientes que los conidios de la fermentación bifásica con base líquida en medio V8. En el caso de los aceites se obtuvo mejores resultados con el aceite de soya que con el aceite de girasol.

**Tabla 4.  $TL_{50}$  estimados para cada formulado de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica utilizando el modelo estadístico probit.**

Formulado	$TL_{50}$ (días)
V8GIRASOL	$15.2 \pm 1.23$
SDGIRASOL	$13.3 \pm 1.15$
V8SOYA	$14.7 \pm 1.22$
SDSOYA	$9.4 \pm 0.96$



**Figura 13. Porcentaje de mortalidad de los formulados con aceite a base de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2: SDSOYA (●), SDGIRASOL (◆), V8SOYA (▲), V8GIRASOL (■).**

Los cadáveres de los insectos recolectados y colocarlos en cámara húmeda se muestran en la Figura 14. La Figura 14A muestra a un insecto micosado proveniente del bioensayo con el formulado V8GIRASOL, observando que el micelio tiene una apariencia plana y el insecto tiene un color claro comparado con la Figura 14B que muestra al insecto micosado proveniente del bioensayo con el formulado SDGIRASOL donde el micelio se observó con una apariencia más algodonosa cubriendo en su totalidad al cadáver el cual presenta un color oscuro. La Figura 14C muestra a un insecto micosado proveniente del bioensayo con el formulado V8SOYA, el cual presenta una similitud con el insecto micosado proveniente del bioensayo con el formulado V8GIRASOL (Figura 14A), ya que el insecto no presentó mucho cambio en la coloración y la apariencia del hongo sobre el insecto parece ser afectada. Por el contrario La Figura 14D muestra al insecto micosado proveniente del bioensayo con el formulado SDSOYA el cual tiene mejor apariencia y la integridad parece no tener afectaciones, además este formulado SDSOYA tuvo mejores resultados en el  $TL_{50}$ . Las figuras 14E y 14F muestran a todos los cadáveres de los bioensayos con los formulados SDSOYA y SDGIRASOL respectivamente. Los formulados con conidios provenientes de la fermentación bifásica con base líquida en medio SD, han tenido mejores resultados en cuanto al  $TL_{50}$  con una diferencia de 4 días con los formulados de conidios provenientes de la fermentación bifásica con base líquida en medio V8. También, se observó que

los hongos que emergieron sobre los insectos provenientes del bioensayo de cada formulado tuvieron morfologías distintas, lo que se puede atribuir a los pigmentos que se produjeron en los formulados (Figura 10) durante el almacenamiento, que de acuerdo a lo reportado por Sánchez, (2001) y Eyal *et al.*, (1994), son los responsables del cambio de color en los cadáveres. Este pigmento rojo, posiblemente oosporeina, evita la proliferación de otros microorganismo dentro del cadáver. Indicando de manera general un efecto positivo de los aceites empleados sobre la viabilidad del hongo aunque resaltando que el formulado SDSOYA demostró ser mejor en cuanto a viabilidad y TL<sub>50</sub>.

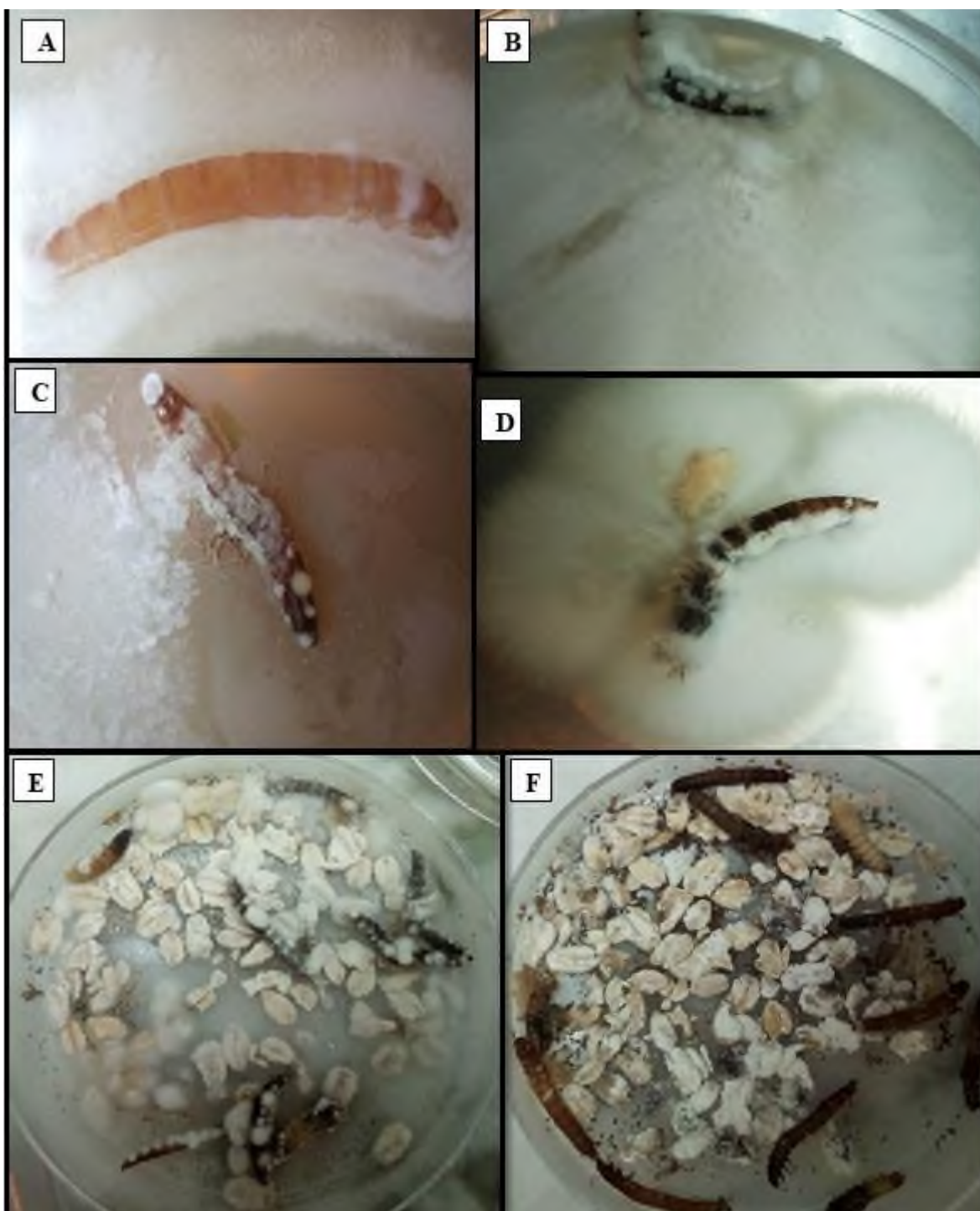


Figura 14. Larvas de *Tenebrio molitor* micosadas por *Beauveria bassiana* 885.2 provenientes de los formulados: A) V8GIRASOL, B) SDGIRASOL, C) V8SOYA, D) SDSOYA, E) caja de bioensayo del formulado SDSOYA, F) caja de bioensayo del formulado SDGIRASOL.

---

## 9. CONCLUSIONES

---

La fermentación bifásica beneficia la producción de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 ya que aun cuando las determinaciones hechas en la fermentación líquida empleando los medios SD y V8 mostraron diferencias significativas. La biomasa y concentración de conidios obtenidos es prácticamente el doble de producción en medio SD respecto al medio V8. De igual manera para las determinaciones enzimáticas, las bajas concentraciones obtenidas con el medio V8 son consecuencia de la composición del medio de cultivo, pero al momento de inocularlo en un sustrato nuevo, la producción de conidios aumentó significativamente en los productos con base líquida en medio V8, aun cuando la concentración del inóculo tenía prácticamente el 50% de diferencia con el medio SD. Indicando que los conidios obtenidos en el medio V8 son capaces de aumentar rápidamente al momento de colocarlos en un medio nuevo, recalcando la importancia de la fermentación líquida como base en la fermentación bifásica.

Las viabilidades durante la fermentación bifásica y posterior al secado no mostraron diferencias significativas ya que de los  $69.56 \pm 12.2$  % para el medio SD y  $65.51 \pm 7.62$  % para el medio V8 aumentaron un 9.6 % para los conidios provenientes del medio SD y del 7.4% para los conidios provenientes del medio V8, para posteriormente presentar una disminución con el secado con un 3.1 % para los conidios que provenían de la fermentación líquida con medio SD y 2.4% para los que provenían del medio V8.

El método de secado, no afectó de manera determinante la viabilidad de los productos. Ya que disminuyó un 3.1 % para los conidios que provenían de la fermentación líquida con medio SD y 2.4% para los que provenían del medio V8.

Los formulados de conidios, con aceites vegetales (soya o girasol), producidos por fermentación bifásica mantuvieron la viabilidad durante los 5 meses de almacenamiento ya que los testigos disminuyeron un 33.5 % y 20.21 % para los formulados con aceite de girasol y soya respectivamente de conidios con base líquida en medio SD y de un 36.31 % y 42.78 % con formulados con aceite de girasol y soya respectivamente de conidios con base líquida en medio V8, aunque entre los aceites el que mostró los mejores resultados siempre fue el aceite de soya.

El mejor  $TL_{50}$  se obtuvo con el formulado SDSOYA, el cual tuvo un  $TL_{50}$   $9.449.44 \pm 0.968$  días y el V8GIRASOL presenta el mayor  $TL_{50}$   $15.272 \pm 1.231$  días, indicando que la mortalidad de los formulados no únicamente depende del uso del aceite, sino también del medio líquido de la cual partió la fermentación bifásica.

---

## 10. APORTACIONES

---

Este trabajo aporta información sobre formulados de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica con aceites vegetales, demostrando que el uso de aceites, tiene efectos positivos sobre la viabilidad de los conidios del hongo después de cierto tiempo en almacenamiento.

El uso de un medio económico V8 a pesar de presentar diferencias significativas en la producción de enzimas, las cuales juegan un papel importante en la virulencia de los hongos entomopatógenos, al momento de transferir los productos de la fermentación líquida a la fermentación sólida, esta diferencia disminuye, lo que se reflejó en el TL<sub>50</sub> de los formulados ya que también el proceso de fermentación bifásica ayuda en el aumento de la calidad de los productos obtenidos.

## 11. PERSPECTIVAS

---

- La utilización de un inductor con el medio V8 para aumentar la producción enzimática, y disminuir el costo de producción.
- Caracterizar el pigmento que se produce en los formulados durante el almacenamiento y correlacionarlo con la virulencia de los formulados.
- Estudiar el efecto que tiene el tamaño de partícula de los productos de la fermentación bifásica en la aplicación de los formulados en pruebas de campo.
- Evaluar el efecto de otro tipo de aceites sobre la virulencia y vida de anaquel de los conidios
- Evaluar distintos residuos agroindustriales diferentes al arroz como sustrato en la fermentación bifásica sobre la virulencia y vida de anaquel de los conidios producidos.

12. PRODUCTOS OBTENIDOS

---

Gomez-Vasquez, C.; García-Gómez, M. J.; Núñez-Gaona, O. Efecto del medio V8 sobre la producción de quitinasas y proteasas por *Beauveria bassiana* en fermentación líquida, XL Congreso Nacional de Control Biológico, Mérida Yucatán, México, 16-17, Noviembre, 2017.

Gomez-Vasquez, C.; García-Gómez, M. J.; Núñez-Gaona, O. Efecto del medio sobre la producción de enzimas hidrolíticas de *Beauveria bassiana* por fermentación bifásica, Journal CIM – Revista electrónica Arbitraria ISSN: 2007-8102, 6 (1) 1350-1355. (Anexos 2)

## 13. BIBLIOGRAFÍA

- Adams D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology*. 150 (1), 2029-2035.
- Aktar M. W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*. 2 (1), 1-12.
- Alatorre Rosas R.; Bravo Mojica H.; Leyva Vasquez. J. L.; Huerta, D. la P. A. (2004). Manejo integrado de plagas. Ficha Técnica. *SAGARPA Subsecretaria de Desarrollo Rural*. 1-11.
- Badii M. H.; Landeros J. (2007). Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *TCULCyT//Toxicología de Plaguicidas*. 4 (19), 21-34.
- Bailón N. R. C. (2012). Fermentaciones industriales. Informe final de investigación. Facultad de ingeniería pesquera y de alimentos. Universidad nacional del callao. Callao Perú.
- Barajas C. G.; Pozo E. M.; García, I.; Méndez A. (2010). Obtención de conidios del Aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin Mediante una Alternativa de cultivo Bifásico. *Protección vegetal*. 25(1), 174-180.
- Bastidas A.; Velásquez S. E.; Marín M. P., Benavides M. P.; Bustillo P. A. E., Orozco C. F.J.(2009). Evaluación De Preformulados De *Beauveria Bassiana* (Bálsamo) Vuillemin, Para El Control De La Broca Del Café. *Agronomía*. 17(1), 44-61.
- Bernal J. S. (2007). Biología, ecología y etología de parasitoides, (61-74). En L. A. Rodríguez-del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds.). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303.
- Brechelt A. (2004). Manejo Ecológico de Plagas y Enfermedades. *Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA)*. 1(1), 16-17.
- Cabello T.; Saéz, E.; Gómez V.; Abad M. del M.; Belda J. E. (1990). Problemas ambientales asociados a la actividad humana: La agricultura. *Ecología industrial (EI)*. 104 (3), 640-647.
- Carballo M. (2001). Opciones para el manejo del picudo negro del plátano. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 59(1), 1-5.
- Castro R.; Álvarez A.; Machado E.; Mendoza M.; Gómez R.; García P., (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. Biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química de Perú*. 77(1), 101-108.
- Chong R. M. J. (2003). Utilización de medios de cultivos líquidos para la obtención de blastoesporas y conidias de *Beauveria bassiana* (bals.) vuillemin (deuteromycotina: hyphomycetes) resistentes a condiciones ambientales. Tesis de maestría en ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. México.
- Chen, H. (2013). Modern solid state fermentation: theory and practice. Beijing, China, Springer Science Business Media.

- da Silva W.; Santi L.; Scharank A.; Vainstein M. (2010). *Metarhizium anisopliae* Lipolytic Activity Plays a Pivotal Role in *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus Infection. *Fungal biology*. 114(1), 10-15.
- Dayamí Borges A. O. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*. 44(3), 49-55.
- Díaz C. A. B.; Walter V. M. L. F.; Hernández A. R. (2016). Hongos entomopatógenos para el control de mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae) en el cultivo de chile dulce (*Capsicum annuum* L) bajo condiciones protegidas. Tesis de licenciatura. Departamento de Protección Vegetal. Universidad de el Salvador. San Salvador.
- Díaz M. P.; Macías A. F.; Navarro S. R.; de la Torre M. (2009). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Revista mexicana de micología*. 30, 73-80.
- Driesche van R. G.; Hoddle M. S.; Center T. D. (2006). Control en plagas y malezas por enemigos naturales. *Vedalia*. 13 (1). 39-40.
- Ehi-Eromosele C. O.; Nwinyi O. C.; Ajani O. O. (2013). Integrated Pest Management. (105-115) En L.L. Marcelo (Ed.) *Weed and Pest Control Conventional and New Challenges*. IntechOpen, London Bridge Street. 205 p.
- Elósegui O. (2006). Manual de Metodos Artesanales De Producción De Bioplaguicidas A Partir De Hongos Entomopatógenos Y Antagonistas. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). Ciudad de La Habana, Cuba. 1-61.
- Elósegui, O.; Nieves, C.; Díaz, R.; Padrón, N. B.; Carr, A. (2003). Comportamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. Cepa lbb-1 en agar sabouraud dextrosa producido en cuba. *Fitosanidad*. 1(2), 49-53.
- Espinel C.; Torres L.; Grijalba E.; Villamizar L.; Cotes A. M. (2008). Preformulados Para Control De La Mosca Blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en Condiciones De Laboratorio. *Revista Colombiana De Entomología*. 34(1), 22-27.
- Estrada C. I. N. (2008). Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico, Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia. 1-9.
- Eyal J.; Mabud A.; Fischbein K. L.; Walter J. F.; Osborne L. S.; Landa Z. (1994). Assessment of *Beauveria bassiana* Nov. EO-1 Strain Wich Produces a Red Pigment for Microbial Control. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 44, 65-80.
- Feng M. G.; Poprawski T. J.; Khachatourians G. G. (1994). Production, Formulation and Application of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* for Insect Control - Current Status. *Biocontrol Science and Technology*. 4(1), 3-34.
- Gandarilla P. F. (2013). Aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva. *Agrociencia*. 47, 255-266.

- Gao, L.; Sun, M.H.; Liu, X.Z.; Che, Y.S. (2007) Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Sci China C Life Sci.* 50(1), 125-34.
- Gómez, B. T. M. (2017). Evaluación de diferentes medios de cultivo y condiciones para la producción de conidios de *trichoderma spp* mediante fermentación en líquido y sólido. Tesis de bachillerato en ingeniería en biotecnología. Escuela de biología. Instituto tecnológico de costa rica. Cartao, costa rica.
- Góngora B. C. E.; Marín P. M.; Machado P. B. (2009). Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. *Avances Tencicos Cenifacfe.* 16, 3-8.
- Guerra P. T.; Wong L. J.; Roldán H. M.; Gutiérrez C. G.; Padilla C. R.; Flores R. A; Guerra R. T. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción, y comercialización en México. *Ciencia UANL.* 4(2), 143-152.
- Guilcapi V. C. R. (2016). Determinación de la estabilidad y viabilidad de *Trichoderma harzianum rifa* en cinco sustratos usados para la elaboración de un biofungicida en formulación líquida. Tesis de Licenciatura. Biotecnología Ambiental. Facultad de ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador.
- Gutierrez G. D. F.; Ruiz M. R.; Xoconoxtle C. B. (2015). Estado actual de los cultivos genéticamente modificados en México y su contexto internacional. Mexico, DF, : porrua print.
- Hallsworth J.; Magan N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Bauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 74(3), 261-266.
- Hidalgo E.; Moore D.; Patourel G. L. (1998). The Effect of different formulations of *Beauveria Bassiana* on *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Stored Products Research.* 34, 171-179.
- Jenkins, N. E.; Prior, C. (1993). Growth and Formation of True Conidia by *Metarhizium flavoviride* in a Simple Liquid Medium. *Mycological Research.* 97(12), 1489-1494.
- Jiménez-Alejandro S. E. 2016. Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor. Tesis de maestría. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec. México.
- Kaur G. P. V. (2008). Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *Journal of Basic Microbiology.* 49(3), 264-274.
- Leopold J.; Samšňáková A. (1970). Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 15(1), 34-42
- López-Flores A.R.; Luna-Urban C.; Buenrostro-Figueroa J. J.; Hernández-Martínez R.; Huerta-Ochoa S.; Escalona-Buendía H.; Aguilar-González C. N.; Prado-Barragán N. A., (2016) Efecto del pH, temperatura y fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 15(1), 57-67

- Maranhão E. A.; Maranhão E. H. (2008-2009). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de "moscas blancas" (homoptera: aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, Recife. 5 y 6, 209-242.
- Martínez L. C. C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de licenciatura. Microbiología industrial. Facultad de ciencias. Pontifica universidad javeriana. Bogotá, Colombia.
- Mata V. T. (2008). Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría en tecnología avanzada. Instituto politécnico nacional, centro de investigación de biotecnología aplicada. CIBA-IPN Tlaxcala, México.
- Monroy Y.; Bastida L.; Constante J.; Cuellar E.; Perpiñan J.; vivas k. (2015). Hongos entomopatógenos. Obtenido el 24 de abril de 2018, de <https://issuu.com/virgiulloac/docs/186433813-hongos-entomopatogenos-li>.
- Montesinos-Matias R. (2008). Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Meropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F.
- Monzón A. C. (Ed.). (2001). Manual de Producción y uso de hongos entomopatógenos. *Fundación Para El Desarrollo Tecnológico Agropecuario Y Forestal de Nicaragua*. Managua, Nicaragua.
- Morales de León A. D.; Gálvez R. J.; Gómez O. D.; Sánchez J. M.; Ruiz J. G. (2014). Evaluación de un formulado de aceite vegetal de *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio para el control de la broca de café. *Fitosanidad*. 18, 5-14.
- Mustafa U.; Kaur G. (2009). Extracellular enzyme production in *Metarhizium anisopliae* isolates. *Folia microbiologica*. 54, 499-504.
- Neves P. J.; Alves S. B., (2000). Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 43, 373-378.
- Núñez-Gaona O.; Saucedo-Castaeda, G.; Alatorre-Rosas R.; Loera O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4), 771-777.
- Palacios L. L. (2014). Desarrollo y evaluación de formulados asperjables de *Bacillus thuringiensis* para el control del gusano de bolsa del nogal *hyphantria cunea* (drury), Tesis doctorado en biotecnología. Facultad de Ciencias Biologicas.Universidad Autonoma de Nuevo Leon.Monterrey, N.L. México.
- Peteira B.; Gonzales, I.; Arias Y.; Fernández T. A.; Miranda I.; Martínez B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin. *Revista de protección vegetal*. 26(1), 16-22.
- Pérez-Guerra N.; Torrado-Agrasar A.; Lopez-Macias C.; Pastrana L. (2003). Main characteristics

- and applications of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2(3), 16-22.
- Populationpyramid, (Marzo, 2016). Pirámides de población del mundo desde 1950 a 2100. Recuperado de <https://www.populationpyramid.net/es/mundo/2016/>
- Porter J. (1973). Agostino Bassi bicentennial (1773-1973). *Bacteriological Review*. 37(3), 284-288.
- Quesada M. E.; Meelad Y.; Garrido J. I. (Marzo, 2017). Nueva propuesta para el control de la mosca del olivo *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Grandes Cultivos*, recuperado de [http://www.interempresas.net/Grandes-cultivos/Articulos/135005-Nueva-propuesta-para-el-control-de-la-mosca-del-olivo-Bactrocera-oleae-\(Gmelin\).html](http://www.interempresas.net/Grandes-cultivos/Articulos/135005-Nueva-propuesta-para-el-control-de-la-mosca-del-olivo-Bactrocera-oleae-(Gmelin).html).
- Ramos F. I. (2015), Efectividad biológica en el campo de un miroencapsulado de *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin sobre *Metamasius spinolae* (Gyllenhal). Tesis de maestría en ciencias en manejo agroecológico de plagas y enfermedades. Instituto politécnico nacional, Centro de desarrollo de productos bióticos. Yautepec, Morelos.
- Robledo-Monterrubio M.; Alatorre-Rosas R.; Viniestra-González G.; Loera O. (2009). Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101, 222-227.
- Rodríguez S. R. N. (1997). Economía, Agricultura Ecológica Agroecología. *Baética. Estudios de Arte, Geografía e Historia*. 19, 263-276.
- Romero G. S. de J. (2001) Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida. Tesis de doctorado en ciencias biológicas. Universidad autónoma metropolitana, unidad de ciencias biológicas y de la salud. D.F. México.
- Sánchez-Pérez Ll. de C.; Barranco-Florido J. E.; Rodríguez-Navarro S.; Cervantes-Mayagoitia J. F.; Ramos-López M. Á. (2014). Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*. 2, 65-76.
- Sanchez R. M. (2001). Control biológico de la broca del café (*hypothenemus hampei*) utilizando diferentes dosis de hongo *Beauveria bassiana* en el distrito de zapatero, provincia de Ica. Tesis de licenciatura en agronomía. Universidad Nacional de San Martín Facultad de Ciencias Agrarias. Tarapoto, Perú.
- Serrano C. L.; Galindo F. E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia*. 1, 77-88.
- Soto P. H. (2003). Larvas de *Tenebrio molitor*. *El Canario Uruguayo*. 2(2), 39-40.
- Universidad en el campo. (2011). *Econimía 1*. Caldas, Colombia, Espacio Gráfico Comunicaciones S.A.
- Vélez P. E.; González M. T.; Valderrama A. M.; Estrada M. N.; Bustillo, Á. E.; Montoya, E. C. (2000). Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria Bassiana*. *Cenicafé*. 51(3), 196-206.

- Vera F.; Romero J. (1994). Impacto ambiental de la actividad agraria. *Agricultura y Sociedad*. 71, 164-167.
- Vey A. H. (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En T. J. Butt, *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (311-346). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Walstad J. D.; Anderson R. F.; Stambaugh, W. J. (1970). Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarrhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 16(2), 221-226.
- Wraight S. P.; Jackson, M. A.; de Kock, S. L. (2001). Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents. T. M. Butt.; C. Jackson.; Magan N. (Eds.), En *Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential*, New York, USA. 253–287.
- World Health Organization Geneva; United Nations Environment Programme. (1990). *Public Health Impact of Pesticides used in Agriculture*. Inglaterra: Geneva : World Health Organization.
- Zavaleta-Mejía E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*. 17, 201–207.

## A. ANEXOS

## A.1 Curvas de calibración

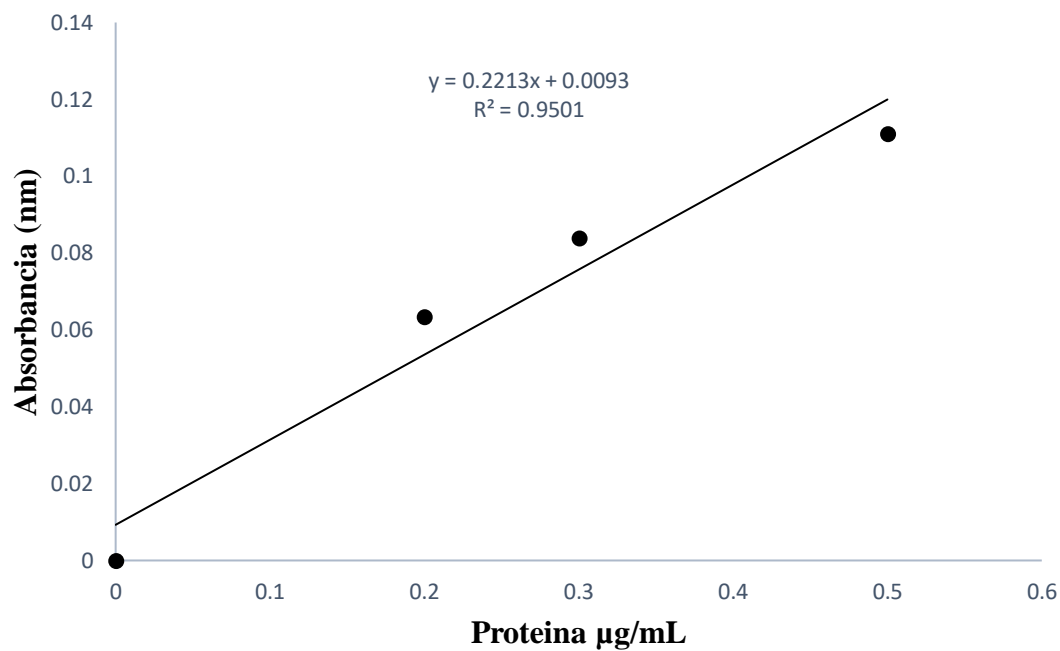
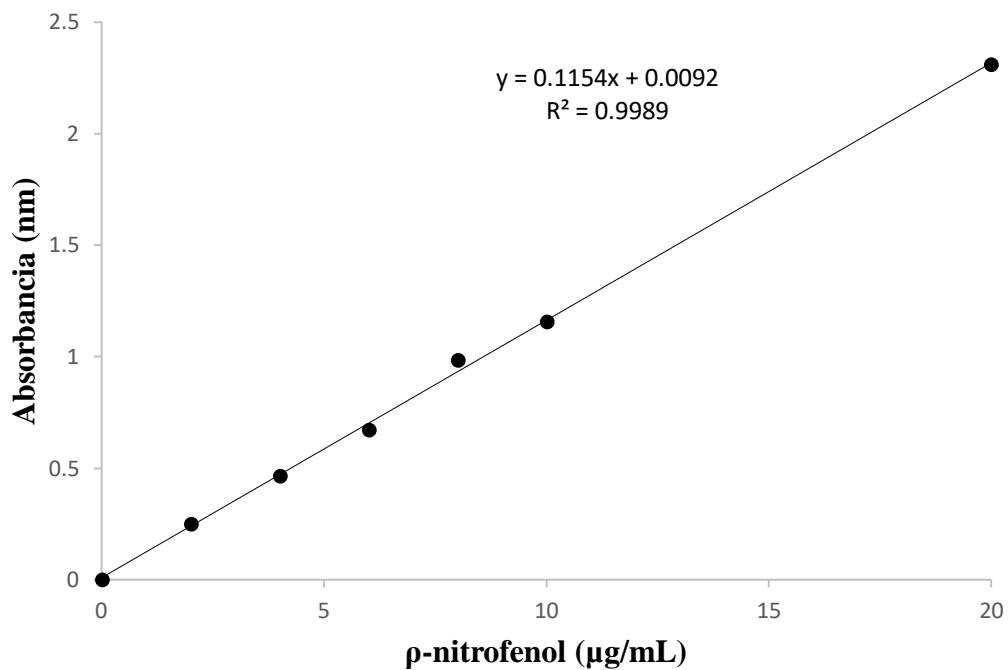


Figura 15. Curva de calibración estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) 100 µg/mL por el método de micro ensayo de Bradford (1976).



**Figura 16.** Curva de calibración estándar de N-acetilhexosaminidasa por el método de Tronsmo y Harman, (1993) empleando una solución madre de p-nitrofenol a una concentración de  $100\mu\text{g/mL}$  para la determinación de la actividad exoquitinasa.

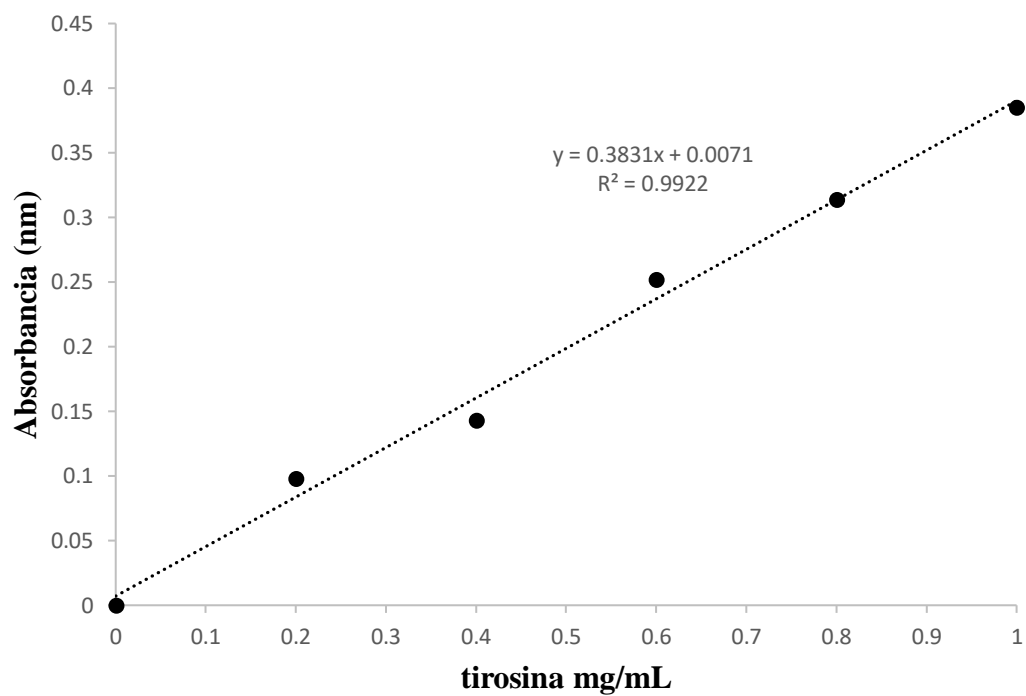


Figura 17. Curva de calibración estándar de tirosina 50mg/mL para la determinación de unidades de proteasas (Ichishima, 1970).

---

## A.2 Artículo

### Efecto del medio sobre la producción de enzimas hidrolíticas de *Beauveria bassiana* por fermentación bifásica

C. Gomez-Vasquez<sup>1</sup>, M. J. García-Gómez<sup>1,2,3</sup>, O. Núñez-Gaona<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> PE Ingeniería en Biotecnología. Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec.

<sup>2</sup> Instituto de Biotecnología. Laboratorio de Bioprosos. Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec.

<sup>3</sup> Cuerpo Académico Biotecnología Sustentable. Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec.

Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, Tuxtepec, Oax., México. C.P. 6830. Tel +52 287 875 9240 ext.

230 \*oscarzng@hotmail.com

Área de participación: Ingeniería Química

#### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del medio sobre la producción de enzimas hidrolíticas de *Beauveria bassiana* producidas por fermentación bifásica. En la fermentación líquida (FL) se utilizaron caldo dextrosa sabouraud y medio V8. Los conidios producidos por FL se utilizaron para evaluar su viabilidad por fermentación sólida (FS). El crecimiento y la producción de enzimas mostraron diferencias significativas entre los medios utilizados en la FL. Las máximas actividades exo y endoquitinasas en el medio SDB (3.95 y 0.7 U/mL) se alcanzaron en el tercer día y con el medio V8 (3.71 y 0.34 U/mL) en los días 7 y 1 del bioproceso; la actividad exoquitinasa aumentó de forma inversamente proporcional con respecto a la actividad endoquitinasa. La producción de conidios por FS no fue significativamente diferente con los conidios de ambos medios; sin embargo, su viabilidad aumentó. Por lo tanto, el medio V8, que es más económico podría ser una alternativa para producir conidios en un proceso de producción bifásico.

**Palabras clave:** *Beauveria bassiana* 885.2, fermentación bifásica, quitinasas, proteasas

#### Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of the medium on the production of hydrolytic enzymes of *Beauveria bassiana* produced by biphasic fermentation. Sabouraud dextrose broth and V8 medium were used in the liquid fermentation (LF). The conidia produced by LF were used to evaluate their viability by solid fermentation (SF). The growth and the production of enzymes showed significant differences between the means used in LF. The maximum exo and endochitinase activities in the SDB medium (3.95 and 0.7 U / mL) were reached on the third day and with the V8 medium (3.71 and 0.34 U / mL) on days 7 and 1 of the bioprocess; the exochitinase activity had an inversely proportional increase compared to the endochitinase activity. The production of conidia by SF was not significantly different with the conidia of both media; however, its viability increased. Therefore, the V8 medium, which is more economical, could be an alternative to produce conidia in a biphasic production process.

**Key words:** *Beauveria bassiana* 885.2, bifasic fermentation, chitinases, proteases

#### Introducción

Los hongos entomopatógenos (HEP) representan una alternativa que rescata y fortalece el equilibrio ecológico, debido a su capacidad de infectar insectos por contacto [Montesinos-Matias, 2008]. La producción de HEP se basa en la multiplicación masiva de conidios, tradicionalmente empleando fermentación líquida, sólida o bifásica [Elósegui, 2006], esta última representa una metodología novedosa para la producción de forma simple, económica y efectiva de las estructuras infectivas, debido a que reúne las características de la fermentaciones líquida y sólida para obtener lo mejor de cada una de ellas [Martínez, 2007], obteniendo conidios de mejor calidad. La fermentación líquida es el punto de inicio para aumentar o mantener la calidad de las unidades infectivas en la fase sólida. Además el uso de medios simples en la fermentación líquida puede disminuir costos de producción manteniendo la integridad de los conidios. Se ha reportado que el medio a base de 8 verduras (V8) favoreció la velocidad radial y la producción de conidios del hongo entomopatógeno *Trichoderma harzianum* [Siordia y col., 2003]. Por otro lado, la producción de enzimas hidrolíticas es clave en la virulencia de hongos entomopatógenos como lipasas, proteasas, exo y endoquitinasas; debido a que participan en la penetración de los hongos hacia el insecto durante el proceso infectivo [St. Leger y col., 1986; Bidochka y col., 1990]. Para favorecer el proceso de producción de hongos entomopatógenos dirigidos al control de

---

plagas, este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de un medio de cultivo económico en la fermentación líquida sin disminuir la calidad de los conidios obtenidos por fermentación sólida.

## Materiales y métodos

### Microorganismo

Se empleó la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2 (donada por el Dr. Octavio Loera de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa). Ésta se activó en agar dextrosa Sabouraud (SDA) al 4% (p/v) enriquecido con 0.05% de extracto de levadura (EL), incubándose por 8 días a 25 °C. Posteriormente en un frasco con 30 mL de agua destilada estéril se agregaron cuadritos del medio para obtener un stock, conservándose a 4 °C. De esta manera se aseguró la integridad genotípica y fenotípica de la cepa.

### Fermentación líquida

Se realizó por triplicado en matraces con 100 mL de medio que se inoculó con una concentración de esporas de  $1 \times 10^8$  conidios/mL incubándose a 25 °C y 180 rpm por 10 días. Se evaluó el efecto de 2 medios de cultivo sobre la viabilidad de los conidios producidos: caldo dextrosa Sabouraud (SDB) al 4% (p/v) enriquecido con 0.05% de extracto de levadura (EL); y un medio basado en jugo de 8 verduras (200 mL/L) y glucosa (11.6 g/L) [Siordia y col., 2003]. Todas las mediciones se realizaron cada 24 h. Se evaluaron: pH del medio, concentración de conidios [Monzón, 2001], la biomasa se determinó por peso seco mediante centrifugación a 11,500 rpm por 10 min, posteriormente se secó a 60 °C por 72 horas y se pesó.

### Determinaciones

Proteínas totales [Bradford, 1976]: método de micro ensayo utilizando una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA).

Actividad Exoquitinasa: se determinó por una modificación a la metodología propuesta por Tronsmo y Harman [1993] ajustando a una curva patrón de *p*-nitrofenol, La actividad N-acetilhexosaminidasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de *p*-nitrofenol por mL de muestra por minuto bajo las condiciones de la reacción.

Actividad endoquitinasa: se determinó empleando como sustrato una suspensión de quitina coloidal al 1% (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM pH 6.7 [Tronsmo y Harman 1993], Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de una suspensión de quitina coloidal en un 5% a 30 °C por 24 horas. Esto se obtuvo mediante una resta de las absorbancias de las muestras menos las de los testigos. Proteasas [Ichishima, 1970]: las muestras se dejaron reaccionar con solución de caseína al 1% (p/v) en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7) por 10 min a 30 °C, deteniendo la reacción con ácido tricloroacético (TCA) 0.4 M, centrifugando a 11100 g durante 15 min a 4 °C, al sobrenadante se le adicionó el reactivo de folin al 20% se incubó por 30 min a 30 °C y se leyó la absorbancia a 665 nm con un lector de microplacas utilizando una curva estándar de tirosina. Una unidad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que produce un color equivalente a 1  $\mu$ mol de tirosina por minuto en 2 ml de mezcla de digestión a pH 7 y 30 °C.

### Viabilidad

Se determinó al final de la fermentación con cada tratamiento realizando una modificación a la técnica empleada por Monzón, [2001], ésta consistió en tomar alícuotas de 1 mL o 1 g de materia fermentada, dependiendo del tipo de fermentación, y se realizaron diluciones seriales hasta alcanzar una concentración entre 50 y 300 conidios en 500  $\mu$ L de agua destilada estéril; este volumen se inoculó en placas con medio SDA que se incubaron a 25 °C, después de 24 h se observó la aparición de colonias. El porcentaje de viabilidad se definió como la relación del número de colonias que emergieron en este tiempo entre el número de conidios contados por cámara de Neubauer, multiplicado por 100.

### Fermentación sólida

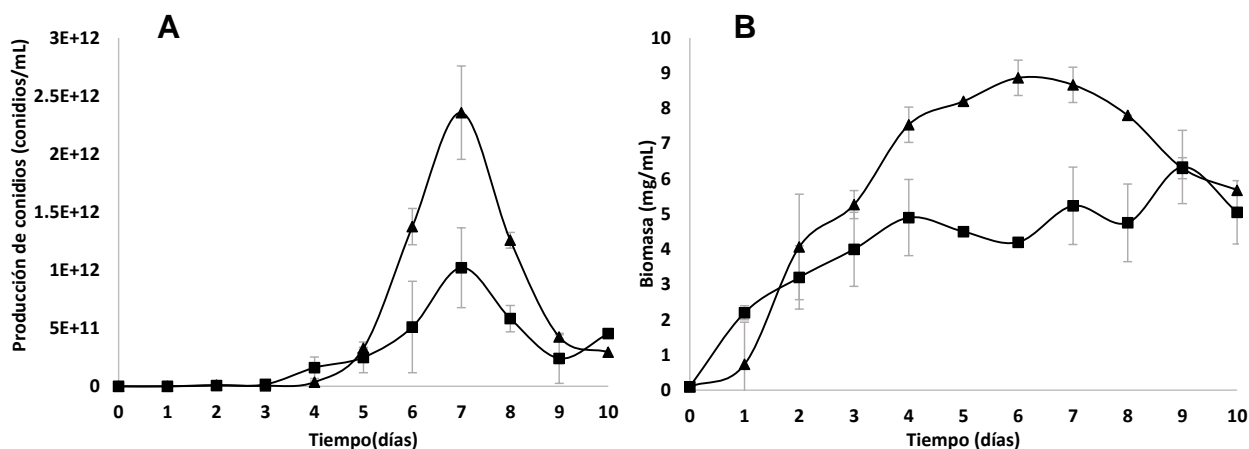
Se llevó a cabo después de la fermentación líquida, con arroz (*Oryza sativa* L.) como sustrato, se usaron contenedores de plástico de 500 mL, donde se adicionaron 100 g de arroz con una humedad final del 75 %, este valor se alcanzó mezclando 75 mL de agua destilada estéril y 75 mL de inóculo proveniente de la fermentación líquida, con una concentración de  $2.35 \times 10^{12}$  conidios/mL para SDB y  $1.02 \times 10^{12}$  conidios/mL para el medio V8. Posteriormente las cajas con el sustrato inoculado se incubaron a 25 °C por 7 días con un fotoperíodo de 12/12 h (luz/oscuridad) [Monzón, 2001]. Cada 24 h se extrajeron muestras representativas para determinar la concentración de conidios [López-Sosa y col., 2018].

## Resultados y discusión

### Cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana* 885.2

En la Figura 1A se muestra la producción de conidios durante la fermentación líquida con los medios evaluados. Se observó que ésta comenzó hasta el cuarto día, alcanzando los mayores títulos al séptimo día, independientemente del medio evaluado. Sin embargo, los valores obtenidos con el medio V8 fueron menores ( $1.02 \times 10^{12}$  conidios/mL), en comparación con los alcanzados con el medio SDB ( $2.35 \times 10^{12}$  conidios/mL). También se observaron diferencias en el tamaño de los conidios, siendo de menor tamaño los obtenidos en el medio V8. En cuanto a la biomasa (Figura 1B) ésta se produjo desde el primer día de la fermentación en ambos medios. La máxima concentración de biomasa se alcanzó al sexto día con el medio SDB (8.6 mg/mL), mientras que en el medio V8 (6.3 mg/mL) fue en el noveno.

La fase de exponencial de la producción de conidios comenzó hasta el día 4 para ambos medios. La cantidad de conidios es directamente proporcional a la cantidad de biomasa [García y col., 2003], ya que la fase de latencia de los conidios comenzó al mismo tiempo que la producción de biomasa en medio SDB. En cambio el comportamiento fue distinto en medio V8, la máxima producción de conidios se obtuvo entre los días de mayor producción de biomasa y comenzó a disminuir aun cuando la biomasa continuaba aumentando. Estos resultados sirvieron para determinar el momento de obtener los conidios que se utilizaron como inóculo para la fermentación sólida.

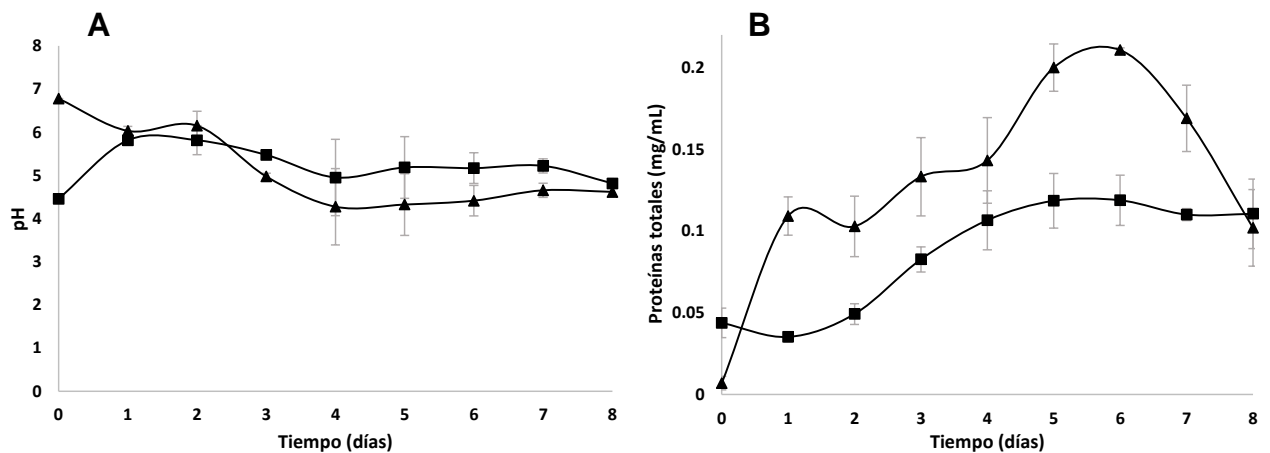


**Figura 18.** Cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana* 885.2 durante la fermentación líquida en medio SDB (▲) y V8 (■): A) Concentración de conidios producidos, B) Biomasa producida.

### Determinaciones enzimáticas

El pH del medio juega un papel importante en todo el proceso fermentativo, debido a que es una variable que influye sobre el metabolismo y crecimiento del hongo, López-Flores y col., [2006] consideran que el pH del medio influye sobre la producción, estabilidad y actividad de las enzimas. Así mismo *Beauveria bassiana* para germinar requiere un pH entre 4 y 7 [Moore, 1996]. Esta tendencia se observó durante la fermentación líquida (Figura 2A); en medio SDB el pH inicial (6.7) disminuyó hasta un valor cercano a 4 en el día 4, tiempo en que comenzó la producción de conidios manteniéndose constante hasta el final de la fermentación. En medio V8 el pH inicial (4.6) se incrementó hasta 5.8 en el primer día disminuyendo gradualmente hasta alcanzar un valor de 4.8 en el día 4, relacionándose también con la producción de conidios.

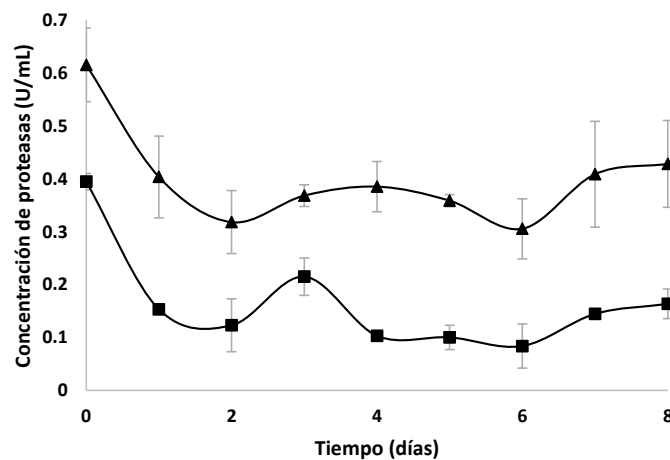
La producción de proteínas por los hongos entomopatógenos es una de las características primordiales para llevar a cabo la penetración del insecto durante el proceso de infección. La Figura 2B muestra que en el medio SDB hubo una mayor concentración de proteínas solubles en el día 6 (0.21mg/ml), disminuyendo hasta 0.101 mg/ml, valor similar a la mayor concentración para el medio V8 (0.118 mg/ml) al sexto día. Sin embargo, en este último se observó un incremento constante en la producción de proteínas durante la fermentación. La producción de enzimas de importancia para la virulencia, quitinasas y proteasas requieren un pH óptimo de 7 [Castro y col., 2011; López-Flores y col., 2016, Moore, 1996], por lo tanto el pH alcanzado durante la fermentación en medio SDB es más favorable que el obtenido en el medio V8.



**Figura 19.** A) pH en medio y B) Concentración de proteínas solubles en medio SDB (▲) y V8 (■), durante la fermentación líquida con *Beauveria bassiana* 885.2

En el medio SDB las máximas actividades exo (3.95 U/mL) y endoquitinasas (0.7 U/mL) se alcanzaron en el tercer día; mientras que con el medio V8, las máximas actividades exo (3.71 U/mL) y endoquitinasas (0.34 U/mL) fueron observadas en el séptimo y en el primer día de la fermentación, respectivamente. Además se observó un incremento progresivo en la actividad exoquitinasa, y éste fue inversamente proporcional al de la actividad endoquitinasa, esto se puede atribuir al orden en que suceden las reacciones metabólicas; la actividad endoquitinasa sucede antes de la actividad exoquitinasa, debido a que las exoquitinasas se dividen en dos subcategorías, quitobiosidasas y 1-4- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas, que actúan sobre los productos oligoméricos obtenidos de la acción de las endoquitinasas [Ramírez-Coutiño, 2009]. Aunque la información sobre la producción de enzimas quitinolíticas; endoquitinasas y N-acetilhexosaminidasas es escasa en fermentaciones líquidas, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que al incrementar la actividad exoquitinasa disminuyen proporcionalmente la endoquitinasa, aunque estas dos enzimas trabajan de manera sinérgica para la hidrólisis de la quitina.

La producción de proteasas (Figura 3) se observó al inicio de la fermentación, con valores de pH de 6.7 en el medio SDB y 4.6 en el medio V8; las actividades proteolíticas máximas se observaron también al inicio y fueron de 0.61 U/mL y 0.39 U/mL para el medio SDB y el medio V8; a lo largo del bioproceso la actividad proteolítica tuvo una relación directamente proporcional al pH del medio de cultivo.

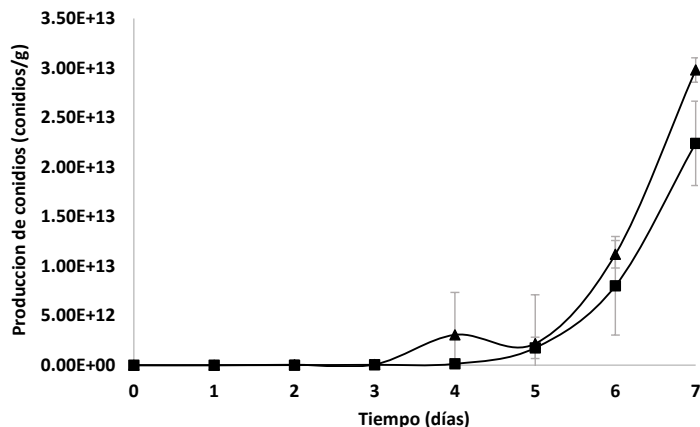


**Figura 20.** Producción de proteasas en medio SDB (▲) y V8 (■) durante la fermentación líquida con *Beauveria bassiana* 885.2

#### Fermentación sólida

La figura 4 muestra la producción de conidios durante la fermentación en medio sólido. Se observó que la concentración de conidios se incrementó gradualmente hasta alcanzar los títulos máximos de  $2.98 \times 10^{13}$  y  $2.2 \times 10^{13}$  conidios/g de materia húmeda, para el inóculo proveniente del medio SDB y medio V8 respectivamente al séptimo

día. Barajas y col., [2010] mostraron que la fermentación bifásica tiene el potencial para la producción masiva de hongos entomopatógenos, esto porque al momento de transferir los conidios de la fase líquida a la sólida, estos van a crecer en un medio nuevo, rico en nutrientes y sin compuestos inhibitorios, en este trabajo la fase sólida fue arroz, que es el sustrato más usado en producciones masivas de conidios [Espinel y col., 2008]. La producción de conidios por FS utilizando conidios producidos en FL con uno u otro medio no fue significativamente diferente ( $\alpha < 0.05$ ). Por lo tanto el uso del medio V8 en la fase líquida de la fermentación bifásica, puede disminuir mucho los costos de producción de conidios.



**Figura 21.** Concentración de conidios producidos por *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación sólida con inóculos provenientes de fermentación líquida: medio SDB (▲) y V8 (■).

### Viabilidad

El día óptimo de producción de conidios en la fermentación líquida fue el séptimo (figura 1A), en este día se determinó el porcentaje de viabilidad para los conidios de *Beauveria bassiana* 885.2. Los valores obtenidos fueron de  $69.56 \pm 19.57\%$  para el medio SDB y  $65.51 \pm 14.62\%$  para el medio V8. Al final de la fermentación sólida la viabilidad observada fue de  $78.12 \pm 8\%$  para los conidios provenientes de la fermentación líquida con el medio SDB y de  $72.95 \pm 2\%$  para los que provenían del medio V8, estos valores significaron un incremento del 9.6 y 7.4% respectivamente para los valores obtenidos en la fermentación líquida. Varios trabajos han evaluado el método de producción bifásico [Ibarra y col., 2015], y existe un consenso sobre el aumento de la calidad y viabilidad de los conidios obtenidos por fermentación sólida. Gadarilla-Pacheco [2013] determinó que la viabilidad de *Beauveria bassiana* tuvo incrementos de 60 hasta 90% utilizando primero medio líquido con glucosa y casaminoácidos, y posteriormente arroz como sustrato.

### Trabajo a futuro

Adicionar un inductor al medio V8 y optimizar el bioproceso para la producción de enzimas hidrolíticas involucradas en el proceso de infección de insectos.

### Conclusiones

Se encontraron diferencias significativas en la producción de conidios, biomasa y enzimas de *Beauveria bassiana* 885.2 entre los medios utilizados durante la fermentación líquida.

Sin embargo, con los dos medios de cultivo los perfiles enzimáticos en la fermentación líquida fueron similares y la viabilidad de los conidios se incrementó en la fase sólida.

Por lo tanto, el medio V8, al tener un menor costo en comparación con el medio definido, es una alternativa para disminuir el costo en la producción de conidios en fermentación bifásica.

---

---

## Referencias

1. Barajas, C. G.; Pozo, E. M.; García, I.; Méndez, A. (2010). Obtención de conidios del Aislamiento MA-002 de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin Mediante una Alternativa de cultivo Bifásico. *Protección vegetal*, 25, 174-180.
2. Bidochka, M. J. (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*, *Journal of invertebrate pathology*, 56, 362-370.
3. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
4. Castro, R.; Álvarez, A.; Machado, E.; Mendoza, M.; Gómez, R.; García, P. (2011). Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. Biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista de la Sociedad Química de Perú*. 77, 101-108.
5. Elósegui, O. (2006). Manual de Metodos Artesanales De Producción De Bioplaguicidas A Partir De Hongos Entomopatógenos Y Antagonistas. Instituto De Investigaciones De Sanidad Vegetal (INISAV). Ciudad de La Habana, Cuba. 1-61.
6. Espinel C.; Torres L.; Grijalba E.; Villamizar L.; Cotes A M. (2008). Preformulados Para Control De La Mosca Blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en Condiciones De Laboratorio. *Revista Colombiana De Entomología*. 34, 22-27.
7. Gandarilla, P. F. (2013). Aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva. *Agrociencia*. 47, 255-266.
8. Garza-López, P. M.; Konigsberg, M. K.; Saucedo-Castañeda, G.; Saucedo-Castañeda, G.; Loera, O. (2011). Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en respuesta al CO<sub>2</sub>: producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*. 45(7) 761-770.
9. Ibarra M. A.; Mendez G A.; Ferrer R. Y.; García P. D. (2015). Factibilidad del empleo del método bifásico para la obtención de conidios de aislamientos autóctonos de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin. *Revista de protección vegetal*. 30, 103-103
10. López-Flores, A. R.; Luna-Urban, C.; Buenrostro-Figueroa, J. J.; Hernández-Martínez, R.; Huerta-Ochoa, S.; Escalona-Buendía, H.; Aguilar-González, C. N.; Prado-Barragán, L. A., (2016). Efecto del pH, temperatura y fuente de proteína y carbohidratos en la producción de proteasas por *Yarrowia lipolytica* en cultivo sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(1), 57-67.
11. López-Sosa, D.; García-Gómez, M.J.; Núñez-Gaona O. (2018). Análisis cualitativo de la producción de enzimas de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida utilizando un inductor. *Mexican journal of Biotechnology*. 3(3), 26-35.
12. Martínez, L. C. C. (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 Mediante Fermentación Bifásica a Escala Piloto. Tesis de licenciatura. Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C.
13. Montesinos-Matias, R. (2008). Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México D.F.
14. Monzón, A. (2001). Manual de Producción y uso de hongos entomopatógenos. *Fundación Para El Desarrollo Tecnológico Agropecuario Y Forestal de Nicaragua*.
15. Moore, E. 1996. Fundamentals of the fungi. Cuarta Edición. *Prentice Hall*. New Jersey. 574
16. Ramírez-Coutiño, L.P (2009). Producción de quitinasas y proteasas de *Verticillium fungicola* y su evaluación en la hidrólisis de quitina para la producción de quitin-oligómeros. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana México.
17. Siordia, G. M.; Figueroa, E. A.; Cárdenas, C. H. (2003). Efecto de los componentes de seis medios de cultivo sólido sobre la velocidad de crecimiento de *Trichoderma harzianum* y su producción. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Michoacán, México.
18. St Leger, R. J.; Cooper, R. M., y Charnley, A. K. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Journal of General Microbiology*, 132(6), 1509-1517.
19. Tronsmo, A. y Harman, G.E. (1993). Detection and quantification of N-acetil- $\beta$  -D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Analytical Biochemistry*. 208, 74-79.