



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC**

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación de la virulencia y viabilidad de los  
conidios de *Beauveria bassiana* producidos  
mediante fermentación bifásica utilizando un  
inductor.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TITULO DE  
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**DANIEL LÓPEZ SOSA**

Director:

**Dr. Oscar Núñez Gaona**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. 2018**





## DEDICATORIA

*A Dios por la fuerza, energía, inteligencia y amor que ha entregado desde el primer momento de mi vida.*

*A mis padres Primo y Roció (Pá y Má) por todo el esfuerzo, dedicación y amor que me han brindado.*

*A mis hermanos Manuel y Roció (Acho y Chiu) por estar al pendiente en todo momento a distancia o en cercanía.*

*Al Dr. Oscar Núñez Gaona (El doc) por su paciencia (extrema) y confianza depositada en mi como alumno (no cualquiera).*

*Este libro es para ustedes.*

## AGRADECIMIENTOS

*Primeramente, a Dios porque todo ha sido posible por El.*

*A mis padres, ellos en ningún momento han faltado ni dejado de creer en mí.*

*A mi hermano Manuel, por siempre estar ahí para cada cosa extraña que se me ocurría y dudas que surgían mientras estudiaba esta carrera.*

*A hermana Roció, por siempre estar al pendiente de mis pasos y por ese instinto de protección conmigo, además de todos sus dramas y enojos también existían platicas muy interesantes.*

*Elizabeth, porque desde el primer día que nos conocimos y nos hicimos amigos siempre estabas apoyándome, siempre estabas ahí ya sea en las situaciones complicadas así como en los momentos felices, es más hasta para poner los títulos a esta tesis y para enumerarla estuviste ahí.*

*A mis profesores;*

*Dr. José Abad Zavaleta, por ser el primero de esta universidad en ver algo distinto en mí, en darme la confianza de que “si podía” porque tengo la capacidad.*

*Dra. Nelda X. Martínez Galero, por tanto apoyo, confianza y paciencia durante mi formación como profesionista además de tantas charlas de horas en cubículos y esos congresos que sin lugar a duda han cambiado mi vida.*

*Dra. Rubí G. Utrilla Coello, porque desde los primeros días que nos conocimos siempre estuvo al pendiente de que tantas “brutalidades” hacia (y a la fecha...) y porque siempre estuvo ahí cuando me encontraba en problemas.*

*Dra. Jacqueline Capataz Tafur, porque desde el primer contacto que tuvimos siempre me ha tenido a la expectativa, aún recuerdo ese día “Así que tú eres Sosa, los voy a hacer llorar cuando lleguen a mi clase”, en realidad me agradaban mucho sus clases. Agradezco también por su verdadera dedicación a la revisión de esta tesis y sus correcciones realmente pertinentes. ah! Y la paciencia. La admiro mucho...*

*Dra. María de Jesús García Gómez, porque desde que nos conocimos en el propedéutico tuvo realmente una admirable paciencia y ahora como mi revisora por esas correcciones (realmente muchas), de verdad yo creo que muchas ocasiones se molestó porque la redacción no es lo mío (iré progresando)*

*Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre, por sus favorables comentarios desde el inicio de este trabajo hasta las revisiones y seguramente una seria de preguntas extensas en el examen de grado.*

*Dra. Ana Karin Navarro Martínez, desde que la conocimos en “seminario de carrera” impuso este interés por la biotecnología (de usted escuche por primera vez “control biológico”), además que sus clases siempre fueron de las mejores. Gracias por ayudarme con esas correcciones/recomendaciones y nuevas ideas para describir este trabajo.*

*Dra. Ariana A. Huerta Heredia, porque desde que la conocimos su alegría para dar clases nos contagiaba además que nunca faltaba el comentario que más alegraba “Quiero un hielito”, gracias también por su revisión y sus comentarios que ayudaran a que replanteara mejor como describirlos.*

*Dr. Oscar Núñez Gaona, por su forma tan características de ver las cosas y decírmelas, por esos regañones, ese empujón extra para que salieran las cosas, por no escatimar lo poco o mucho material que teníamos para trabajar (hemos sido y seremos un equipo con alta capacidad de improvisación), porque no cualquier docente espera a su alumno a que termine sus experimentos para tomar su año sabático, por decir “Yo estoy a disposición de abrir la optativa (control biológico) si la autorizan y me la piden”, creo que tengo muchas cosas que agradecerle que en este momento ya no tengo en mente que escribirle. Gracias.*

*A mis compañeros de la carrera;*

*Samu, El mushe, Frank, Abi, El davis, Roque, Crhistopher y El gordo, ustedes nunca faltaron cuando se necesitó algo, tantas cosas que pasamos juntos, son cosas que no olvidare. Nuria, Betzy, May, Magda, Cele, María Fernanda, lo más divertido del día era empezar a discutir por cualquier cosa las chicas aplicadas menos que los varones.*

*A mis compañeros de la maestría;*

*Mar, Nuria (si otra vez), Ángel, Toño, porque siempre han estado para cualquier cosa, son la onda!*

*Jere y Mafer. Gracias por ayudarme a Re-revisar este trabajo y valla que fue bastante demandante.*

*Betty, tu pues como peleas no manches 😊, a pesar de que siempre estamos discutiendo también había pláticas muy interesantes y muy buenos consejos gracias por estar ahí para siempre poder echar una partida de UNO, Conquian, Briscas, Turista, Secuencia, Dominó. ¡A como pierdes el tiempo jugando!*

*La tía Misa, pues que te puedo decir mija, gracias tu nivel de estupidez que, es impresionante y la mía también jaja.*

*Alan, Gracias... me quedo sin palabras... nunca te rajas para cualquier cosa.*

*A mis amigos y compañeros del laboratorio;*

*Alain, porque en todas las dudas siempre las respondías y las que no sabías... bueno eso no paso que no tenías respuesta.*

*Elías Abad, porque desde el primer día que entre al laboratorio siempre buscabas la manera de resolver los problemas, además de enseñarme cada cosa que ahora se en laboratorio.*

*Erick Manzano y Crisanto Roldan, para todo siempre estaban ahí, aunque “yo puedo solo” no me dejaron morir solo.*

*Lic. Claudia Nadxyelli Vázquez González por su apoyo en la traducción de mis escritos tanto en trabajos presentados como en este trabajo.*

*La chikibanda, por todas esas risas, charlas, castras y eventos sociales (The open Sky) a los que asistíamos.*

*Ing. Marisol, porque a cada preocupación a cada cosa que no te salía o te pasaba, te aprendí a ser fuerte riéndote y decir “ni modos asi es esto”, hay que chambiarle di a madri ahora”.*

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN .....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. Manejo integral de plagas. ....	3
2.2. Control biológico .....	4
2.3. Hongos entomopatógenos .....	6
2.4. <i>Beauveria bassiana</i> .....	9
2.4.1. Morfología.....	10
2.4.2. Mecanismo de infección .....	11
2.5. Enzimas .....	13
2.5.1. Proteasas .....	14
2.5.2. Quitinasas.....	15
2.5.3. Lipasas .....	16
2.6. Producción de hongos entomopatógenos .....	16
2.7. Fermentación bifásica .....	17
2.8. Insecto modelo.....	20
3. ANTECEDENTES.....	22
3.1. <i>Beauveria bassiana</i> 885.2.....	22
3.2. Producción de conidios .....	23
3.3. Producción de enzimas .....	23
3.3.1. Proteasas .....	23
3.3.2. Quitinasas.....	24
3.4. Humedad y actividad de agua.....	25
3.5. Control de plagas .....	26
3.6. Virulencia .....	26
4. JUSTIFICACIÓN.....	28

5.	HIPÓTESIS.....	29
6.	OBJETIVOS.....	30
6.1.	Objetivo general .....	30
6.2.	Objetivos específicos .....	30
7.	METODOLOGÍA.....	31
7.1.	Microorganismo.....	31
7.2.	Inductor .....	31
7.3.	Cinética de crecimiento y producción de biomasa en cultivo líquido.....	31
7.4.	Relación C: N.....	32
7.4.1.	Determinación de Nitrógeno total .....	32
7.4.2.	Determinación de azúcares totales.....	32
7.5.	Fermentación sólida .....	33
7.5.1.	Cinética de producción de conidios .....	33
7.5.2.	Obtención del extracto enzimático.....	34
7.5.3	Actividad de agua ( $A_w$ ).....	35
7.6.	Pruebas cualitativas API® ZYM.....	35
7.7.	Viabilidad .....	36
7.8.	Bioensayos .....	36
7.8.1	Determinación de tiempo letal 50% ( $TL_{50}$ ).....	36
7.9.	Análisis estadístico.....	37
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
8.1	Cinética de crecimiento y producción de biomasa en cultivo líquido.....	38
8.2	Relación C: N con diferentes sustratos .....	39
8.3	Fermentación sólida .....	42
8.3.1	Cinética de producción de conidios .....	42
8.3.2	Actividades enzimáticas .....	45
8.3.3	Actividad de agua ( $A_w$ ).....	53
8.4	Pruebas cualitativas API® ZYM .....	55
8.5	Viabilidad.....	59
8.6	Bioensayos.....	61
8.6.1	Tiempo letal 50% ( $TL_{50}$ ) .....	64
9	CONCLUSIONES .....	66

10	CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS .....	68
10.1	Contribuciones .....	68
10.2	Perspectivas.....	68
11	REFERENCIAS .....	69
12	ANEXOS .....	79
12.1	Curvas estándar .....	79
12.1.1	Curva estándar de azúcares totales .....	79
12.1.2	Curva estándar de p-nitrofenol .....	79
12.1.3	Curva estándar de actividad proteolítica.....	80
12.2	Análisis de varianza .....	80
12.2.1	Familias de significancia de las actividades enzimáticas .....	80
12.2.2	Análisis de varianza de los bioensayos .....	82
12.3	Trabajos presentados.....	82
12.4	Publicación.....	83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ventajas y desventajas del control biológico.....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los géneros de HEP.....	7
<b>Tabla 3.</b> Sustratos sólidos evaluados para la producción de los principales Ascomycetos entomopatógenos. ....	19
<b>Tabla 4.</b> Pruebas cualitativas API® ZYM.....	58
<b>Tabla 5.</b> Tiempo Letal 50 de <i>Beauveria bassiana</i> .....	65
<b>Tabla 6.</b> Análisis de varianza para las actividades enzimáticas empleando arroz como sustrato.....	80
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza para las actividades enzimáticas empleando salvado de trigo como sustrato.....	81
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza para las actividades enzimáticas empleando maíz quebrado como sustrato.....	81
<b>Tabla 9.</b> Comparación entre sustratos y tratamientos en los bioensayos. ....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de los efectos del control químico convencional. ....	4
<b>Figura 2.</b> Estructuras morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> .....	10
<b>Figura 3.</b> Proceso de infección de HEP.....	12
<b>Figura 4.</b> <i>Beauveria bassiana</i> emergiendo de las áreas intersegmentales de un grillo mormón.....	13
<b>Figura 5.</b> Sustrato sólido (copos de cebada) con <i>Beauveria bassiana</i> , .....	18
<b>Figura 6.</b> Cinética de producción de conidios de <i>B. bassiana</i> en fermentación líquida.....	38
<b>Figura 7.</b> Producción de biomasa de <i>B. bassiana</i> crecida por fermentación líquida. ....	39
<b>Figura 8.</b> Relación Carbono/Nitrógeno obtenida para diferentes sustratos. ....	41
<b>Figura 9.</b> Cinética de producción de conidios las mezclas de sustrato/ <i>T. molitor</i> . ....	44
<b>Figura 10.</b> Actividades enzimáticas para las mezclas de arroz/ <i>T. molitor</i> . ....	47
<b>Figura 11.</b> Actividades enzimáticas para las mezclas de salvado de trigo/ <i>T. molitor</i> . ....	49
<b>Figura 12.</b> Actividades enzimáticas para las mezclas de maíz quebrado/ <i>T. molitor</i> . ....	51
<b>Figura 13.</b> Cinética de actividad de agua ( $A_w$ ) para las mezclas de sustrato/ <i>T. molitor</i> . ....	54
<b>Figura 14.</b> Galerías de reacción de las pruebas cualitativas API ZYM®. ....	56
<b>Figura 15.</b> Viabilidad de conidios producidos en fermentación sólida utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor.....	60
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de mortalidad de los conidios de <i>Beauveria bassiana</i> producidos en fermentación sólida utilizando mezclas de sustrato/ <i>T. molitor</i> .....	62
<b>Figura 17.</b> Curva estándar de azúcares empleando glucosa como sustrato por el método del fenol sulfúrico. ....	79
<b>Figura 18.</b> Curva estándar de actividad exoquitinasa utilizando p-NAG como sustrato- .....	79
<b>Figura 19.</b> Curva estándar de actividad proteolítica utilizando tirosina como sustrato .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ L: Micro litros

ADN: Acido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de varianza

$A_w$ : Actividad de agua

C:N: Relación Carbono/Nitrógeno

CD: Caldo Sabouraud

EL: Extracto de levadura

FAO: Organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura.

HEP: Hongos entomopatógenos

MIP: Manejo integral de plagas

mM: Mili molar

NaOH: Hidróxido de sodio

nm: Nanómetro

p/p: Relación peso/peso

p/v: Relación peso/volumen

rpm: Revoluciones por minutos

SDA (por sus siglas en inglés): Agar Sabouraud dextrosa

UV: Luz ultravioleta

$\alpha$ : Nivel de significancia

pNAG: p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida

## RESUMEN

La producción de hongos entomopatógenos (HEP) es un área de estudio de gran importancia representando una alternativa ante el uso de insecticidas sintéticos, lo que ha generado un gran interés de obtener la mayor concentración de unidades infectivas para emplearlas como agentes de control de plagas; que presenten altos porcentajes de virulencia y viabilidad. Es por ello que el uso de sustratos económicos alternativos con altas relaciones de C:N es una prioridad en los procesos fermentativos a nivel industrial como por ejemplo la remolacha, el bagazo de caña, el maíz quebrado, el arroz quebrado, entre otros. Durante el mecanismo de infección, los HEP liberan una serie de enzimas hidrolíticas responsables de penetrar la cutícula de los insectos. Se ha demostrado que en fermentación líquida estas enzimas son inducibles, pero en dicho proceso las unidades infectivas no tienen una alta efectividad para su uso a nivel agrícola, en cambio los productos derivados de fermentación sólida presentan una resistencia mayor. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue producir conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 producidos por fermentación bifásica, utilizando distintas mezclas de arroz, salvado de trigo y maíz quebrado con cutículas de *Tenebrio molitor* como inductor (100:0, 95:5, 90:10, 85:15 %). Los resultados mostraron que la producción de conidios de *B. bassiana* no se vio afectada por el tipo de sustrato empleado, sin embargo la presencia del inductor mostró un efecto sobre la virulencia de los conidios. El mejor tratamiento en los bioensayos fue la mezcla arroz/ inductor 90/10 %, con un tiempo letal de  $9.66 \pm 2.03$  d seguido de la mezcla maíz quebrado/inductor (85/15 %) con el que se alcanzó una mortalidad máxima a los 15 d del bioensayo y un tiempo letal 50 de  $6.43 \pm 1.51$  d. A su vez se evaluaron en cada uno de los tratamientos, los niveles de producción de las enzimas hidrolíticas que son liberadas durante el proceso de infección tales como endoquitinasas, exoquitinasas y proteasas, se observó un efecto positivo en la producción de dichas enzimas en los tratamientos con inductor.

## ABSTRACT

The production of entomopathogenic fungi (EPF) is an important area of study that represents an alternative to the use of synthetic insecticides, which has generated a great interest in obtaining the highest concentration of infective units to use them as pest control agents with high percentages of virulence and viability. That is why the use of alternative economic substrates with high C: N ratios is a priority in industrial fermentation processes such as beet, cane bagasse, broken corn, broken rice, among others. During the mechanism of infection, EPFs release a series of hydrolytic enzymes responsible for penetrating the cuticle of insects. It has been shown that in liquid fermentation these enzymes are inducible, but in this process the infective units do not have a high effectiveness for their use at the agricultural level, whereas the products derived from solid fermentation present a greater resistance. In this sense, the objective of this work was to produce conidia of *Beauveria bassiana* 885.2 by biphasic fermentation, using different mixtures of rice, wheat bran and broken corn with *Tenebrio molitor* cuticles as inducer (100: 0, 95: 5, 90 : 10, 85:15%) The results showed that conidial production of *B. bassiana* was not affected by the type of substrate; however the presence of the inducer showed an effect on the virulence of the conidia. The best treatment in the bioassays was the mixture of rice/inductor 90/10%, with a lethal time of  $9.66 \pm 2.03$ d followed by the mixture of broken corn/ inductor (85/15%) which reached a maximum mortality at 15d of the bioassay and a lethal time 50 of  $6.43 \pm 1.51$ d. In turn, the levels of production of hydrolytic enzymes released during the infection process such as endochitinases, exochitinases and proteases were evaluated in each of the treatments, a positive effect was observed in the production of such enzymes in the treatments with the inducer.

# 1. INTRODUCCIÓN

El manejo integral de plagas (MIP) es un conjunto de métodos físicos, químicos, biológicos, genéticos y/o culturales que permiten el control de una plaga (Ballesteros-Torres, 2013), siendo aceptado económica, ecológica y toxicológicamente (Zavaleta-Mejía, 2014), del cual resalta el control biológico debido a que este permite disminuir el uso de compuestos químicos (Whipps y Lumsden, 2001). Éste consiste en el empleo de organismos y/o componentes de los mismos para reducir la densidad poblacional de otros con el propósito de disminuir costos derivados del uso de insecticidas químicos, evitar daños al ambiente y al humano. Se pueden emplear microorganismos entomopatógenos como bacterias, nematodos y hongos (Padilla *et al.*, 2005); los últimos tienen la ventaja de invadir al huésped por contacto (Ortiz-Meza *et al.*, 2005), lo que incrementa las posibilidades de que el huésped desarrolle la infección (Montesinos-Matías, 2008).

*Beauveria bassiana* (Hypocreales, Ascomycotina), conocido como muscardina blanca, es uno de los hongos entomopatógenos más utilizados en el control de plagas agrícolas, urbanas, forestales y de ambientes acuáticos por su capacidad para infectar a diversas especies de insectos de distintos órdenes, además de estar ampliamente distribuido en la naturaleza (Ballesteros-Torres, 2013; Zimmermann, 2007).

Para que los agricultores puedan obtener bioinsecticidas a base de esporas de hongos entomopatógenos, estos deben producirse en grandes cantidades, lo que implica la necesidad de desarrollar e implementar métodos de producción con rendimientos elevados (aprox.  $10^{12}$  esporas/g de sustrato), que aseguren una alta efectividad y buena calidad.

Durante la infección, los hongos entomopatógenos liberan enzimas hidrolíticas encargadas de penetrar la cutícula de los insectos (Montesinos-Matías, 2012). Se

ha demostrado que en fermentación líquida éstas pueden ser inducibles (Jiménez-Alejandro, 2016) pero, en este tipo de bioproceso las unidades infectivas producidas (blastosporas) carecen de una elevada viabilidad para su uso a nivel agrícola, en cambio a los producidos durante la fermentación sólida (conidios aéreos) (Lomer *et al.*, 2001).

La fermentación bifásica se realiza secuencialmente en dos etapas; líquida y sólida. En ella, el microorganismo implicado se crece hasta el final de la fase exponencial en una fase líquida para transferir la mayor cantidad de biomasa posible a un sustrato sólido (Aponte y Carmona, 2000).

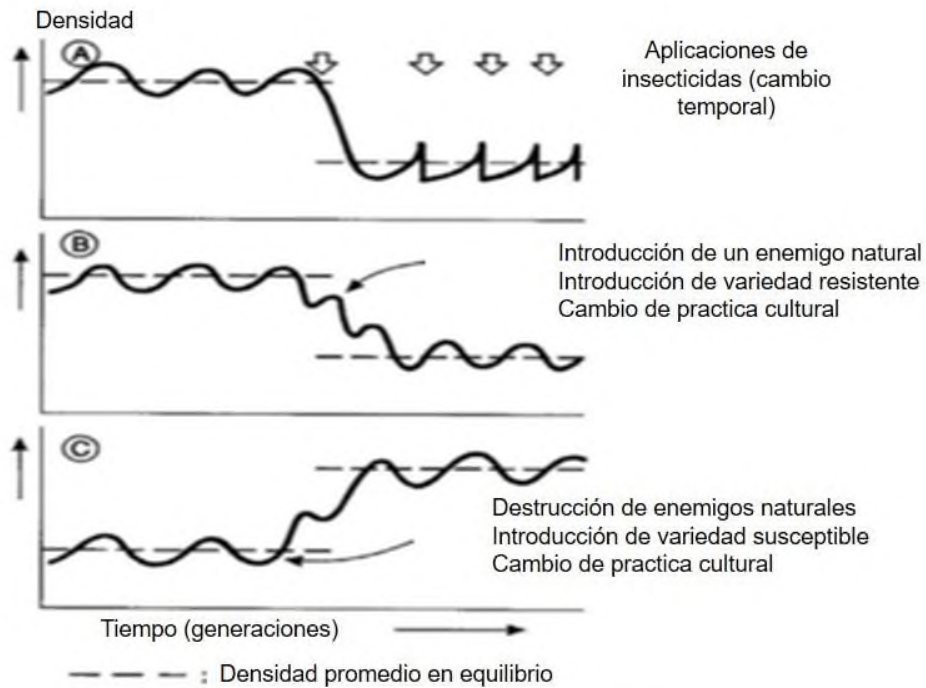
Considerando lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la virulencia de los conidios de *Beauveria bassiana* producidos en fermentación bifásica empleando *Tenebrio molitor* como inductor.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Manejo integral de plagas.

El MIP es un sistema de protección de cultivos orientado a mantener las plagas en niveles que no causen daño económico mediante el uso preferencial de factores naturales, o sus derivaciones, que resulten adversos para el desarrollo de las plagas. Entre estos factores se encuentran: variedades de cultivos resistentes, agentes de control biológico, prácticas agronómicas, medidas físicas y mecánicas, utilización de estímulos que determinan el comportamiento de los insectos, tales como repelentes o atrayentes, entre otras prácticas (Cisneros, 2010).

El control biológico es una alternativa al control convencional de plagas que usa productos químicos (Brenner, 2003), se esfuerza en implementar un uso racional de los pesticidas químicos, así como la integración armoniosa de diferentes estrategias (Bueno *et al*, 2011). Es un método de control que integra un conjunto de estrategias confiables desde el punto de vista ecológico, económico y toxicológico, con énfasis en el empleo de elementos naturales de regulación, manteniendo una relación costo-beneficio equilibrada, incluye el uso de insecticidas químicos y biológicos, requiere del conocimiento de la ecología, la biología de la plaga y del cultivo, además de la integración apropiada de la información (Rodríguez-Gómez, 2009). El MIP contempla que el uso de plaguicidas debe ser selectivo; evitando las aplicaciones generalizadas de productos de amplio espectro y duración prolongada. En esto difiere con la orientación del control químico tradicional (Figura 1) que se basa en el empleo sistemático y repetido de insecticidas, como método preferencial para reducir las poblaciones de plagas (Cisneros, 2010).



**Figura 1.** Representación esquemática de los efectos del control químico convencional (A), el Manejo de integrado de plagas (B) y la aparición de nueva plaga por mal manejo del cultivo (C). (Tomado de Cisneros, 2010).

La aplicación del MIP comienza monitoreando el área para detectar, identificar y muestrear las poblaciones de plagas presentes. Luego, se incorpora el estudio del clima y pronósticos estacionales para anticipar los niveles de plagas en el futuro. Se eligen entonces estrategias de manejo apropiadas, si se prevé que las plagas producirán daños. Estas estrategias incluyen controles biológicos, químicos, culturales, físicos y genéticos (Abrams, 1990). Dentro del potencial de la biotecnología agrícola y el MIP se encuentra el control biológico de insectos, empleando hongos entomopatógenos (HEP) (Montesinos-Matías, 2008).

## 2.2. Control biológico

El término “control biológico” fue usado por primera vez por H. S. Smith en 1919, para referirse a la represión de las plagas mediante sus enemigos naturales (Rodríguez y Arreondo, 2007); es decir mediante la acción de parasitoides,

predadores y patógenos. Los parasitoides, son insectos que viven a expensas de otro insecto (huésped) al que devoran progresivamente hasta causarle la muerte. Los predadores son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas (víctimas o presas) en forma más o menos rápida succionándoles la hemolinfa o devorándolos. Los patógenos son microorganismos: virus, bacterias, protozoarios, nematodos y hongos, que causan enfermedades o epizootias entre las plagas (Cisneros, 2010). A lo largo de la historia han existido diversos ejemplos del uso de enemigos naturales para el control de plagas siendo quizá, el caso más antiguo, el que hace referencia al uso de hormigas por agricultores chinos en el siglo XIII. Sin embargo, el control biológico nace como un método científico hacia finales del siglo XIX, con el exitoso caso de la introducción desde Australia a California de *R. cardinalis* contra la escama algodonosa de los cítricos (*I. purchasi*) ocurrido en 1888 (Nicholls, 2008). El control biológico tiene características propias que le distinguen de otros métodos de control de plagas, algunas de las ventajas y desventajas que presenta se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas del control biológico (Tomado de Summy y French, 1988)

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
La acción se ejerce sobre grandes áreas (Considerando condiciones climáticas y biológicas).	Sus efectos son lentos comparados con el uso de insecticidas sintéticos.
No dejan residuos tóxicos ni contamina el ambiente.	Los enemigos naturales son influenciados por las condiciones climáticas y biológicas del lugar.
El uso de enemigos naturales no desequilibra el ecosistema agrícola.	No todas las plagas poseen enemigos naturales eficientes desde el punto de vista económico.
El efecto tiende a ser permanente.	Se debe tener conocimiento sobre los principios del método.
Las plagas no desarrollan resistencia a sus enemigos naturales.	Reducido apoyo económico.

El control biológico de organismos nocivos para la agricultura, ganadería y recursos naturales ha cobrado un renovado interés a nivel mundial durante las últimas dos

décadas por razones económicas, ambientales y de salud pública. Los hongos entomopatógenos son los que han recibido mayor atención por la gran variedad de especies y amplio rango de huéspedes, así como por su crecimiento microscópico sobre la superficie del huésped. Todos los insectos son susceptibles de ser afectados por algún hongo (Hernández, 2016), en la actualidad se tiene reportes de unas 750 especies de hongos patógenos para plagas de plantas (Ondráčková, 2016).

### **2.3. Hongos entomopatógenos**

Los hongos se encuentran asociados con insectos que viven en diversos hábitats, como agua, suelo y partes aéreas (Carruthers y Hural 1990); por su particular manera de infección, los hongos son los principales microorganismos que infectan insectos chupadores como áfidos, mosquita blanca, escamas, chicharritas y chinches.

Una alternativa al uso de insecticidas sintéticos, es el empleo de microorganismos como agentes de control, especialmente los hongos entomopatógenos (HEP) que poseen bajo o nulo efecto negativo en la salud humana y ambiental (Erlor, 2015). El término entomopatógeno ha sido definido por varios autores de diferentes maneras; Devotto *et al* (2010) lo definen como aquel microorganismo que posee la capacidad de atacar insectos. También se ha definido como parásito obligado o facultativo de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobrevivencia, y sus mayores ventajas están en la manipulación, adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración directa a través de tegumento (García *et al.*, 2008). Estos agentes, se encuentran virtualmente en todos los grupos taxonómicos, excepto la división *Basidiomycota* (Rodríguez-Gómez, 2009; Montesinos-Matías, 2012; Butt, 2015). La mayoría hongos con potencial para el control de insectos están en la división *Zygomycota* y *Ascomycota* (Tabla 2). Los hongos ascomicetos inicialmente fueron divididos en dos grupos, los *Ascomycota* y *Deuteromycota* (hongos imperfectos). Algunos estudios microbiológicos y biológicos moleculares

han demostrado que estos hongos imperfectos, (formalmente clase *Hyphomycetes* en los *Deuteromycota*) son anamórficos (forma asexual) de los *Ascomycota* dentro del orden *Hypocreales*, familia *Clavicipitaceae*. Además, dentro de la división *Zygomycota*, muchas especies de entomopatógenos están en el orden *Entomophthorales* (Montesinos-Matías, 2012).

**Tabla 2.** Clasificación de los géneros de HEP (Tomado de Montesinos-Matías, 2012).

División	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Zygomycota</i>	<i>Zygomycetes</i>	<i>Entomophorales</i>	<i>Entomophoraceae</i>	<i>Entomophaga</i>
				<i>Entomophthora</i>
				<i>Erinia</i>
				<i>Eryniopsis</i>
				<i>Furia</i>
				<i>Massospora</i>
				<i>Strongwellsea</i>
				<i>Pandora</i>
				<i>Tarichium</i>
			<i>Zoophthora</i>	
			<i>Neozygiteae</i>	<i>Neozygites</i>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hipocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Beauveria</i>
				<i>Cordyceps</i>
				<i>Cordycepioideus</i>
				<i>Lecanicillium</i>
				<i>Metarhizium</i>
				<i>Nomuraea</i>

Los primeros hongos en ser descritos como causantes de enfermedad y muerte de insectos fueron *Hyphomycetes*, Por ejemplo, Agostino Bassi (1835), sugirió que un microorganismo era el responsable de la enfermedad conocida como “muscardina blanca” en el gusano de seda *Bombyx mori*. La especie del hongo causante de dicha enfermedad fue nombrada después *Beauveria bassiana* en su honor (Steinhaus,

1963; Ertler, 2015). Este hecho marcó el inicio del estudio de la patología de hongos en insectos, cuyo desarrollo y aplicación comenzó con Hagen (1879), quien estudió el posible uso de hongos para el control de insectos (García *et al*, 2008).

Las micosis (enfermedades causadas por hongos) son comunes y ampliamente distribuidas en poblaciones de insectos, regulando la mortalidad mediante epizootias. Una característica común en los HEP es que, con excepción de *Microsporidia*, infectan a su hospedero por contacto directo sobre la cutícula, y no por vía oral (Jaronski, 2013). Existen aproximadamente 750 especies de HEP en 100 géneros que se presentan con una distribución mundial, no obstante, sólo unos pocos son estudiados en forma intensiva (Cisneros, 2010). Entre los más estudiados están: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Monzón, 2001; García *et al.*, 2008). A nivel mundial las dos especies más estudiadas de HEP son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, debido a su eficiencia y facilidad de manipulación (Rodríguez *et al.*, 2006).

La principal ventaja de los HEP radica en que para el insecto es muy difícil desarrollar resistencia. Sin embargo, la principal desventaja de su uso radica en que su eficacia contra las plagas depende de las condiciones ambientales, particularmente temperatura y humedad (Ondráčková, 2016). La temperatura afecta el desarrollo de la enfermedad, así como el del huésped (Cisneros, 2010); y la humedad es un factor esencial para la germinación y diseminación de las esporas de la mayoría de los hongos.

#### 2.4. *Beauveria bassiana*

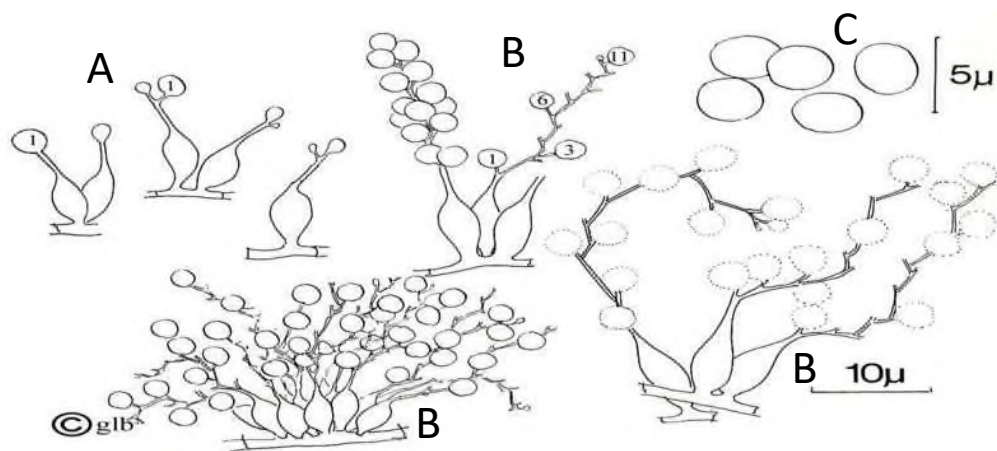
Ha sido estudiada durante más de 100 años y no se le conoce ningún efecto tóxico sobre animales domésticos o silvestres, con excepción de su acción patogénica contra los insectos (Hernández, 2016).

Los miembros de esta familia se encuentran en hábitats ecológicos diversos junto con otros entomopatógenos, fitopatógenos, micoparásitos y hongos endofíticos de gramíneas (Núñez-Gaona, 2009). Esta familia de hongos también es conocida por la producción de metabolitos secundarios con propiedades tóxicas. Infecta alrededor de 707 especies de insectos en 521 géneros de 149 familias que comprenden 15 órdenes.

Este hongo ataca plagas agrícolas de importancia económica para México, como: picudo del algodónero (*Anthonomus grandis* Boh), mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew), perforador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner), broca del café (*Hypothenemus hampei*) entre otros (Rodríguez-Gómez, 2009;). Es un hongo ubicuo (Villalba *et al.*, 2009), es de fácil reconocimiento, y de aparición frecuente en la naturaleza, tiene un rango amplio de huéspedes con una amplia variación de virulencia hacia ellos; es un organismo fácilmente manipulable que se puede aislar de cadáveres de insectos o de suelo. Tiene la capacidad de vivir de manera parásita o saprófita, lo que le permite subsistir en ausencia de un huésped y posee la capacidad de entablar relaciones endofíticas con diversas plantas, potenciando propiedades que les permiten a ambos resistir efectos del ambiente y de otros patógenos (Ballesteros-Torres, 2013). En consecuencia, *Beauveria* es el HEP más representativo en las colecciones de cultivo en el mundo (Montesinos-Matías, 2009).

### 2.4.1. Morfología

*Beauveria bassiana* es un hongo heterótrofo constituido de células quitinizadas. Morfológicamente se compone de hifas septadas que poseen una longitud de 2.5 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, en ellas se generan conidióforos simples, raramente agrupados, con apariencia de jarrón (más angosto en uno de los extremos), que sostienen a los conidios. Éstos, se originan de forma simpodial o acropeta, dando una forma de zigzag al raquis bajo un proceso de reproducción asexual (Figura 2). En el suelo, su forma de crecimiento es micelial, desarrollada en conjunto con la materia orgánica (Ballesteros-Torres, 2013), no obstante, durante la infección de insectos, el conidio germina produciendo micelio y estructuras semejantes a levaduras conocidas como blastosporas (Wong, 2003). Este hongo muestra un polimorfismo vegetativo que depende de las características del medio de cultivo. En medio sólido o semi sólido produce, conidios aéreos; en medios definidos líquidos, conidios sumergidos, que son similares a los aéreos; y en medios complejos líquidos, produce blastoesporas, cuerpos de hifas unicelulares (Núñez-Gaona, 2009). Los conidios tienen características más adecuadas que las blastosporas para su empleo en el control de plagas de insectos. A pesar de que las blastosporas tienen un período de germinación más corto; los conidios son más resistentes durante el almacenamiento y frente a condiciones ambientales adversas (Hegedus *et al.*, 1992).



**Figura 2.** Estructuras morfológicas de *Beauveria bassiana*. (A) Conidiogeno, (B) Conidioforo, (C) Conidio. (Tomado de Ballesteros-Torres, 2013)

#### 2.4.2. Mecanismo de infección

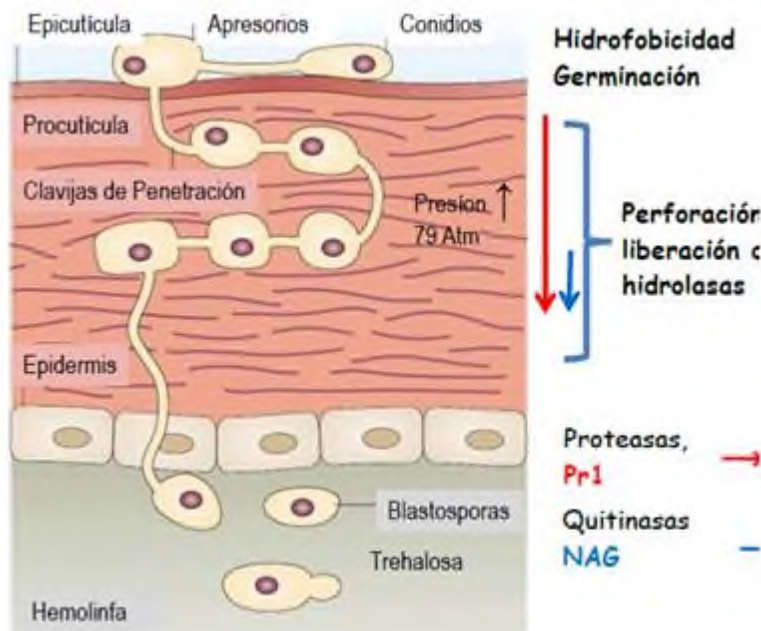
Los hongos entomopatógenos infectan por contacto, penetrando directamente la cutícula del insecto, a diferencia de otros agentes, como bacterias o virus que requieren ser ingeridos por el huésped (Montesinos-Matías, 2009). Actualmente se sabe que la patogénesis en los insectos ocurre de manera progresiva, generalmente las fases en que se desarrolla son: adhesión, germinación de conidios, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, multiplicación del hongo (García *et al.*, 2008), producción de toxinas, muerte del insecto, colonización, producción de micelio hacia el exterior, esporulación y diseminación del hongo (Monzón, 2001).

El proceso de infección (Figura 3) inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto a través de fuerzas hidrófobas, debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas y de bajo peso molecular (10 kDa) llamadas hidrofobinas (Rodríguez y Arreondo, 2007). Posteriormente, bajo condiciones favorables de temperatura, nutrientes y humedad se produce un tubo germinativo y un apresorio que le sirve para fijarse a la cutícula, mientras que el tubo germinativo o haustorio (también denominado hifa de penetración) comienza la penetración al interior del insecto (Gaxiola-Castro, 2014). En dicha penetración se ven involucrados 2 mecanismos, uno físico que consiste en la presión ejercida por la hifa que se encarga de romper las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula; y uno químico, que consiste en la acción enzimática, principalmente dada por proteasas, esterases, lipasas y quitinasas secretadas por las hifas, estas enzimas se encargan de hidrolizar el tejido en la zona de penetración (Monzón, 2001).

La penetración es favorecida por efecto de la presión hidrostática y la formación de clavijas que penetran la cutícula del huésped (Rodríguez y Arredondo, 2007). El caso contrario, el fracaso del hongo para invadir la cutícula del insecto se ha atribuido a la presencia de compuestos inhibitorios, tales como ácidos grasos de

cadena corta, ésteres, aldehídos, fenoles, quinonas y lípidos presentes sobre la superficie de la cutícula. Hay evidencias que indican que algunos de estos compuestos están involucrados en la resistencia a la enfermedad (Montesinos-Matías, 2009). Una vez dentro del hemocele, la colonización del huésped se realiza por medio de blastosporas y micelio (Monzón, 2001; García *et al.*, 2008).

El hongo invade la hemolinfa, en cuyo caso la muerte del insecto es el resultado de una combinación de daños mecánicos producidos por el crecimiento del hongo, desnutrición y por la acción de metabolitos secundarios o toxinas. Bajo condiciones de humedad elevada, en un periodo de 24 a 48 h después de la muerte del insecto el hongo emerge, esporula y produce una capa de conidios en la superficie del insecto (Figura 4) para continuar con el ciclo infeccioso (Montesinos-Matías, 2012; Jaronski, 2013; Gaxiola-Castro, 2014). Es en esta fase que el insecto muerto adquiere una coloración característica de acuerdo a las esporas del hongo, por ejemplo, verde si es *Metarhizium* y blanco si es *Beauveria* (Monzón, 2001).



**Figura 3.** Proceso de infección de HEP, con énfasis en la acción sinérgica de presión mecánica y liberación de enzimas que hidrolizan la cutícula del huésped (Tomado de Montesinos-Matías, 2009).



**Figura 4.** *Beauveria bassiana* emergiendo de las áreas intersegmentales de un grillo mormón (*Anabrus simplex Haldeman*), y conidiando en la superficie de la cutícula, (Tomado de Jaronski, 2013).

*Beauveria bassiana* puede matar a su huésped previo a la invasión generalizada de órganos, mediante la secreción de toxinas (Núñez-Gaona, 2009). Las toxinas provocan alteraciones en varios de estos, paralizan las células o causan un mal funcionamiento del intestino medio, tubos de Malpighi, tejido muscular y hemocitos. El efecto inhibitorio sobre los elementos celulares de la hemolinfa, impide la actividad fagocítica de los plasmocitos y permite la rápida multiplicación del hongo, al reducir la habilidad del insecto para defenderse (Rodríguez y Arreondo, 2007).

Los conceptos de patogenicidad, virulencia y agresividad son comunes en el lenguaje técnico propuesto para los HEP. La patogenicidad es definida como la capacidad de un microorganismo para causar una enfermedad; virulencia es la intensidad con la que un organismo mata a un huésped específico y agresividad es la habilidad del patógeno para invadir a su huésped. Estos mecanismos varían con el aislado específico y con el huésped (Gaxiola-Castro, 2014).

## **2.5. Enzimas**

La complejidad de la acción enzimática en los HEP es compleja, sin embargo, se ha logrado relacionarla con su capacidad infectiva y patogenicidad sobre los

insectos (Rodríguez-Gómez, 2009). La cutícula del insecto es la primera barrera que debe enfrentar un HEP, constituida principalmente por quitina, proteínas, lípidos y compuestos fenólicos (Hegedus y Khachatourians, 1995; Monzón, 2001); debido a esto el hongo debe combinar el mecanismo de penetración física con su maquinaria enzimática. Diversos estudios han demostrado la presencia de quitinasas (NASas) y proteasas (Pr1 y Pr2), verificándose que éstas están altamente relacionadas con la virulencia en los HEP (Ballesteros-Torres, 2013).

### 2.5.1. Proteasas

Son enzimas que hidrolizan las proteínas por sus enlaces peptídicos, de acuerdo a su mecanismo de acción se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas (Rodríguez-Gómez, 2009). Las proteasas Pr1 (quimoelastasas o proteasas semejantes a subtilisina) y Pr2 (proteasas similares a tripsina) han sido descritas y caracterizadas en *M. anisoplie*, donde Pr1 es la responsable del procesos de hidrólisis de la cutícula, especialmente porque esta última está constituida en un 61-70% por proteínas (Bidochka, 1988), y Pr2, una enzima cooperadora de la misma. En *Beauveria bassiana* se ha visto que poseen funciones muy similares (Donatti *et al.*, 2008). La secreción de la carboxipeptidasa de *Beauveria bassiana* sobre la cutícula del huésped indica que provee los aminoácidos indispensables para el hongo, probablemente después de que la proteasa Pr1 solubiliza las proteínas de la cutícula. Dada la especificidad de acción de esta proteína, se cree que sirve como mecanismo de adaptación a las estructuras del huésped. Las metaloproteasas podrían actuar como un respaldo del sistema, complementando la acción de Pr1 (Rodríguez-Gómez, 2009). Varéa-Pereira *et al.*, (2007) realizaron un estudio en el que la producción de proteína extracelular de *B. bassiana* se vio incrementada, hasta en un 80% en las primeras 48 h, al reactivar la cepa primero en *Hypothenemus hampei* usando un medio de glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. La inducción de las proteasas por el efecto de la presencia de la cutícula de los insectos en el medio de cultivo ha sido comprobada en *Beauveria bassiana* tanto para medios de cultivo líquidos (Qazi y

Khachatourians, 2007; Donatti, 2008; Dias, 2008) como para medios de cultivo sólidos (Barranco-Florido *et al.*, 2002).

### 2.5.2. Quitinasas

Las quitinasas de diferentes pesos moleculares y las quitosanasas tienen una participación en el proceso de penetración, pues son las encargadas de reblandecer el exosqueleto del insecto (Kim *et al.*, 2010). Las quitinasas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces  $\beta$  1-4 de N-acetilglucosamina presentes en la quitina de insectos (Arakane y Muthukrishnan, 2009). La hidrólisis de la quitina se realiza por un sistema quitinolítico sinérgico y consecutivo, una primera hidrólisis, en la que se rompen moléculas complejas a oligómeros (endoquitinasas), y una segunda hidrólisis para la formación de monómeros de N-acetilglucosamina (exoquitinasas). Este proceso es utilizado por los hongos para el crecimiento y germinación de conidios, formación de apresorios y elongación de hifas (Ballesteros-Torres, 2011). Existen niveles basales de quitinasas para liberar inductores de las mismas. Las proteasas proveen los aminoácidos necesarios para el crecimiento, pero reprimen la síntesis de quitinasas (Rodríguez-Gómez, 2009). Al exponerse las fibras de quitina, y por acción de las hexosaminidasas se liberan fracciones de NAG, que inducen completamente la síntesis de quitinasas, lo que al final, redundando en la represión de la síntesis de proteasas hasta que los niveles excesivos de NAG disminuyen (Bidochka y Khachatourians, 1988). Se ha observado que usualmente la glucosa reprime la síntesis de las enzimas que despolimerizan la cutícula de los insectos, entre ellas las quitinasas (St. Leger *et al.*, 1986; Montesinos-Matías, 2012). Para los HEP, las quitinasas son herramientas de vital importancia durante el proceso de infección. *B. bassiana* tiene la capacidad de secretar al medio estas enzimas, estas se encuentran presentes en mayor cantidad que las proteasas (Ballesteros-Torres, 2011). Las quitinasas representan un factor importante de virulencia y sólo se requieren durante un corto periodo de tiempo en la penetración a la cutícula del huésped, su mayor producción se observa 40 h después de la

inoculación del hongo, es decir, durante la fase saprobia, después de la muerte del insecto (Havukkala, 1993).

### **2.5.3. Lipasas**

Las lipasas pertenecen a la familia de las carboxil éster hidrolasas que presentan actividad contra los enlaces éster carboxílicos en triglicéridos y actúa en la fase orgánica-acuosa liberando ácidos grasos y glicerol. Las lipasas desempeñan un papel importante en el proceso de infección a insectos, hidrolizando enlaces éster en las lipoproteínas, grasas y ceras que se encuentran abundantemente en los exoesqueletos (Cruz y Da Silva, 2014; Vici *et al.*, 2015). Las lipasas penetran la cutícula y comienzan la liberación de nutrientes una vez que logran romper el integumento, la degradación de la cutícula es seguida inmediatamente por la producción de proteasas Pr1 que se encargan de degradar todos los componentes proteicos presentes en la procutícula. Se ha identificado un mecanismo de defensa por parte de los insectos, éste se asocia con la secreción de  $\beta$ -lactona que es responsable de la inhibición de la actividad lipolítica impidiendo subsecuentemente la infección (Mondal *et al.*, 2016).

## **2.6. Producción de hongos entomopatógenos**

Se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (blastosporas y conidios) en un medio de cultivo. Se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales: arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados. Los métodos de producción van desde la multiplicación artesanal realizada por los mismos productores, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción a gran escala. La diferencia entre estos métodos no se manifiesta en la calidad del producto obtenido, sino en los procesos empleados y en los volúmenes de producción; ya que de realizarse un buen control de calidad con cualquiera de los métodos se obtiene un producto de alta calidad (Monzón, 2001).

En general, el proceso de producción está constituido por 2 etapas; obtención y producción del agente entomopatógeno. La primera consiste en el aislamiento y purificación del microorganismo, y la producción implica la preparación de los sustratos, inoculación e incubación, proceso de secado y cosecha del hongo.

En todo proceso de producción de hongos, la obtención del cultivo puro es el paso determinante, debido a que constituye la fuente de inóculo requerido para iniciar el proceso. Al obtener un cultivo puro, se debe asegurar que el aislamiento es reciente y que tiene todas las características de la cepa relacionadas principalmente a su viabilidad y patogenicidad (Monzon, 2001).

La mayoría de los sistemas de producción de hongos entomopatógenos utilizan un sistema bifásico (Mondal *et al.*, 2016. Villalba *et al.*, 2009, Mata, 2008): primero el micelio o cuerpos hifales son producidos en un medio líquido con agitación; para posteriormente, ser transferidos a un sustrato sólido para la producción de conidios aéreos.

## **2.7. Fermentación bifásica**

Inicialmente el hongo crece en un medio líquido hasta el final de la fase exponencial, para después transferir la biomasa a un sustrato sólido (Aponte y Carmona, 2000). El medio líquido empleado en la primera etapa de producción contiene una concentración adecuada de carbono y nitrógeno (Jaronski, 2013). En la fermentación sólida, el sustrato además de proveer una gran área superficial para la aireación, sirve también como soporte físico para la producción de estructuras germinativas (conidios aéreos) y puede ser usado como fuente de nutrientes por el hongo.

El sistema de la fermentación bifásica ofrece múltiples ventajas. Por ejemplo, el medio líquido puede servir como una barrera contra contaminantes que pudieran

estar presentes en el stock. El sistema promueve una mayor competitividad de los hongos, reduciendo así el riesgo de que el sustrato sólido sea colonizado por microorganismos contaminantes. Además, este proceso asegura una colonización uniforme del sustrato. Finalmente, la colonización y producción de conidios ocurren a mayor velocidad, reduciendo los tiempos del proceso (Machado *et al.*, 2010). En la Figura 5 se muestra el crecimiento de un HEP sobre un sustrato sólido; una vez terminado el período de producción, el hongo es secado y posteriormente se cosecha obteniendo un polvo que contiene conidios y micelio, además de pequeñas partículas del sustrato.



**Figura 5.** Sustrato sólido (copos de cebada) con *Beauveria bassiana*, notándose la presencia de conidios en forma de un polvo blanco sobre el sustrato (Tomado de Jaronski, 2013).

Una amplia variedad de sustratos han sido evaluados para la producción de *Ascomycetos*, siendo el arroz y la cebada los más utilizados en los trópicos y el hemisferio norte, respectivamente, existe un considerable esfuerzo para identificar y emplear materiales agrícolas económicos, especialmente subproductos o residuos agroindustriales como sustratos (Jaronski, 2013). En la Tabla 3 se enlistan varios de estos sustratos alternativos. Muy pocos estudios han examinado cuantitativamente algunos aspectos nutricionales tales como la relación C: N (Ortiz-Orquiza *et al.*, 2010) o niveles controlados de carbohidratos (Domenech *et al.*, 1998), no obstante, el arroz permanece como el sustrato elegido con más frecuencia principalmente porque se encuentra fácilmente disponible a un bajo costo.

**Tabla 3.** Sustratos sólidos evaluados para la producción de los principales *Ascomycetos* entomopatógenos (Tomado de Jaronski, 2013).

<b>Sustrato</b>	<b>Hongo</b>
Subproductos agrícolas	<i>Metarhizium</i>
Bagazo ± 2% dextrosa	<i>Beauveria</i>
Cebada	<i>Beauveria</i>
Betabel	<i>Beauveria</i>
Arroz quebrado	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Arroz quebrado+CaCl <sub>2</sub>	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Zanahoria	<i>Beauveria</i>
Virutas de Yuca	<i>Metarhizium</i>
Garbanzo	<i>Metarhizium</i>
Coco	<i>Beauveria</i>
Algodón	<i>Beauveria</i>
Mijo Koda	<i>Metarhizium</i>
Maíz	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Salvado de Maíz ± 2%dextrosa	<i>Beauveria</i>
Granos de mijo+N <sub>2</sub> orgánico	<i>Nomurae</i>
Mijo	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Neem	<i>Beauveria</i>
Mijo perla	<i>Beauveria</i>
Papa	<i>Beauveria</i>
Desechos de camarón	<i>Beauveria</i>
Cachaza ± 2%dextrosa	<i>Beauveria</i>
Arroz	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Arroz+ <i>Saccharomyces</i>	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Salvado de arroz	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Harina de arroz	<i>Metarhizium</i>
Cáscaras de arroz, aserrín: salvado de arroz ± 2%dextrosa	<i>Beauveria</i>
Cáscaras de arroz ± 2%dextrosa	<i>Beauveria</i>

Sésamo	<i>Beauveria</i>
Sorgo	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Soya	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Bagazo de caña de azúcar+levadura, melaza	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Yuca	<i>Beauveria</i>
Trigo	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Salvado de trigo+ Al(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	<i>Beauveria</i>
Salvado de trigo+N <sub>2</sub> orgánico	<i>Nomurae</i>
Salvado de trigo ± 2%dextrosa	<i>Beauveria</i>

Se han empleado múltiples soportes inorgánicos (inertes), como la diatomita (Jaronski, 2013), que se trata de una piedra silícica sedimentaria; ésta puede obtenerse en una gran variedad de tamaños desde varios milímetros de diámetro hasta un fino polvo. Tiene una gran relación superficie volumen y puede absorber líquidos por arriba de 110 a 140% de su propio peso. También se ha reportado el uso de gránulos de arcilla para la producción de *B. bassiana* (Desgranges *et al.*, 1993). A diferencia de los cereales y otros materiales orgánicos, los minerales ofrecen la ventaja de permitir un control flexible sobre los nutrientes, adaptados para cada especie y cepa, así como la posibilidad de ser reciclados después de un lavado y un proceso de esterilización (Jaronski, 2013), siendo el costo su principal desventaja.

## 2.8. Insecto modelo

Debido a la diversidad y variabilidad en el espectro de acción de los microorganismos utilizados para estos fines, e incluso de la especificidad de algunos de ellos sobre determinadas especies, es necesario tener insectos modelo para cada tipo de microorganismo y en algunos casos, también para diferentes cepas. Uno de estos insectos es *Tenebrio molitor*, que ofrece la ventaja de estar disponible todo el año, caso contrario de las plagas estacionales (Núñez-Gaona, 2009). Este

insecto es una plaga común de granos almacenados, cereales y sus productos (Montesinos-Matías, 2012).

Como características morfológicas, poseen dos pares de alas; las delanteras, son endurecidas (élitros), mientras que las internas, son membranosas y usadas para volar. Estos insectos poseen metamorfosis completa, con las etapas de huevo, larva, pupa y adulto. La larva se especializa en la búsqueda de distintos tipos de alimentos como: granos, harinas, tabaco, y comida en general; son altamente resistentes a temperaturas extremas, ya que pueden permanecer vivas durante 80 días a menos 50°C (Rodríguez-Gómez, 2009), las larvas son empleadas como alimento para algunas mascotas; la pupa, es una etapa de quietud, y el adulto que se especializa en la reproducción y la dispersión (Rodríguez-Gómez, 2009). Los adultos de *Tenebrio molitor* son utilizados por el parásito *Hymenolepis diminuta* como hospedero intermediario para facilitar su transmisión a la rata, que es su hospedero definitivo, al alimentarse de las heces de las ratas (Sholen *et al.*, 1996)

Las hembras suelen depositar de 250 a 1,000 huevos ovalados de color blanco y con forma de riñón, aisladamente o en racimo en los materiales alimenticios. Se incuban en un lapso de 4 a 18 días, dando lugar a larvas blancas que van adquiriendo un color amarillento a medida que crecen, cuando están desarrolladas miden de 2.5 a 3.75 cm de largo (Díaz-Gamez, 2014). El estado larvario tiene una duración de 8 a 10 semanas, el de pupa un promedio de 2 semanas, y la etapa adulta de 4 a 8 semanas hasta desovar (Sánchez y Burgos, 2014). La temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 27 °C, y no llega a completar su ciclo si es mayor a 30°C, la mayor ovoposición ocurre en los 26 °C (Díaz-Gamez, 2014).

*Tenebrio molitor* ha servido como modelo de investigación en muchos estudios de laboratorio debido a que son fáciles de adquirir de manera comercial. Además, su crianza dentro del laboratorio es muy sencilla, debido al tipo de alimentación y las condiciones para su mantenimiento (Rodríguez-Gómez, 2009).

### 3. ANTECEDENTES

Los trabajos con hongos entomopatógenos se han incrementado de manera significativa a través de los años, abarcando desde el estudio del mecanismo de infección hasta los modelos de producción. Como se mencionó antes, *Beauveria bassiana* es un hongo con gran aplicación dentro del control biológico, a continuación se describen brevemente estudios previos que sentaron las bases para este trabajo.

#### 3.1. *Beauveria bassiana* 885.2

Montesinos-Matías (2008), estudió diferentes cepas de *B. bassiana*, destacando la cepa 885.2 por su elevada velocidad de crecimiento radial y virulencia. Debido a lo anterior, se realizaron estudios de inducción/represión de enzimas hidrolíticas relacionadas con la virulencia, utilizando tres medios de cultivo: medio mínimo (MM), cutícula suplementada con glucosa (CG) y quitina suplementada con glucosa (QG); obteniendo una inducción en actividades enzimáticas específicas (U/ $\mu$ g de proteína) de: proteasas ( $0.379 \pm 0.036$ ), quitinasas ( $0.033 \pm 0.004$ ) y N-acetilglucosaminidasas ( $0.88 \pm 0.019$ ) (Montesinos-Matías, 2012).

Posteriormente, Jiménez-Alejandro (2016) evaluó el efecto de diferentes cutículas (chapulín, camarón y escarabajo) desproteinizadas y sin desproteinar como inductores sobre la producción de exoquitinasas (N-acetilhexosaminidasas, NHasas), realizando fermentaciones líquidas (pH 5, 25°C y 180rpm). Los resultados mostraron que con una mayor desproteización en dichas cutículas, se incrementó la producción de NHasas, debido a que con el tratamiento se eliminó la mayor cantidad de proteína del inductor dejando solamente la quitina de la cutícula. En la naturaleza no se encuentran insectos con cutícula desproteinizada, por tal razón en este trabajo se emplearon insectos completos.

### **3.2. Producción de conidios**

Gómez-Vásquez (2017) reportó que durante la fermentación líquida en medio Sabouraud adicionado con 0.05% de extracto de levadura la mayor concentración de conidios ( $7 \times 10^9$  conidios /mL) se obtuvo al tercer día de producción, mientras que la mayor producción de biomasa se observó al cuarto día.

### **3.3. Producción de enzimas**

*Beauveria bassiana* en cultivo sólido produce enzimas hidrolíticas como lipasas, proteasas y quitinasas (St. Leger *et al.*, 1993), estas son necesarias para la penetración del hongo a través de la cutícula de los insectos.

#### **3.3.1. Proteasas**

Michona (1972), relacionó la gravedad de las lesiones generadas en insectos por los hongos entomopatógenos con el nivel de proteasas producidas. Las proteasas se encuentran involucradas en la primera etapa de la infección de los hongos entomopatógenos, (Bidochka *et al.*, 1990), debido a que las proteínas son el constituyente más abundante en la cutícula de los insectos (61-70%).

Qazy *et al.* (2008), demostraron que al añadir fuentes de carbono y nitrógeno al Agar Sabouraud Dextrosa (SDA por sus siglas en inglés) se benefició la producción de proteasas.

Recientemente, Montesinos-Matías (2012) obtuvo una producción de proteasas de *B. bassiana* utilizando como única fuente de carbono y nitrógeno cutícula de *T. molitor* y glucosa a diferentes concentraciones, obteniendo 90 U/mL con una cepa silvestre. En contraste la adición de glucosa (5 g/L) produjo 4 U/mL de proteasas, lo que significó una disminución del 95%.

### 3.3.2. Quitinasas

Se ha demostrado que la producción de quitinasas por *B. bassiana* se encuentra regulada por mecanismos de inducción-represión a nivel sustrato. Por tanto, las actividades enzimáticas son distintas según sea la fuente de carbono y nitrógeno (de Moraes *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2005; Dhar *et al.* 2009; Ali *et al.*, 2010). No obstante, también se ha mostrado que la glucosa actúa como represor de la síntesis de estas enzimas (de Moraes *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2005; Safavi *et al.*, 2007).

#### 3.3.2.1. Exoquitinasas

Matsumoto *et al* (2004), compararon la producción de  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa en fermentación líquida *versus* fermentación sólida empleando una cepa de *V. lecanii* y quitina, alcanzándose valores de 540 y 965.5 U/g sustrato seco inicial (SSI), para esporas y micelio respectivamente. En fermentaciones sólidas se observó el mismo comportamiento, con las mayores producciones de enzima con esporas y micelio de 1016 y 1673 U/g SSI respectivamente, sin embargo dichos valores se alcanzaron hasta las 144 h, aspecto que se consideró como una desventaja por la necesidad de mantener la pureza del cultivo por un tiempo prolongado.

Rodríguez-Gómez (2009) reportó que en medios con glucosa 2.8% y nitrato de sodio, como únicas fuentes de C y N, la producción de hexosaminidasas de una cepa de *B. bassiana* alcanzaba títulos de 1.74 UI/g.

Jiménez-Alejandro (2016) realizó estudios en fermentación líquida con hongos fito y entomopatógenos, para determinar la actividad de exoquitinasas, siendo una cepa de *Penicillium* la que produjo mayor cantidad de dichas enzimas (1150 mU/mL).

### 3.3.2.2. Endoquitinasas

Rocha-Pino (2007) evaluó los perfiles de producción de endoquitinasas, N-acetilhexosaminidasas y proteasas a pH variable y un pH controlado de 5.0 en cultivos sumergidos empleando *L. lecanii* y quitina; e hidrocarburos como fuente de carbono, observando la expresión de endoquitinasas desde las primeras horas de cultivo y alcanzando una concentración mayor en las fermentaciones con pH controlado, a las 108 h (100 U/g SSI), para pH variable, se alcanzó la mayor productividad (300 U/g SSI) a las 120 h.

Jiménez-Alejandro (2016) produjo endoquitinasas con hongos entomo y fitopatógenos, en fermentación líquida, utilizando maltosa, polvo de camarón y peptona. Reportó la mayor actividad de quitinasas (4.865 U/mL) con una cepa de *L. lecanii*.

### 3.4. Humedad y actividad de agua

El contenido de humedad juega un papel determinante en el rendimiento final de conidios aéreos en fermentación sólida, pero la optimización de este parámetro puede ser compleja. Muchos hongos mitospóricos requieren contenidos elevados de humedad. Jenkins *et al.*, (1998) indicaron que los contenidos de humedad empleados más frecuentemente, calculados como la relación del porcentaje de agua presente en el substrato húmedo con respecto al peso seco, están en el intervalo de 35 a 60 %. Arzumanov *et al.* (2005) indicaron que la humedad depende mucho de variaciones inherentes a los procedimientos de cocción y tratamiento térmico. También mostraron que la actividad de agua puede interactuar con varios factores físicos y químicos que afectan el crecimiento fúngico debido a que alteran el potencial químico que existe entre el medio y el soluto intracelular, necesario para permitir el ingreso de agua a las células. Núñez-Gaona *et al.* (2005, 2006) estudiaron el efecto de la actividad de agua y la concentración de inóculo sobre el crecimiento y producción de conidios de *B. bassiana* utilizando salvado de trigo

como sustrato. Estos autores observaron crecimiento sólo en el intervalo de Aw de 0.97-0.99, así mismo establecieron que el tiempo de cultivo en fermentación sólida, puede ser reducido hasta la mitad sin causar alteraciones importantes en el rendimiento final de conidios aéreos.

### **3.5. Control de plagas**

*B. bassiana* posee una alta especificidad contra insectos, debido a que a lo largo del tiempo ha compartido nichos ecológicos con estos y ha desarrollado mecanismos de defensa contra ellos, es por eso que ataca con alta eficiencia a más de 200 especies de insectos de diferentes ordenes. Entre las que destacan: mosca blanca de los cítricos (*Aleurothrixus floccosus*), broca del café (*Hypothenemus hampei*), escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say), mosca común (*Musca domestica* Linnaeus), picudos (*Anthonomus* sp. Germar, *Cosmopolites* sp. Chevrolat, *Metamasius* sp. Linnaeus, *Rhynchophorus* sp.), saltamontes verde (*Turpilia opaca* Brunn), trips del melón (*Thrips palmi* Karny), gusano soldado o cortador (*Mythimna unipunctata* Haworth), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith), entre otros (Santamaría *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2002; Coates *et al.*, 2002).

### **3.6. Virulencia**

Diversos autores han reportado que la virulencia se encuentra ligada a la producción de toxinas y ácidos orgánicos cuando hay altas concentraciones de enzimas hidrolíticas extracelulares (St Leger *et al.*, 1996; Khachatourians, 1996; Talaei-Hassanloui *et al.*, 2006; Safavi *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2007). Montesinos-Matías (2008) determinó el porcentaje de mortalidad de distintas cepas de *B. bassiana*, en medio Agar Malosa Sabouraud (2 %) con avena (3 %) enriquecido con extracto de levadura (0.05 %), observando que para la cepa 885.2, el porcentaje de mortalidad fue de 97 % al día 15. Además de alcanzar un tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) de 5.91 ± 0.56 días. Posteriormente (2012), observó que larvas de *T. molitor* mostraron una mayor

resistencia a la infección de *B. bassiana* con respecto a sus análogos en etapa adulta, esto se atribuyó a una disminución en la respuesta inmunológica de los insectos adultos, debido a que durante esta etapa es prioritaria la reproducción. Por otro lado, las larvas se desprenden de los conidios por la liberación periódica de la exuvia y al arrastrarse debido a la forma de su movilidad (Altre *et al.*, 1999). Ensayos realizados por Santamaría (1998) con la mosca blanca de los cítricos (*Aleurothrixus floccosus*), reportando una mortalidad específica a las  $70 \pm 15$  h del 79-95 % en insectos sumergidos en una concentración de  $4.4 \times 10^{13}$  conidios/mL, cabe señalar que esta concentración es mayor a la utilizada por Montesinos-Matías (2008), la cual fue de  $1 \times 10^8$  conidios/mL.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto negativo de insecticidas sintéticos utilizados para el control de plagas, el control biológico representa una alternativa capaz de reducir el uso de estos productos, los cuales a lo largo de los años han ocasionado problemas serios de contaminación. *Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno que tiene la capacidad de infectar a distintos órdenes de insectos causantes de diversas plagas en cultivos de importancia económica; siendo uno de los controladores más utilizados en los programas de manejo integral de plagas.

Por tal motivo los procesos de producción de hongos entomopatógenos han generado interés, puesto que se busca obtener la mayor concentración de unidades infectivas para emplearlas como agentes de control de plagas; así mismo la virulencia y viabilidad de las mismas son un aspecto importante debido a que no sería rentable tener una producción elevada si no son capaces de controlar plagas.

El uso de sustratos económicos es una prioridad en los procesos fermentativos a nivel industrial. Es por ello que los residuos agroindustriales tales como la pulpa de remolacha, salvado de trigo, bagazo de caña, maíz quebrado, arroz quebrado, entre otras representan una alternativa para dichos procesos.

La fermentación bifásica busca aprovechar las mejores características tanto de la fermentación líquida como de la sólida, representando una alternativa ante las limitaciones de dichos bioprocesos.

Se ha demostrado que las enzimas de *Beauveria bassiana* producidas durante el mecanismo de infección son inducibles, es por ello que el uso de *Tenebrio molitor* como inductor en fermentación bifásica mejorará la virulencia y viabilidad de dicho entomopatógeno.

## 5. HIPÓTESIS

Los conidios de *Beauveria bassiana* producidos mediante fermentación bifásica con *T. molitor* como inductor tendrán una mayor viabilidad, virulencia y un tiempo letal 50 menor en comparación a los obtenidos sin inductor.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo general

Evaluar la virulencia de los conidios de *Beauveria bassiana* producidos en fermentación bifásica empleando *Tenebrio molitor* como inductor.

### 6.2. Objetivos específicos

- Determinar la producción de biomasa y conidios por fermentación líquida en un medio definido.
- Evaluar las cinéticas de producción de conidios con y sin inductor por fermentación sólida utilizando tres sustratos.
- Cuantificar la producción de quitinasas y proteasas en fermentación sólida.
- Determinar la viabilidad de los conidios producidos por fermentación bifásica.
- Evaluar la virulencia de los conidios producidos por fermentación bifásica.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Microorganismo

Se empleó la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2 (donada por el Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México), la cual se cultivó en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) al 4 % (p/p) enriquecido con 0.05 % de Extracto de Levadura (EL), incubándose a 25°C por 7 días, después de este periodo, los conidios se extrajeron empleando agua destilada y se conservaron en refrigeración (4°C). Para resguardar la homogeneidad genética, los conservados fueron el stock durante todo el trabajo experimental.

### 7.2. Inductor

Se utilizó *Tenebrio molitor* como inductor, los tres estadios del inductor se mantuvieron separados en cajas de plástico de aproximadamente 45 L (L 60 x A 25 x H 30 cm), alimentados con una mezcla de salvado de trigo (250 g) y avena (30 g) estéril. Se recolectaron cadáveres en estado adulto y fueron molidos en mortero.

### 7.3. Cinética de crecimiento y producción de biomasa en cultivo líquido.

Para determinar el tiempo de máxima producción de biomasa se realizó una cinética inoculando 1.5 mL de una suspensión de conidios con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  conidios/mL a un volumen de 150 mL en matraces de 500 mL con caldo Sabouraud Dextrosa (SD) al 4 % (p/p) enriquecido con 0.05 % de EL. Los matraces, se incubaron a 25°C con agitación orbital (180 rpm) (New Brunswick Scientific, modelo EXCELLA E24R), durante 10 días. Se tomaron muestras cada 24 h y la biomasa se determinó por espectrofotometría (Espectrofotómetro UV-Vis JENWAY modelo 6700) a 740 nm utilizando como blanco el medio de cultivo (Arnáiz *et al.*, 2000) y se contó el número de conidios mediante una cámara de Neubauer.

Para producir el inóculo para la fermentación sólida se utilizaron matraces de 1000 mL con 300mL del medio antes descrito, utilizando 3 mL de una suspensión de conidios con una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL, incubados bajo las condiciones antes mencionadas durante el tiempo determinado en la cinética.

## **7.4. Relación C: N**

### **7.4.1. Determinación de Nitrógeno total**

Para conocer la relación carbono/nitrógeno (C: N), se determinó el nitrógeno total empleando el método de Kjeldahl (Jakymec, 2001). El porcentaje de nitrógeno total fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{v_2 - v_1 (EqN)(N)}{M} \times 100 \quad (1)$$

Dónde:

%N: Porcentaje de nitrógeno total

V<sub>1</sub>: Volumen de ácido clorhídrico gastado al titular el blanco (mL)

V<sub>2</sub>: Volumen de ácido clorhídrico gastado al titular la muestra (mL)

EqN: Factor de ajuste para la cuantificación de nitrógeno total (14.007),

N: Normalidad del ácido clorhídrico utilizado en la titulación

M: Peso de la muestra.

### **7.4.2. Determinación de azúcares totales**

Se agregaron 20 mL de agua destilada a 5 g de cada sustrato con los diferentes niveles de inductor (0, 5, 10, 15 %) y se tomaron 200  $\mu$ L de esta mezcla, posteriormente se agregaron 100  $\mu$ L de fenol al 5 % (p/v), inmediatamente se adicionaron 500  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado dejándose reposar por 10 min, al término de este tiempo se mezcló y colocó en un baño de agua a temperatura ambiente durante 20 min y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490

nm (Lector de microplacas BIORAD, modelo iMark). Se empleó una curva estándar de glucosa a diferentes concentraciones (1-8 mg/mL) (Urbaneja *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos se presentarán como relación C:N (sección 8.2) siendo la cantidad de azúcares y nitrógeno total la usada para la determinación de esta relación.

## **7.5. Fermentación sólida**

Se llevó a cabo en cajas de plástico (L 10 x A 10 x H 4 cm) en las que se agregaron 25 g de cada sustrato con diferentes concentraciones de *T. molitor* molido como inductor (0, 5, 10, 15 %) y 32.5 mL de agua destilada (75 % de humedad). Cada mezcla (unidad experimental) se realizó por triplicado. Las cajas se esterilizaron e inocularon bajo condiciones asépticas, con 32.5 mL de una suspensión de esporas a una concentración de  $3.5 \times 10^9$  conidios/mL. Finalmente se incubaron a 25°C por 7 días, durante este periodo se tomaron muestras cada 24 h para cuantificar los conidios producidos. En condiciones estériles se tomaron cada 24 h muestras representativas de aprox. 5 g de cada mezcla las cuales fueron suspendidas en 20 mL de agua estéril. Las muestras se emplearon para realizar las determinaciones que se describen a continuación.

### **7.5.1. Cinética de producción de conidios**

Se tomaron alícuotas de 1mL (Sección 7.5), y se homogeneizó en un vórtex durante 2 min y se realizaron diluciones seriales de  $1 \times 10^{-1}$  a  $1 \times 10^{-3}$  para facilitar el conteo en hematocitómetro (cámara de Neubauer) empleando un microscopio óptico con el objetivo 40X (Núñez-Gaona, 2009).

## **7.5.2. Obtención del extracto enzimático**

Se suspendió 1 g de muestra en 20 mL de agua destilada estéril y se homogeneizó en un vórtex durante 2 min, posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL, para cada una de las determinaciones enzimáticas.

### **7.5.2.1 Actividad endoquitinasa**

Se determinó empleando como sustrato 100  $\mu$ L de una suspensión de quitina coloidal al 1% (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.7. Las muestras y testigos se hicieron reaccionar con proporciones iguales de sustrato, incubando a 30 °C y 180 rpm por 24 horas. Al finalizar la reacción, las muestras fueron ajustadas a un volumen de 1.2 mL con agua destilada y mezclándolas con un vórtex, posterior a esto se midió la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm, utilizando como blanco agua destilada. Se define una unidad enzimática, a la cantidad de enzima requerida para reducir la turbidez de la suspensión de quitina coloidal en un 5% bajo las condiciones experimentales mencionadas (Tronsmo y Harman 1993).

### **7.5.2.2 Actividad exoquitinasa**

A 200  $\mu$ L de extracto enzimático (apartado 7.5.2) se le agregaron 200  $\mu$ L de solución amortiguadora de citratos-fosfatos 0.2 M a pH 5.6. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L de solución de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida a 1 mg/mL (pNAG). La mezcla se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora, después se detuvo la reacción adicionando 1mL de NaOH 0.02 M (mezclando con un vórtex) y se leyó la absorbancia a 400 nm (Espectrofotómetro UV-Vis JENWAY modelo 6700). La cuantificación de p-nitrofenol liberado se determinó mediante una curva estándar de p-nitrofenol. Definiendo una unidad de actividad N-acetilhexosaminidasa como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$ mol de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones descritas (Tronsmo y Harman, 1993).

### **7.5.2.3 Actividad proteolítica**

Se determinó empleando la metodología reportada por García-Gómez *et al.* (2009), haciendo reaccionar 250µL de una solución de caseína al 2% (Hammerstein, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN,USA), (preparada en amortiguador de citratos y fosfatos a una concentración de 0.1 M a pH 5) con 250 µL de extracto enzimático a 30 °C con agitación de 180 rpm por 10 min, al término de este periodo se agregaron 500 µL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) 0.4M (J.T. Baker, Phillipsburg, PA, USA) y se homogeneizó con un vórtex, la mezcla se centrifugó a 11,000 x g durante 15 min a una temperatura de 4 °C. A 250 µL del sobrenadante, se le adicionaron 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (SIGMA, St. Louis, MO, USA) (diluido en agua destilada en una proporción 1:5), esta mezcla se hizo reaccionar durante 30 min a 30 °C, terminado el tiempo de reacción se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 665 nm. La curva estándar se construyó utilizando tirosina a diferentes concentraciones. Definiéndose; una unidad de proteasa como la cantidad de enzima que produce el color equivalente a 1 µM de tirosina en 1 ml de reacción por minuto a 30 °C y pH 5.

### **7.5.3 Actividad de agua ( $A_w$ )**

Se tomaron muestras representativas (aprox. 0.5 g) antes de inocular y durante la fermentación en sustrato sólido. Para la medición se empleó un higrómetro (aqualab, PAWKIT) (Núñez-Gaona, 2009). Se determinó la  $A_w$  cada 24 horas y se realizaron curvas de actividad de agua para cada uno de los tratamientos.

## **7.6. Pruebas cualitativas API® ZYM**

Se determinó la presencia o ausencia de distintas actividades enzimáticas mediante el sistema API® ZYM de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioMerieux), en el punto de muestreo de mayor producción de conidios. Cada pozo se inoculó con 100 µL de extracto enzimático proveniente de cada fermentación.

Posteriormente, se incubaron por 4 horas a 37°C, agregándose una gota del reactivo ZYM A y ZYM B por pozo, los resultados fueron con base en la presencia o ausencia e intensidad de color.

### **7.7. Viabilidad**

Al término de la fermentación sólida se tomaron alícuotas de cada sustrato y se realizaron diluciones seriales hasta alcanzar una concentración entre 50 y 300 conidios en 500 µL de agua destilada estéril; este volumen se inoculó en placas Petri de 90mm de diámetro. Las cajas se incubaron a 25 °C después de 24 h se observó la aparición de colonias (Monzón, 2001). El porcentaje de viabilidad es igual a la relación del número de colonias que emergieron en este tiempo entre el número de conidios contados por cámara de Neubauer, multiplicado por 100.

### **7.8. Bioensayos**

Se realizaron empleando la metodología propuesta por Montesinos-Matías (2008). Fueron seleccionadas larvas de *T. molitor* sanas, activas, del mismo tamaño y estadio, las cuales se sumergieron en una suspensión de conidios ajustada a una concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL (obtenida al final de la fermentación). El número total de larvas por tratamiento fue de 12 (unidad experimental) las cuales se sumergieron durante 15 segundos, cada unidad experimental se colocó en cajas de plástico transparente (L 12 cm x A 12 cm x H 6 cm) con sustrato estéril (avena). Las cajas fueron incubadas a 25 °C con un foto periodo luz/oscuridad de 12/12 h, realizando un monitoreo cada 24 h, retirando las larvas muertas y colocándolas en una cámara húmeda para facilitar la emergencia del micelio de *B. bassiana*. Los resultados fueron reportados con respecto al % de mortalidad obtenido diariamente.

#### **7.8.1 Determinación de tiempo letal 50% (TL<sub>50</sub>)**

Se calculó mediante dos métodos distintos. El primero según lo reportado por Fuentes (1995), el cual consistente en linealizar el porcentaje de mortalidad en

función del tiempo. Posteriormente se empleó la ecuación de la recta (ecuación 2) para calcular la media de la mortalidad. El segundo método fue mediante un análisis PROBIT según lo reportado por Rojas-Gutiérrez *et al.* (2017).

$$y = mx + b \dots (2)$$

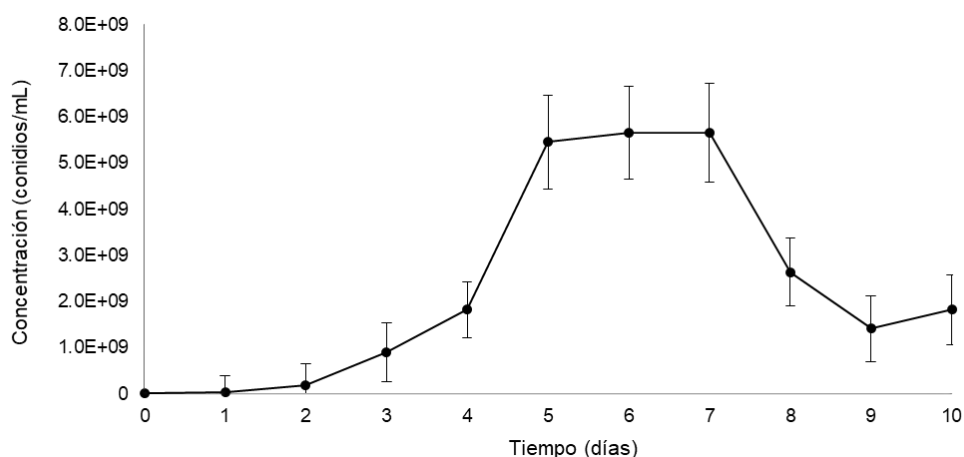
### **7.9. Análisis estadístico**

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™).

## 8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

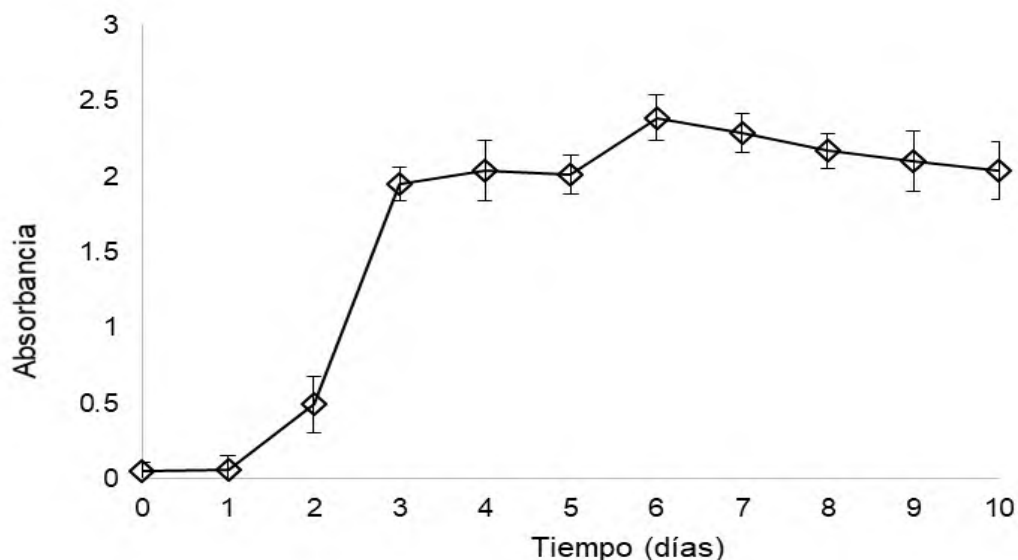
### 8.1 Cinética de crecimiento y producción de biomasa en cultivo líquido.

En la Figura 6 se muestran los resultados de la cinética de crecimiento de *B. bassiana* en cultivo líquido definido. Se observó la fase de crecimiento exponencial entre los días 2 y 5, posteriormente la fase de mantenimiento entre los días 5 y 7. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Gómez-Vásquez (2017) quien obtuvo el máximo crecimiento de *B. bassiana* al quinto día, realizando conteos de conidios por cámara de Neubauer y determinando la biomasa por peso seco.



**Figura 6.** Cinética de producción de conidios de *B. bassiana* en fermentación líquida.

Por otro lado, fue posible asociar la turbidez del medio con la producción de biomasa de *B. bassiana*, observándose la máxima absorbancia al sexto día de crecimiento (Figura 7). La ventaja del método espectrofotométrico es que es rápido, mientras que el recuento de microorganismos en cámaras no es un método muy exacto debido a las irregularidades en la distribución de la muestra; además pueden confundirse las células con otras formas orgánicas e inorgánicas (Arnáiz *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Producción de biomasa de *B. bassiana* crecida por fermentación líquida.

A su vez, se estableció que al sexto día se obtiene la mayor producción de conidios y biomasa, para su posterior uso como inóculo en FS. Esto debido a que se obtuvo una máxima producción de biomasa (Figura 7) y de conidios (Figura 6) a dicho día. Además de que permite economizar tiempos sin afectar la concentración inicial de inóculo para FS.

Al comparar ambas cinéticas se observó que tanto la producción de biomasa como la de conidios se encuentran asociadas, debido a este comportamiento fue posible asegurar la máxima producción de conidios y de biomasa al mismo tiempo para la cepa de *B. bassiana* 885.2.

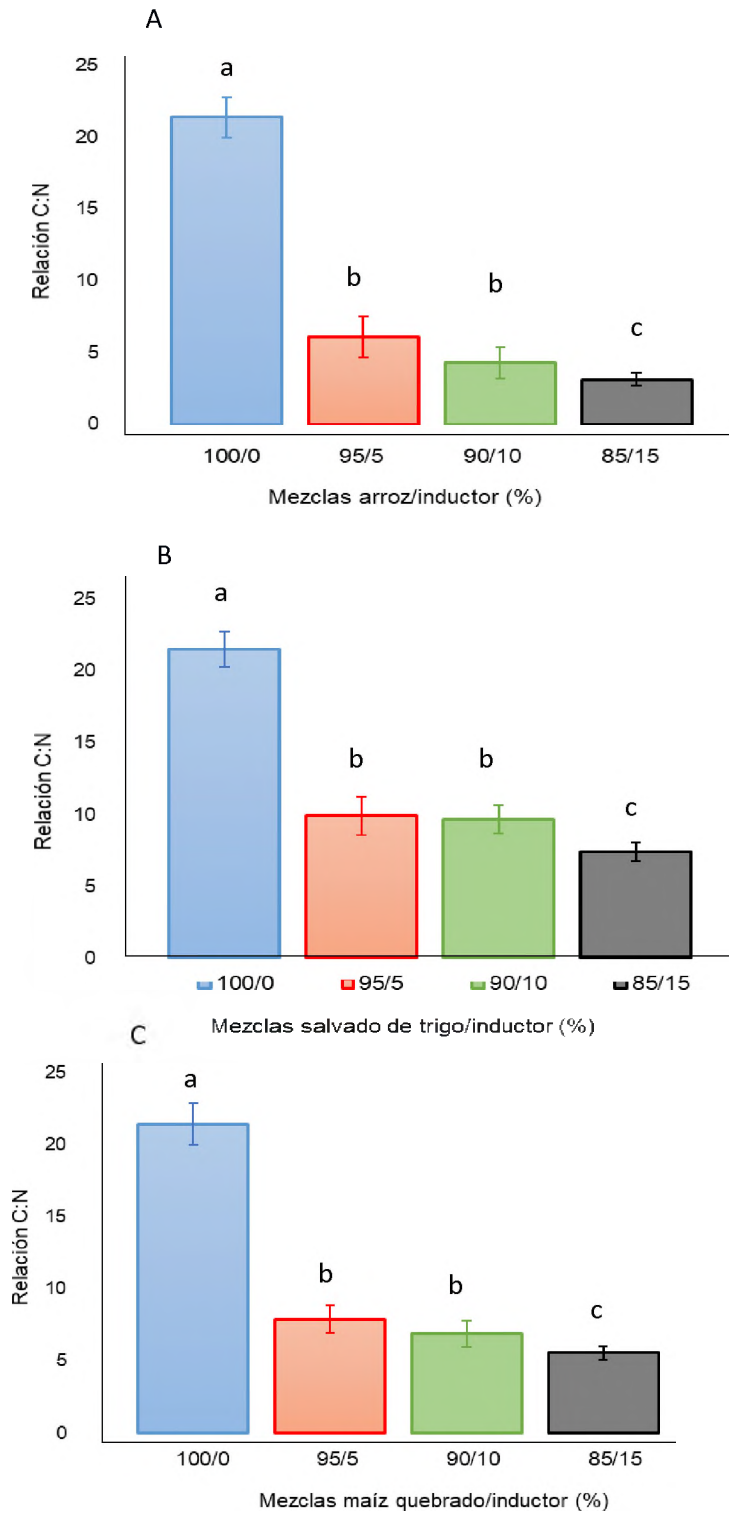
## 8.2 Relación C: N con diferentes sustratos

La Figura 8 muestra la relación C:N obtenida bajo diferentes sustratos. Cuando se utilizó arroz como sustrato se observó que el uso de inductor disminuye de manera proporcional a la relación arroz/inductor (Figura 8A), esto posiblemente al elevado contenido de nitrógeno del exoesqueleto del insecto adulto de *T. molitor* lo que generó valores de  $21.36 \pm 1.39$  para el arroz sin inductor y de  $3.1 \pm 0.46$  para la mezcla con 15% de inductor.

Para la relación C:N de las mezclas salvado de trigo/*T. molitor* (Figura 8B) se observó una tendencia similar a la de las mezclas de arroz/*T. molitor* cuyos valores fueron de  $21.48 \pm 1.23$  y  $7.42 \pm 0.64$  para el salvado de trigo sin inductor y la mezcla 85/15 % de inductor, respectivamente. Los valores obtenidos para este sustrato mostraron los mayores títulos para todas las mezclas en comparación con los otros sustratos.

En la Figura 8C se muestra la relación C: N para las diferentes mezclas de maíz quebrado/*T. molitor* en ella se observó que el valor de la relación carbono nitrógeno fue inversamente proporcional a la concentración de inductor presente en las mezclas. Los valores de C: N para las mezclas 100/0 y 85/15 fueron  $21.42 \pm 1.46$  y  $5.56 \pm 0.47$  respectivamente.

El uso de cadáveres de *T. molitor* como inductor con los diferentes sustratos estudiados mostró un efecto sobre la relación C: N, siendo inversamente proporcional a la concentración de inductor presente en las mezclas.



**Figura 8.** Relación Carbono/Nitrógeno obtenida para diferentes sustratos. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los grupos.

## 8.3 Fermentación sólida

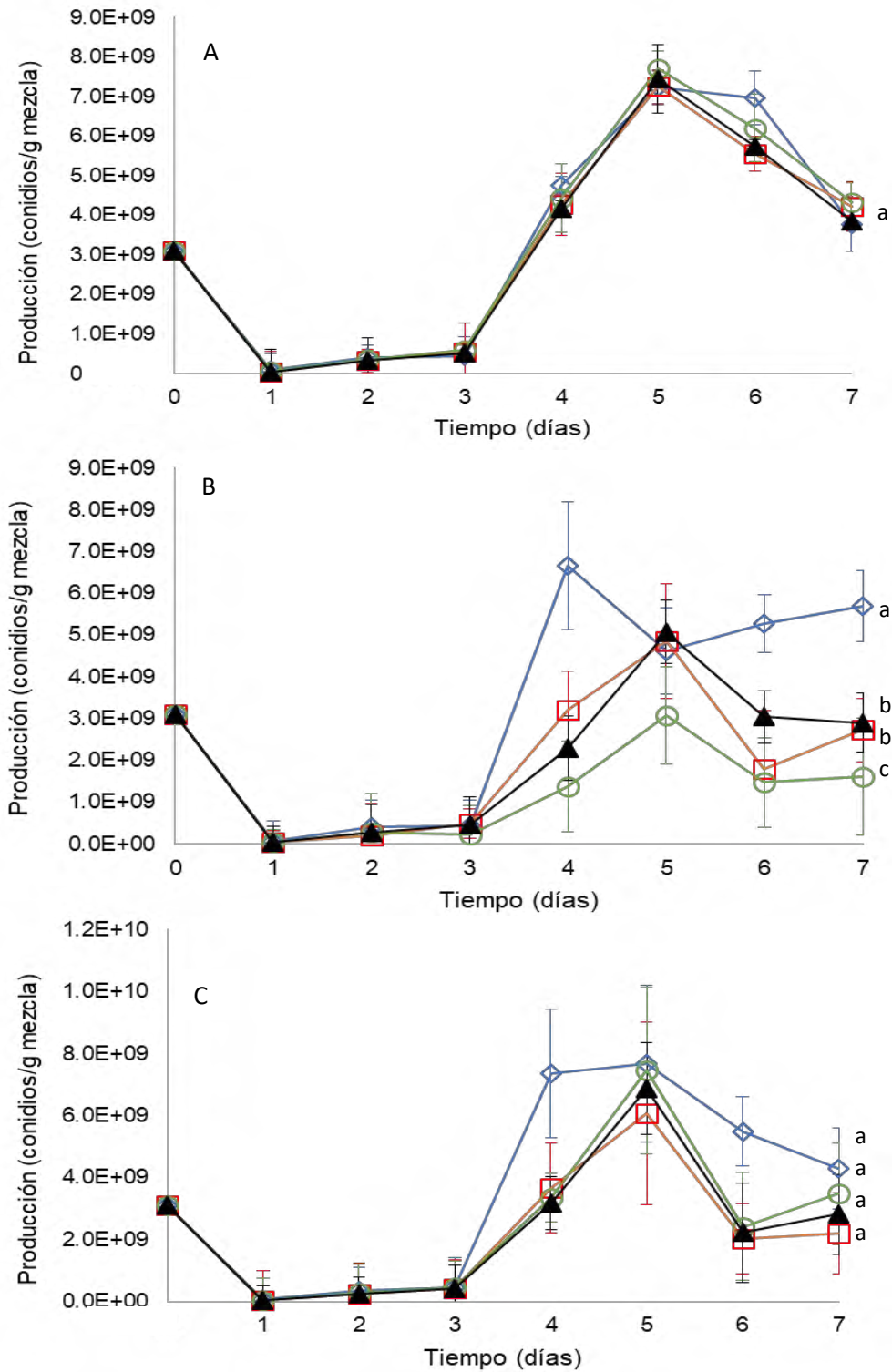
### 8.3.1 Cinética de producción de conidios

La Figura 9A muestra la producción de conidios de *B. bassiana* en función del tiempo para las mezclas de arroz/*T. molitor*, en ella se observa un incremento en esta a partir del día 3 y alcanza la mayor concentración en el día 5, independientemente del nivel de inductor. Los títulos obtenidos, de menor a mayor concentración de inductor, fueron:  $7.22 \times 10^9 \pm 4.2 \times 10^8$ ,  $7.25 \times 10^9 \pm 4.25 \times 10^8$ ,  $7.70 \times 10^9 \pm 4.50 \times 10^8$ ,  $7.43 \times 10^9 \pm 8.63 \times 10^8$  conidios/g de mezcla; obteniéndose el mayor título con la mezcla 90/10 %. En contraste con otros autores (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013; Villalba *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2010) quienes utilizaron arroz como sustrato obtuvieron títulos de producción por arriba de  $10^9$  conidios/g de sustrato, esto pudo deberse a dos principales causas; la primera a la concentración del inóculo que fue de  $2 \times 10^9$  conidios/mL, es decir, dos veces mayor que la utilizada en este trabajo; y la segunda al tiempo del bioproceso que tuvo una duración de entre 10 y 14 días (Méndez *et al.*, 2010).

La Figura 9B muestra la producción de conidios de *B. bassiana* para las mezclas de salvado de trigo/*T. molitor* observándose que para mezcla sin inductor (100/0) la mayor producción de conidios se obtuvo al cuarto día de fermentación ( $6.63 \times 10^9 \pm 1.53 \times 10^9$  conidios/g de sustrato), siendo este el valor máximo alcanzado de todas las mezclas de salvado de trigo/inductor, y disminuyó de manera acentuada para el siguiente día, teniendo un incremento gradual del sexto al séptimo día. El resto de las mezclas mostraron comportamientos similares, alcanzando los mayores títulos en el día 5. Los menores títulos se obtuvieron con la mezcla 90/10 ( $3.08 \times 10^9 \pm 1.17 \times 10^9$  conidios/g de sustrato) Es importante señalar que con el tratamiento 90/10 % se obtuvo la menor producción de conidios.

En la Figura 9C se muestra la producción de conidios en función del tiempo para las mezclas de maíz quebrado/*T. molitor*; se observó que para la mezcla sin inductor (100/0) la mayor concentración de conidios ( $7.37 \times 10^9 \pm 2.07 \times 10^9$  conidios/g de sustrato) se alcanzó al día 5, este valor disminuyó de manera gradual hacia el final de la fermentación.

La producción de conidios para el resto de las mezclas mostró comportamientos similares, obteniendo los mayores títulos al quinto día de fermentación siendo:  $7.66 \times 10^9 \pm 2.53 \times 10^9$ ,  $6.08 \times 10^9 \pm 2.94 \times 10^9$ ,  $7.46 \times 10^9 \pm 2.69 \times 10^9$  y  $6.86 \times 10^9 \pm 1.49 \times 10^9$  conidios/g de sustrato (de menor a mayor concentración de inductor) disminuyendo de manera gradual después de esto. En contraste con lo obtenido por Villalba *et al.* (2009) quienes reportaron una concentración de  $3 \times 10^{10}$  esporas/g de sustrato utilizando una mezcla de aserrín de madera blanca y maíz, esta elevada producción se puede atribuir al empleo de una concentración 2 veces superior a la empleada en este.



**Figura 9.** Cinética de producción de conidios las mezclas de sustrato/*T. molitor* (%). 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲). (A) arroz, (B) salvado de trigo, (C) maíz quebrado. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los grupos

Se ha reportado con mayor frecuencia el uso de arroz como sustrato para la producción de conidios aéreos de *B. bassiana*, (Gandarilla-Pacheco *et al.*, 2013; Villalba *et al.*, 2009). Los rendimientos reportados para los hongos entomopatógenos con este sustrato han sido de hasta  $10^{10}$  conidios/g de sustrato, con un valor frecuente de  $10^9$  conidios/g de sustrato para la mayoría de las especies, con tiempos de incubación mayores a los 10 días (Méndez *et al.*, 2010), sin embargo, existen pocos reportes sobre el uso de maíz y salvado de trigo para la producción de conidios de *B. bassiana* en sustrato sólido. Es importante mencionar que en este trabajo fue posible obtener títulos de  $10^9$  conidios/g de sustrato, esto para cada uno de los tratamientos (arroz, salvado de trigo y maíz quebrado), es por ello que el uso de sustratos no convencionales como los antes mencionados representa una alternativa para producción de HEP a bajo costo.

### 8.3.2 Actividades enzimáticas

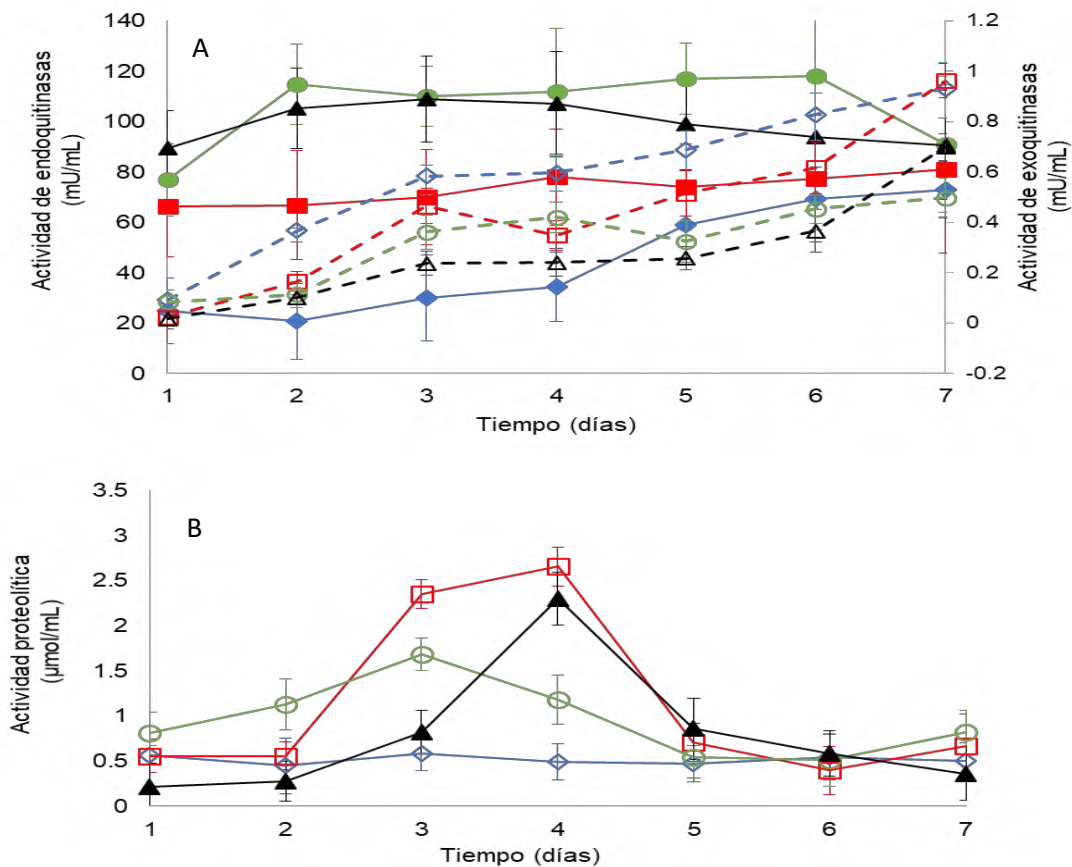
#### a) Arroz/inductor

La Figura 10A muestra la producción de endoquitinasas de *B. bassiana* en fermentación sólida en función del tiempo para las mezclas de arroz/inductor. Al inicio de la fermentación se observó que el incremento en la concentración de cutícula de *T. molitor* en las mezclas tuvo un efecto positivo sobre la producción de estas enzimas, obteniéndose un valor máximo de  $118.2 \pm 25.2$  U/mL con la mezcla 90/10 a los dos días de fermentación. Se observó de manera general que a mayor concentración de inductor, mayor la producción de endoquitinasas, sin embargo, en la mezcla con una mayor concentración de inductor (85/15), tras alcanzar su mayor pico en el segundo día ( $109.03 \pm 17.92$  U/mL) mostró un descenso hasta el final de la fermentación; esto puede atribuirse a una inhibición por el inductor, situación que no ocurre con las otras concentraciones podría deberse a que la elevada presencia del inductor promueva dicha inhibición. La mezcla sin inductor mostró los valores más bajos de actividad endoquitinasa durante esta fermentación, detectándose una

concentración inicial de 22 U/mL y alcanzando su valor máximo de producción en el día 7 (65 U/mL).

De manera general, se ha establecido que la acción endoquitinasa precede la actividad exoquitinasa debido a que los productos de reacción de las primeras sirven de substrato a las segundas, sin embargo en la Figura 10A se observa que ambas actividades fueron detectadas desde el comienzo de la fermentación, lo que indica que estas enzimas son constitutivas (Jiménez-Alejandro, 2016). En lo que respecta a la actividad exoquitinasa, los valores más bajos correspondieron a la mezcla (85/15), teniendo una actividad inicial de 0.05 mU/mL y alcanzando su mayor producción de 0.6 mU/mL durante el día 7, lo que sugiere la posibilidad de que la elevada concentración de inductor haya promovido una inhibición de la misma manera que para la actividad endoquitinasa. Las mezclas 95/5 y 90/10 alcanzaron su mayor punto de producción el día 7 con 0.95 mU/mL y 0.5 mU/mL respectivamente. La muestra sin inductor mostró los mayores valores de actividad exoquitinasa alcanzando su mayor producción el día 7 (0.96 mU/mL).

La Figura 10B, muestra la actividad proteolítica de *B. bassiana* para mezclas de arroz/*T. molitor*, en esta se puede observar un efecto positivo del inductor sobre esta actividad obteniéndose la mayor concentración ( $2.65 \pm 0.82$   $\mu\text{mol/mL}$ ) con la mezcla 95/5 al cuarto día de fermentación.



**Figura 10.** Actividades enzimáticas para las mezclas de arroz/*T. molitor* (%). Actividad endoquitinasas (a), 100/0(-◇-), 95/5 (-□-), 90/10 (-○-), 85/15(-▲-), (A) actividad exoquitinasas 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲), (B) actividad proteolítica, 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲)

Se realizó un análisis comparativo de medias por la prueba de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha$  de 0.05 para las actividades endoquitinasa y exoquitinasa. La actividad endoquitinasa con arroz como sustrato adicionado con diferentes niveles de inductor se ordenó en dos grupos que difirieron significativamente entre ellos. El primero compuesto por el tratamiento sin inductor (A) y el segundo por el resto de mezclas (B). Así mismo la actividad exoquitinasa se ordenó en 3 grupos que difirieron significativamente entre ellos, el primero compuesto por el tratamiento sin inductor (A), el segundo por la mezcla 95/5 (B) y el tercero por las mezclas 90/10 y 85/15 (C). (Anexo 12.2.1).

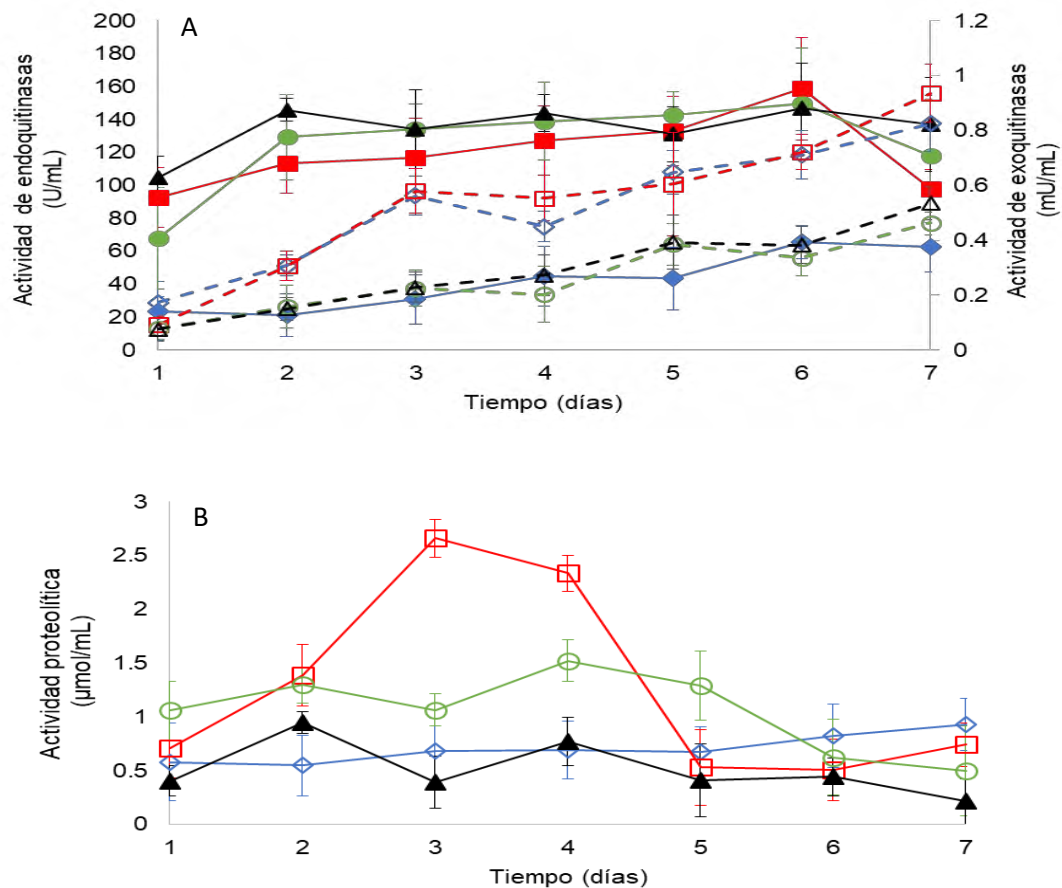
A su vez, dicho análisis se realizó para la actividad proteolítica con arroz quebrado mostraron dos grupos de diferencias significativas, el primero compuesto por las mezclas 100/0 y 95/5 (A) y el segundo por las de 90/10 y 85/15 (B) (Anexo 12.2.1).

## **b) Salvado/inductor**

En la Figura 11A se presenta la actividad endoquitinasa, exoquitinasa y proteasa con mezclas de salvado de trigo/*T. molitor*, se observó que en los primeros 4 días de la fermentación la actividad de estas enzimas fue directamente proporcional a la concentración del inductor; obteniéndose la mayor concentración ( $158.9 \pm 31.1$  U/mL) con la mezcla 95/5 al sexto día, después se observó una disminución gradual. La mezcla sin inductor, al igual que en el caso de las mezclas con arroz, la actividad endoquitinasa detectada en ella fue menor al resto de los tratamientos, alcanzando su máximo de producción el sexto día (60 U/mL).

Respecto a la actividad exoquitinasa detectada, se observó que agregar 5% de inductor favoreció la producción de exoquitinasas, obteniéndose la mayor concentración ( $0.93 \pm 0.09$  mU/mL) al séptimo día de fermentación, sin embargo, incrementos mayores a esta concentración redujeron la actividad de estas enzimas sugiriendo una acción inhibitoria por parte del sustrato a partir de ese punto. Cabe mencionar que esta misma situación se pudo apreciar empleando arroz a la misma concentración de inductor.

Referente a la actividad proteolítica (Figura 11B) para mezclas de salvado de trigo/inductor se observó nuevamente que el inductor tuvo un efecto positivo, excepto para la mezcla con mayor concentración sobre la producción de estas enzimas, obteniéndose la mayor actividad ( $2.6 \pm 0.396$   $\mu$ mol/mL) con la mezcla 95/5 al tercer día, también se observó que este efecto positivo sólo es durante los primeros cuatro días de fermentación, a partir del quinto día hubo un decremento gradual para todas las concentraciones de inductor, lo que es atribuible a que el hongo reutilice las proteasas para mantener su metabolismo.



**Figura 11.** Actividades enzimáticas para las mezclas de salvado de trigo/*T. molitor* (%). Actividad endoquitinasas (a), 100/0(-◇-), 95/5 (-□-), 90/10 (-○-), 85/15(-▲-), actividad exoquitinasas (a) 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲), actividad proteolítica (b) 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲)

Se realizó un análisis comparativo de medias por la prueba de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha$  de 0.05 para la actividad de endoquitinasa y exoquitinasa. La actividad endoquitinasa con salvado como sustrato adicionado con diferentes niveles de inductor se ordenó en dos grupos que difirieron significativamente entre ellos. El primero compuesto por los tratamientos 95/5 y 90/10 (A) y el segundo por el resto de mezclas (B). En la actividad exoquitinasa se observaron tres grupos que difieren significativamente entre ellos, el primero compuesto por el tratamiento 100/0 (A), el segundo por el de 95/5 (B) y el tercero por los de 90/10 y 85/15 (C) (Anexo 12.2.1).

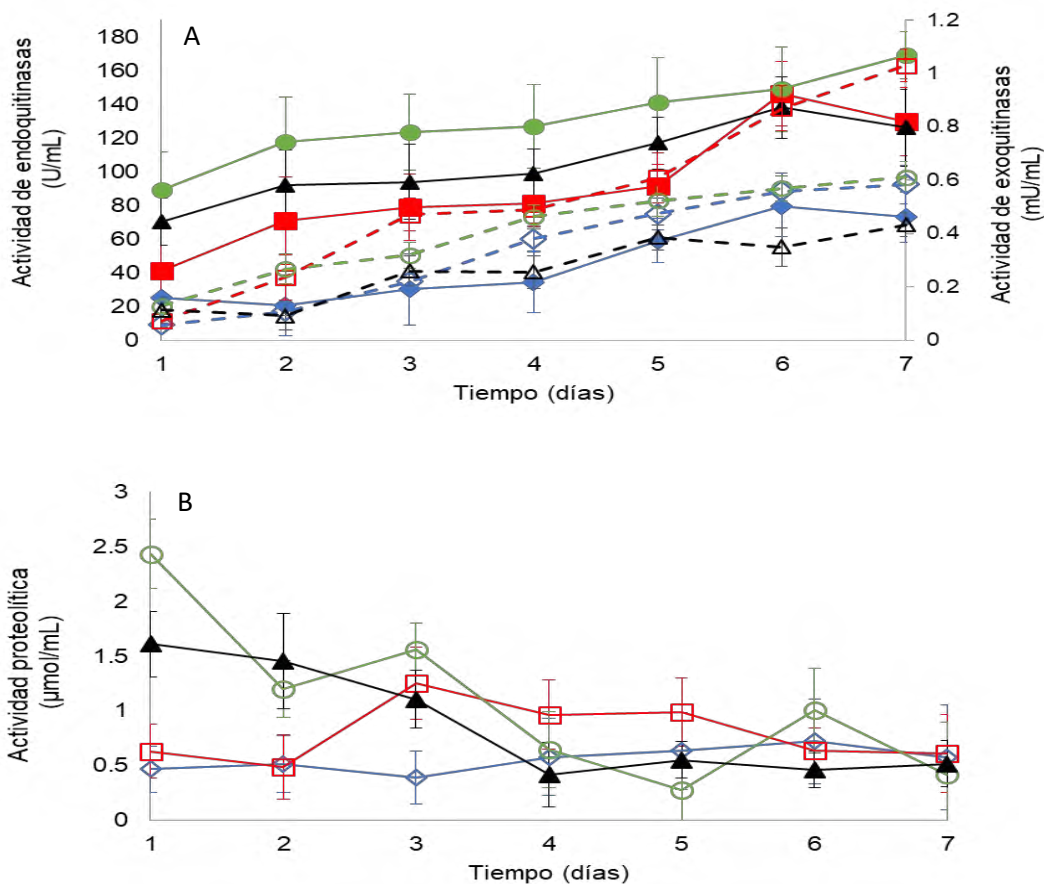
De igual manera se realizó dicho análisis para la actividad proteolítica con salvado de trigo observándose dos grupos, el primero con los tratamientos 95/5, 90/10, 100/0 (A), y el segundo con la mezcla 85/15 (B) (Anexo 12.2.1).

### **c) Maíz quebrado/inductor**

La Figura 12A muestra el comportamiento de la actividad de endoquitinasas en función del tiempo para mezclas de maíz quebrado/*T. molitor*. En ella se observó que esta actividad se vio favorecida con la mezcla 90/10, obteniéndose un valor máximo de  $169.2 \pm 14,01$  U/mL al séptimo día de fermentación. De manera general los menores títulos se obtuvieron con la mezcla 95/5, seguidos por los obtenidos en la mezcla con la mayor concentración de inductor comportamiento que fue similar al observado para los tratamientos con arroz como sustrato.

La actividad exoquitinasa en las mezclas de maíz quebrado/ *T. molitor* se favoreció en los tratamientos con las concentraciones de 95/5 y 90/10, la mayor actividad se obtuvo en la mezcla 95/5 ( $1.03 \pm 0.060$  mU/mL) al séptimo día de fermentación. De manera general, la producción de exoquitinasas fue favorecida de manera inversamente proporcional al incremento del inductor en las mezclas, lo que podría atribuirse a una represión catabólica.

En lo que refiere a la actividad proteolítica (Figura 12B) en función del tiempo para las mezclas de maíz quebrado/inductor, se pudo observar que las mayores concentraciones ( $2.43 \pm 0.904$  y  $1.61 \pm 0.96$   $\mu\text{mol/mL}$ ) se obtuvieron al inicio de la fermentación con las mezclas 90/10 y 85/15 respectivamente, disminuyendo gradualmente conforme avanzó la fermentación. La mezcla 95/5 se incrementó de forma gradual hasta obtener la mayor concentración al día tres ( $1.25 \pm 0.865$   $\mu\text{mol/mL}$ ), los títulos obtenidos en el día 4 y 5 fueron prácticamente iguales, descendiendo gradualmente hacia el final de la fermentación.



**Figura 12.** Actividades enzimáticas para las mezclas de maíz quebrado/*T. molitor* (%). Actividad endoquitinasas (a), 100/0(--◇--), 95/5 (--□--), 90/10 (--○--), 85/15(--▲--), actividad exoquitinasas (a) 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲), actividad proteolítica (b) 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲)

Se realizó un análisis de medias empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia,  $\alpha$  de 0.05 para la actividad de endoquitinasas empleando maíz quebrado como sustrato, mostró dos agrupaciones de los tratamientos. El primero formado por las mezclas 90/10 y 85/15 (A) y el segundo compuesto por las mezclas 100/0 y 95/5 (B). A su vez dicho análisis para la actividad de exoquitinasas dividió a los tratamientos en tres grupos, el primero formado por la mezcla 95/5 (A), el segundo por 100/0 y 90/10 (B) y el último por la 85/15 (C) (Anexo 12.2.1C).

Este análisis también se realizó para la actividad proteolítica empleando mezclas de maíz quebrado/inductor en el cual no se observaron diferencias significativas (Anexo 12.2.1).

Resulta evidente el efecto de emplear cutícula de *T. molitor* como inductor para la producción de endoquitinasas en fermentación sólida, debido a que su presencia incrementó los títulos de estas enzimas para todos los sustratos empleados, sin embargo estos son considerablemente más bajos a los reportados por Jiménez-Alejandro (2016), la autora produjo endoquitinasas con *L. lecanii* en fermentación líquida, utilizando maltosa, polvo de camarón y peptona, reportó la mayor actividad de quitinasas (4.865 U/mL) una mayor producción con respecto a la observada en este trabajo, esto debido a que la cepa 885.2 de *B. bassiana* (una cepa mutada) produce 8 veces menos quitinasas que la cepa silvestre (Loera, 2005).

La producción de exoquitinasas se vio favorecida por la adición de *T. molitor* como inductor independientemente del sustrato empleado, siendo la concentración de 5% la que tuvo un mayor efecto, sin embargo, los títulos fueron menores con respecto a lo reportado por Jiménez-Alejandro (2016) quien obtuvo una concentración máxima de 3.29 mU/mL contra  $1.03 \pm 0.045$  mU/mL obtenida en este trabajo, esto puede deberse a que la autora empleó diferente sustrato en condiciones distintas para la fermentación (cutícula de chapulín desproteinizada en fermentación líquida).

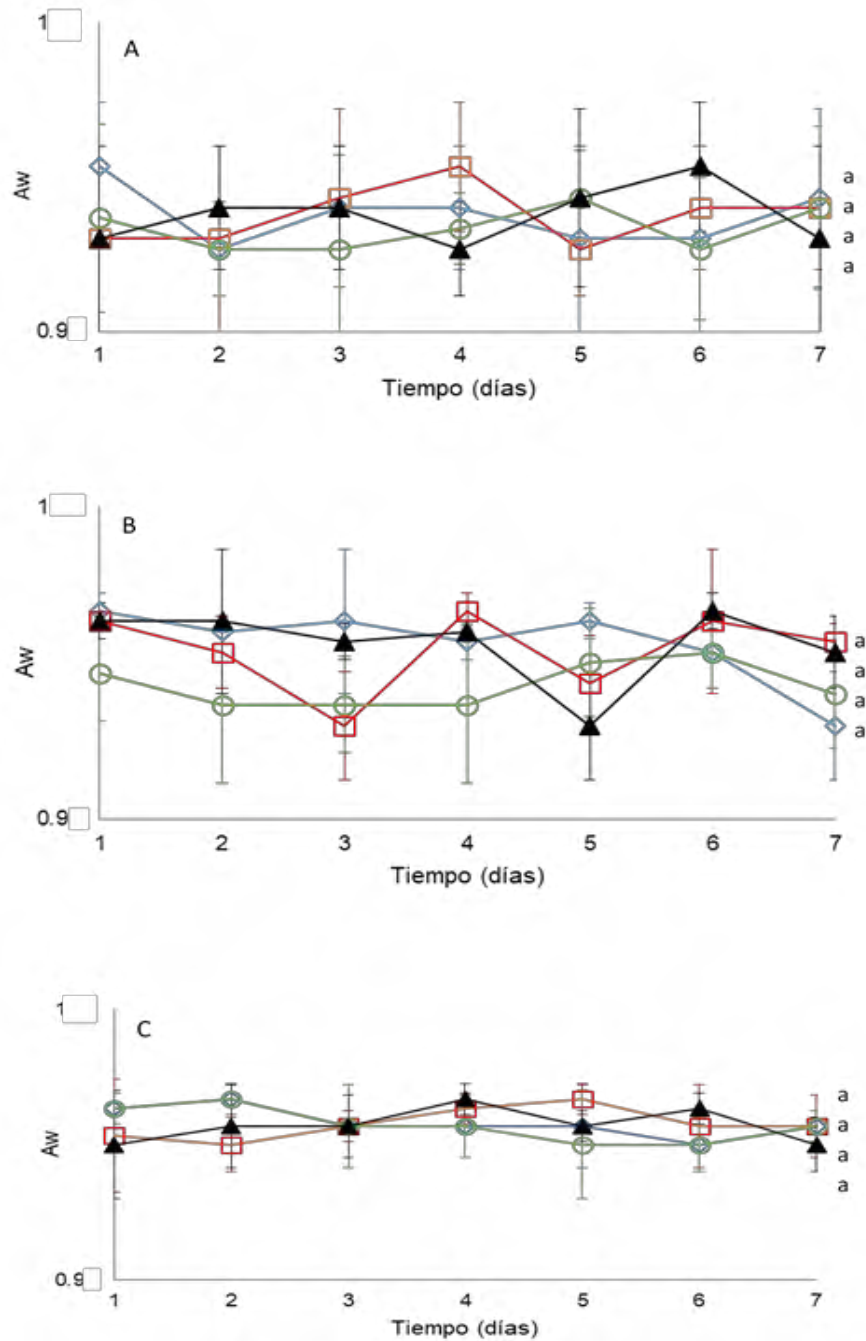
El uso de *T. molitor* como inductor tuvo un efecto positivo en la actividad proteolítica en cada uno de los sustratos evaluados, variando únicamente la concentración a la que se obtuvieron los mejores títulos, para arroz y salvado de trigo fue de 5 % y para maíz quebrado de 10 % Sin embargo, los mayores títulos obtenidos estuvieron por debajo de lo reportado por García-Gómez (2009) quien obtuvo 79.71 mU/mL en cultivo líquido con la cepa 2095 de *Aspergillus oryzae*, siendo este hongo filamentoso estudiado por su alta capacidad de producción de enzimas proteolíticas, además del proceso de producción (FL) maximiza la secreción de dichas enzimas en contraste al cultivo sólido realizado en este trabajo.

### 8.3.3 Actividad de agua ( $A_w$ )

La Figura 13A muestra el comportamiento de la actividad de agua ( $A_w$ ) para las mezclas de arroz/inductor, en esta se observó que la mezcla sin inductor alcanzó en el primer día un valor de  $0.98 \pm 0.02$  siendo el valor más elevado para todas las mezclas con arroz evaluadas, también se observó poca variación entre los valores de  $A_w$  para las diferentes mezclas en el tiempo, los valores alcanzados por todas las mezclas coinciden con lo reportado en la literatura, donde se menciona la necesidad de un valor elevado de actividad de agua para el crecimiento de hongos en fermentación sólida, tales como los obtenidos por Núñez-Gaona (2009) que en medio Sabouraud glucosa al 4% reportó  $A_w$  de 0.973 y en PDA 0.994.

La Figura 13B muestra el comportamiento con respecto al tiempo de la actividad de agua para las diferentes mezclas de salvado de trigo/inductor, el mayor valor se reportó al cuarto día del bioproceso en la mezcla de 95/5 ( $0.99 \pm 0.023$ ) y el menor para la de 90/10 ( $0.95 \pm 0.015$ ) ocurrido al quinto día. Los valores obtenidos concuerdan con lo concluido por Aguirre *et al.* (2009) para el hongo entomopatógeno *Nomurea rileyi* mostrando mayores tasas de crecimiento con una actividad de agua elevada ( $>0.95$ ).

La Figura 13C muestra el comportamiento de la actividad de agua para las mezclas de maíz quebrado/*T. molitor* en ella se observó una variación pequeña del valor de actividad de agua para las distintas mezclas evaluadas en el tiempo, concordando nuevamente con lo reportado por Aguirre *et al.* (2009), donde la mayor producción del hongo entomopatógeno *N. rileyi* se encontró con valores de  $A_w$  mayores a 0.95 en fermentación sólida.



**Figura 13.** Cinética de actividad de agua ( $A_w$ ) para las mezclas de sustrato/*T. molitor* (%). 100/0(◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15(▲). (A) arroz, (B) salvado de trigo, (C) maíz quebrado. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre los grupos

La actividad de agua en fermentación sólida es un parámetro importante para la producción de hongos entomopatógenos. Los valores de actividad de agua obtenidos para todas las mezclas con los diferentes sustratos coincidieron con lo

reportado (0.96-0.99) por Núñez-Gaona (2009) para la misma cepa empleando salvado de trigo sin inductor.

#### **8.4 Pruebas cualitativas API® ZYM**

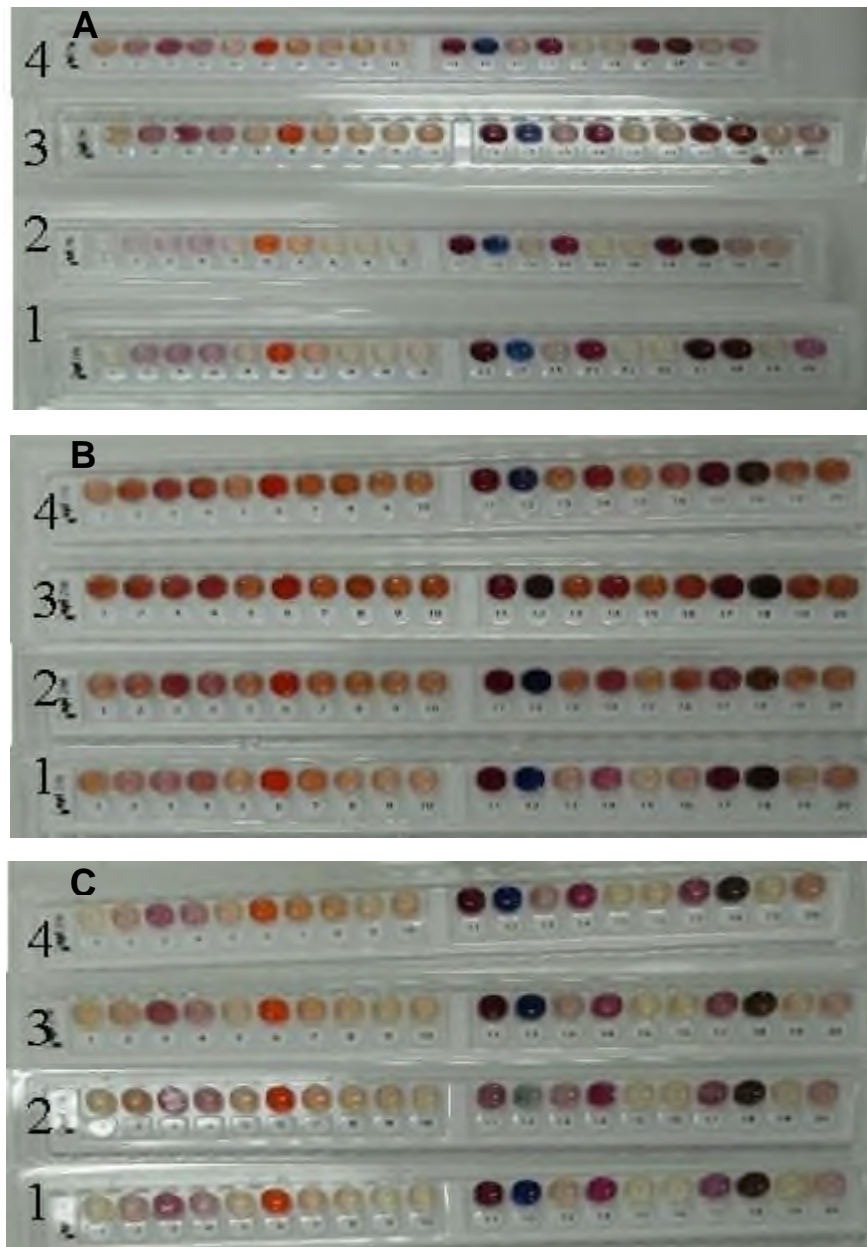
La Figura 14A muestra de forma colorimétrica la producción de enzimas: fosfatasas, esterasas, lipasas, arilamidasa, tripsina, quimotripsina, galactosidasa, N-acetilglucosaminidasa entre otras. Se observa que el nivel de inducción no tuvo un efecto con respecto a la expresión total de enzimas, se observa por intensidad de color que la cantidad de enzimas producidas en fermentación sólida utilizando arroz como sustrato se favoreció con respecto al nivel de inducción.

La Figura 14B muestra de forma colorimétrica la producción de enzimas: fosfatasas, esterasas, lipasas, arilamidasa, tripsina, quimotripsina, galactosidasa, N-acetilglucosaminidasa entre otras. Se observa que el nivel de inducción no tuvo un efecto con respecto a la represión total de la producción de enzimas, pero se observa que, por intensidad de color, la cantidad de enzimas producidas en fermentación sólida utilizando salvado de trigo como sustrato se ve favorecida con respecto al nivel de inducción.

La Figura 14C muestra de forma colorimétrica la producción de enzimas: fosfatasas, esterasas, lipasas, arilamidasa, tripsina, quimotripsina, galactosidasa, N-acetilglucosaminidasa entre otras. Se observa que el nivel de inducción no tuvo un efecto con respecto a la represión total de la producción de enzimas, pero se observa que, por intensidad de color, la cantidad de enzimas producidas en fermentación sólida utilizando maíz como sustrato se ve favorecida con respecto al nivel de inducción.

El-Sayed *et al.* (1992; 1993) realizaron pruebas API® ZYM para la identificación de manera cualitativa de diferentes tipos de enzimas que produjeron *Nomuraea atypicola*, *N. anemonoides*, *M. anisopliae* y *B. bassiana*, utilizando Agar Maltosa Sabouraud (AMS) como sustrato, concluyendo que dichos hongos entomopatógenos producen enzimas similares entre ellos (lipasas, tripsinas,

proteasas, aminopeptidasas, esterases y quitinasas), aunque en diferentes concentraciones. Este análisis se realizó para demostrar si el uso de un inductor tiene efecto sobre la expresión de enzimas que puedan estar ligadas a la virulencia.



**Figura 14.** Galerías de reacción de las pruebas cualitativas API ZYM®. Utilizando distintos sustratos, (A) arroz, (B) salvado de trigo, (C) maíz quebrado, con distintas concentraciones de inductor (1) 0%, (2) 5%, (3) 10%, (4) 15%.

La Tabla 4 muestra los resultados de las pruebas cualitativas API ZYM® para cada uno de los tratamientos (sustrato/inductor). Se observa que para dichas pruebas el efecto del inductor no afecta la presencia o ausencia de las enzimas producidas por *B. bassiana*.

**Tabla 4.** Pruebas cualitativas API® ZYM. Donde “+” representa a reacción positiva y “-” reacción negativa (columnas sombreadas de importancia en la virulencia)

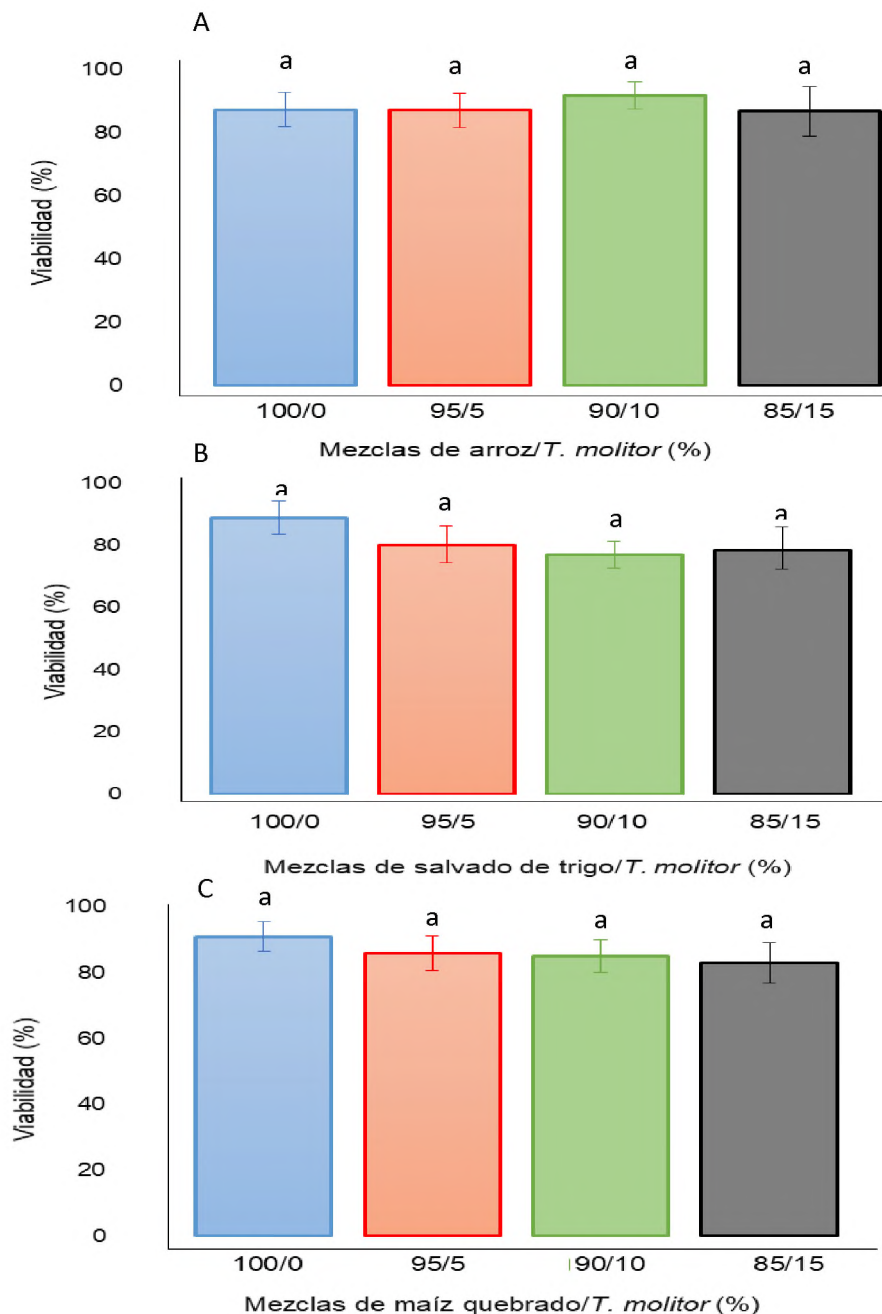
Sustrato/concentración de inductor (%)	Fosfatasa alcalina	Esterasas	Esterasas lipasa	Lipasa	Leucina arilamidasa	Valina arilamidasa	Cistina arilamidasa	Tripsina	α- quimotripsina	Fosfatasa acida	Nitro-AS-BI-fosfohidrolasa (Fosfoamidasa)	α-Galactosidas	β-Galactosidas	β-Glucuronidas	α-Glucosidasa	β-Glucosidasa	Glucosaminidasa	α-Mannosidasa	α-Fucosidasa
Arroz-0	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Arroz-5	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Arroz-10	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Arroz-15	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Salvado de trigo-0	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Salvado de trigo-5	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Salvado de trigo-10	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Salvado de trigo-15	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
Maíz quebrado-0	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Maíz quebrado-5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Maíz quebrado-10	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Maíz quebrado-15	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+

## 8.5 Viabilidad

La Figura 15A muestra la viabilidad (%) de *B. bassiana* en fermentación sólida, con mezclas de arroz/inductor (%). Se observó el valor más elevado con la mezcla 90/10 ( $91.84 \pm 4.29$ ), en contraste el menor valor ( $86.9 \pm 7.08$ ) se obtuvo con la mezcla 85/15.

Los resultados para la viabilidad (%) empleando mezclas de salvado de trigo/inductor (%) como sustrato (Figura 15B), mostraron una menor viabilidad global en contraste con los otros sustratos (Figura 15A y 15B 31). La mayor viabilidad para este tratamiento ( $88.96 \pm 5.43$ ) se obtuvo con la mezcla 100/0 y la menor ( $77.06 \pm 4.40$ ) con la mezcla 90/10, cabe resaltar que los valores obtenidos fueron similares a los reportados por Montesinos-Matías (2008) con valores entre 68 y 82% para conidios producidos en medio sólido utilizando agar maltosa sabouraud con 3% de avena y 0.05% de EL.

En la Figura 15C se muestra la viabilidad (%) alcanzada para los conidios de *Beauveria bassiana* producidos en mezclas de maíz quebrado/inductor (%), la mayor viabilidad se obtuvo con la mezcla 100/0 ( $91.84 \pm 4.46$ ), para el resto de las mezclas (95/5, 90/10, 85/15 respectivamente) se observó prácticamente el mismo valor ( $86.09 \pm 5.291$ ,  $85.02 \pm 5.0$ ,  $83.06 \pm 6.01$ ).



**Figura 15.** Viabilidad de conidios producidos en fermentación sólida utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor. 100/0 (□), 95/5 (□), 90/10 (□), 85/15 (□)

La mayor viabilidad (%) se obtuvo con mezclas de arroz/inductor 90/10 ( $91.84 \pm 4.29$ ), seguida por la obtenida con maíz quebrado/inductor 100/0 ( $90.95 \pm 4.46$ ), siendo la menor la obtenida con las mezclas de salvado de trigo/inductor 90/10 ( $77.06 \pm 4.40$ ). En contraste, Montesinos-Matías (2008) reportó valores de entre 68 y 82 para los conidios provenientes de cultivos sólido, utilizando Agar Maltosa Sabouraud al 2%

con 3% de avena y 0.5% de extracto de levadura, a las 20 h de incubación; mientras que Núñez-Gaona (2009) obtuvo una viabilidad del 87% en cultivos con SDA al 4% (p/v) más extracto de levadura 0.5 g/L y desoxicolato de sodio 1 g/L en un tiempo de cultivo de 10 días.

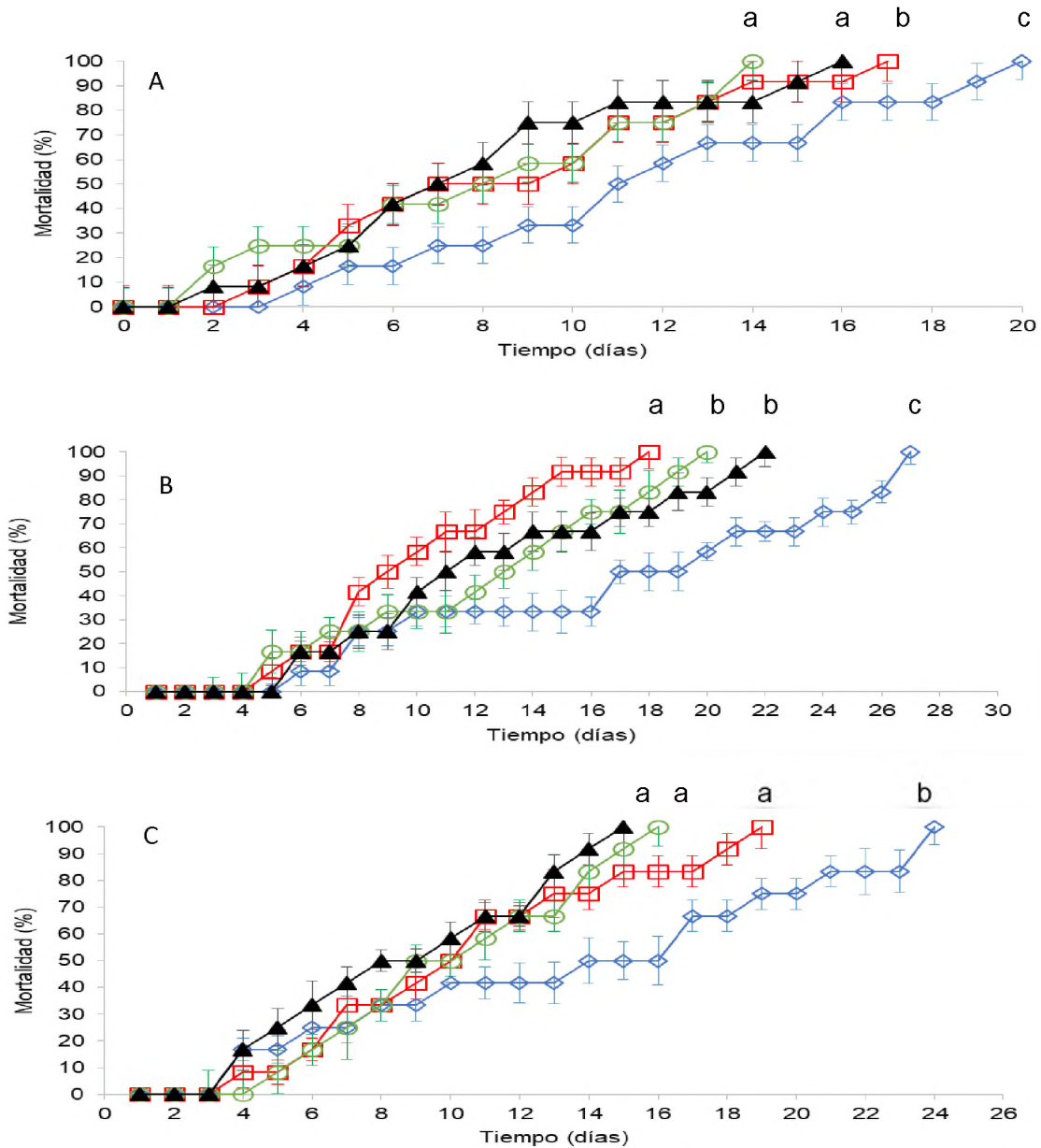
Los resultados obtenidos sugieren que los conidios de *Beauveria bassiana* producidos por fermentación sólida a distintos porcentajes de las mezclas sustrato/inductor, alcanzaron una viabilidad adecuada para la producción masiva además de que se obtuvieron viabilidades similares en cada uno de los tratamientos.

## 8.6 Bioensayos

La Figura 16A muestra el comportamiento de la mortalidad (%) en función del tiempo para los conidios obtenidos con arroz adicionado con inductor. La mortalidad se favoreció debido a que la velocidad de muerte fue mayor para las mezclas de arroz/*T. molitor* sin importar la concentración de éste. El 100 % de mortalidad se alcanzó con las esporas obtenidas con todos los tratamientos, existiendo diferencias sólo en el tiempo en el cual ocurrió esto, para las mezclas 90/10 sucedió a los 14 días, seguidas de las mezclas de 85/15 con 16 días, para las mezclas de 95/5 el tiempo fue de 17 días, finalmente, para las mezclas 100/0 este valor se obtuvo hasta los 20 días.

En la Figura 16B se muestran el comportamiento de la mortalidad (%) en función del tiempo para los conidios producidos con mezclas de salvado de trigo/*T. molitor*, nuevamente se apreció el efecto positivo en la velocidad de muerte para las mezclas con inductor, dicho efecto se hizo presente a partir del séptimo día para las mezclas 95/5, hasta el décimo día para las mezclas con concentración de 85/15 y a partir del día 12 para las de 90/10. También se observó en las mezclas 100/0, periodos de tiempo donde la mortalidad se mantuvo sin modificación. El 100 % de mortalidad se alcanzó para todos los tratamientos, a los días 18, 20, 22 y 28 para las mezclas 95/5, 90/10, 85/15 y 100/0 respectivamente.

Para el comportamiento de la mortalidad de conidios obtenidos en mezclas de maíz quebrado/inductor se observó (Figura 16C) nuevamente un mayor porcentaje de mortalidad para los tratamientos con inductor, así mismo se apreciaron intervalos de mortalidad constante para el tratamiento 100/0. El mayor porcentaje de mortalidad se alcanzó en los días 15, 16, 19, 25, para los tratamientos 85/15, 90/10, 95/5 y 100/0 respectivamente.



El estudio del efecto del uso de inductores sobre la virulencia de hongos entomopatógenos es limitado y poco usual, puesto que la mayoría de estudios de este tipo se enfocan en la producción de enzimas asociadas al mecanismo de infección. Montesinos-Matías (2008) determinó el porcentaje de mortalidad de distintas cepas de *B. bassiana*, en medio de cultivo Agar Maltosa Sabouraud (AMS) al 2% con avena (3%) enriquecido con EL (0.05 %), obteniendo que para la cepa 885.2 (misma que se empleó en este trabajo), el porcentaje de mortalidad fue de 97 al día 15, en contraste con la mezcla de 90/10 (arroz/inductor) la cual alcanzó el 100 % de mortalidad al día 14. En este trabajo se observó la interacción que existe entre el tipo de sustrato (arroz, salvado de trigo y maíz quebrado) con el % de mortalidad, es importante señalar que la mortalidad es un parámetro determinante en el uso de controladores biológicos en la agricultura.

Utilizando arroz como sustrato, se observaron tres grupos que difieren significativamente entre ellos, el primero compuesto por los tratamientos 85/15 y 90/10, el segundo 95/5 y el tercero por 100/0.

Así mismo con el uso de salvado de trigo como sustrato, se observaron tres grupos que difieren significativamente entre ellos, el primero compuesto por el tratamiento 95/5 el segundo por los 90/10 y 85/15 y el tercero por el 100/0.

En los bioensayos realizados con maíz quebrado como sustrato, se observaron dos grupos que difieren significativamente entre ellos, el primero compuesto por los tratamientos 85/15, 95/5 y, 90/10 y el segundo por el de 100/0.

Se realizó el análisis comparativo de medias con la prueba de Tukey con un nivel de significancia,  $\alpha$  de 0.05 para determinar la interacción sustrato-inductor (Anexo 12.2.2), estableciendo que, hay diferencias significativas entre los sustratos maíz quebrado, arroz (grupo A) y salvado de trigo (grupo B), así como en dos grupos conformados por las mezclas 95/5, 90/10, y 85/15 (grupo A) y la 100/0 (grupo B) en los tratamientos.

### 8.6.1 Tiempo letal 50% (TL50)

En la Tabla 5 se observa el cálculo del tiempo letal 50 utilizando dos metodologías (regresión lineal y análisis PROBIT), se observó que el menor tiempo letal obtenido con la regresión lineal ( $7.71 \pm 1.78d$ ) perteneció a la mezcla arroz/inductor 85/15, siendo este el mejor tiempo global para esta metodología, contrastando con lo reportado por Fuentes (1995) quien obtuvo un TL<sub>50</sub> menor para la cepa 447 de *B. bassiana* (3.32 d), esta diferencia puede atribuirse a dos razones; la primera fue que este autor empleo una concentración mayor de inóculo ( $1 \times 10^9$  conidios/mL) para los sus bioensayos, en contraste con la empleada en este trabajo ( $1 \times 10^8$  conidios/mL), la segunda fue que la cepa de este trabajo (Bb 885.2) proviene de una serie de mutaciones aleatorias que, conforme transcurre el tiempo y múltiples resiembras se afecta su virulencia.

Los valores de tiempo letal 50 calculados por el método de análisis PROBIT arrojaron el menor valor para todo el trabajo ( $6.43 \pm 1.51d$ ) perteneciente a la mezcla maíz quebrado/inductor 85/15, en contraste con lo reportado por Ayala-Campaña (2006) quien obtuvo un valor de tiempo letal medio de 4.66 d con una cepa de *B. bassiana*. De igual manera esto puede atribuirse a las razones expuestas anteriormente.

**Tabla 5.** Tiempo Letal 50 de *Beauveria bassiana*. Estimado con dos metodologías independientes. Letras iguales no hay diferencias significativas

Sustrato	Mezcla sustrato/inductor (%)	Regresión lineal	PROBIT
		TL <sub>50</sub> (días)	TL <sub>50</sub> (días)
Arroz	100/0	11.24±2.34 <sup>b</sup>	15.21±3.18 <sup>b</sup>
	95/5	8.36±1.14 <sup>a</sup>	7.59±1.74 <sup>a</sup>
	90/10	7.75±1.69 <sup>a</sup>	9.66±2.03 <sup>b</sup>
	85/15	7.71±1.78 <sup>a</sup>	9.96±2.33 <sup>b</sup>
Salvado de trigo	100/0	17.23±2.62 <sup>b</sup>	15.21±3.30 <sup>b</sup>
	95/5	9.84±2.04 <sup>b</sup>	7.59±2.14 <sup>b</sup>
	90/10	12.13±3.47 <sup>b</sup>	9.66±1.48 <sup>b</sup>
	85/15	12.38±2.87 <sup>b</sup>	9.96±1.26 <sup>b</sup>
Maíz quebrado	100/0	13.54±3.03 <sup>b</sup>	9.78±1.17 <sup>b</sup>
	95/5	10.29±2.01 <sup>a</sup>	8.20±1.61 <sup>a</sup>
	90/10	9.80±1.98 <sup>a</sup>	7.51±2.04 <sup>a</sup>
	85/15	8.61±1.37 <sup>a</sup>	6.43±1.51 <sup>a</sup>

El nivel del inductor fue un factor importante sobre la virulencia de la cepa utilizada en este trabajo, así mismo, se observó que con metodologías de infección similares y la misma cepa (Montesinos-Matías, 2008; Núñez-Gaona, 2009) el tiempo letal medio presentó variaciones de 5.91 a 16.9 d respectivamente, atribuyéndose a la diferencia entre los sustratos empleados.

## 9 CONCLUSIONES

El empleo de *Tenebrio molitor* como inductor en mezclas con salvado de trigo y maíz quebrado presento un efecto significativo en la producción de conidios de *B. bassiana*, sin embargo, los mayores títulos se obtuvieron con las mezclas sin inductor (100/0 %).

Durante la fermentación sólida el mayor crecimiento se determinó al quinto día del proceso para todos los tratamientos evaluados.

La producción de endoquitinasas se favoreció por el uso del inductor en mezclas 90/10 y 85/15 % independientemente del sustrato. El uso de salvado de trigo como sustrato alcanzó los mayores títulos de producción de estas enzimas, con la excepción de la mezcla maíz quebrado/inductor (90/10 %) alcanzando  $169.2 \pm 14.01$  mU/mL.

El uso de *T. molitor* como inductor favoreció la producción de exoquitinasas exclusivamente para las mezclas de 95/5 % (sustrato/inductor), independientemente del sustrato al séptimo día en contraste cuando se incrementó la concentración del insecto en las mezclas, la actividad de estas enzimas disminuyó lo que se atribuyó a una inhibición a nivel de sustrato.

La actividad proteolítica de *B. bassiana* no se vio afectada por el uso de *Tenebrio molitor* como inductor para las mezclas de arroz y maíz quebrado, sin embargo, con la mezcla de salvado de trigo/*T. molitor* (85/15 %) se observó una disminución para esta actividad enzimática. Las mejores mezclas para la producción de enzimas proteolíticas fueron con concentraciones de inductor de 5 y 10% para cualquiera de los sustratos utilizados.

Las pruebas API ZYM<sup>®</sup> mostraron que en las mezclas (sustrato/inductor), no existía diferencia entre la presencia o ausencia de las enzimas producidas por *B. bassiana*,

sin embargo, de manera cuantitativa si hay efecto en el nivel producción de las mismas esto debido a la adición del inductor.

Los bioensayos mostraron que el uso de *Tenebrio molitor* como inductor tuvo un efecto positivo sobre la virulencia (porcentaje de mortalidad y tiempo letal medio), así mismo se mostró que el salvado de trigo no es un sustrato adecuado para la producción de conidios virulentos de *B. bassiana*.

El tiempo letal medio, un parámetro de virulencia de importancia en el control biológico obtenido por análisis PROBIT, mostró que las mezclas maíz quebrado/inductor (90/10 y 85/15 %) son los mejores tratamientos para la obtención de conidios virulentos de *B. bassiana*.

# 10 CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

## 10.1 Contribuciones

- Este trabajo contribuyó a incrementar el conocimiento sobre el efecto del uso de *T. molitor* como inductor en la producción de conidios infectivos de *B. bassiana* por fermentación bifásica, junto con el efecto de emplear distintos sustratos.
- También, permitió establecer parámetros importantes como la humedad, tiempo de fermentación y concentración de inductor, lo cual será relevante en futuros trabajos que pretendan la producción de conidios de *B. bassiana*, con la finalidad de desarrollar y aplicar formulados biológicos para el control de plagas en la región.

## 10.2 Perspectivas

- Realizar estudios con distintos residuos agroindustriales como sustrato con la finalidad de reducir costos de producción.
- Debido a que el uso de *T. molitor* como inductor favorece la producción de enzimas hidrolíticas involucradas en el mecanismo de infección, este resulta de interés para continuar con su empleo tanto en fermentaciones líquidas y/o sólidas.
- Estudiar la correlación entre la producción enzimática del hongo *B. bassiana* con su virulencia y patogenicidad.

## 11 REFERENCIAS

Abrams J. C., 1990. Biological Control Agents in Integrated Pest Management: Are They Regulated. A Research Guide, Pace Environmental Law. Review. 8:89-114

Aguirre N. Villamizar R. L. Espinel C. C. Cortes P. 2009. Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomurea rileyi* (Hyphomycetes). Revista Colombiana de Entomología. 35 (2): 133-144

Ahmed, N., tetlow, I.J., Nawaz, S., Laval, A., Mubin, M., Rehman, M.S.N., Butt, A., Lightfoot, D.A., Maekawa, M. 2015. Effect of high temperature on grain filling period, yield, amylose content and activity of starch biosynthesis enzymes in endospermo f basmati rice. Journal of the Science of Food and Agriculture. 95: 2237-2243

Ali, M. C., Maoka, T., Natsuaki, K.T. Natsuaki, T. 2010. The simultaneous differentiation of Potato virus y strains including the newly described strain PVY NTN-Nw by multiplex PCR assay. Journal of Virological Methods. 65: 15-20

Altre, J.A., Vandenerg, J.D., Cantone, F.A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to diamondback moth, *plutella xylostella*: Correlation with Spore size, germination speed, and attachment to cuticle. Journal of Invertebrate Pathology. 73: 332-338

Amundson, R., Austin, A.T., Schuur, E.A.G., Yoo, K., Matzek, V., Kendall, C., Uebersax A., Brenner, D., Baisden, W.T. 2003. Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. Global Biogeochemical Cycles. 17:1031-1036

Aponte, G., Carmona, I. 2000. Producción de conidiosporas de *Beauveria bassiana* como base para el desarrollo de un Bioinsecticida. Tesis de Licenciatura. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. 54 p.

Arakane Y, Muthukrishnan S. 2009. Insect chitinase and chitinase-like proteins. Cellular and Molecular Life Sciences. 7(2): 201-216.

Arnáiz, C.; Isac, L.; Lebrato, J. 2000. Determinación de biomasa en procesos biológicos. Grupo de tratamiento de aguas residuales. Tecnología del Agua. 205 45-52.

Arzumanov, T., Jenkins, N., Roussos, S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum*. *Process Biochemistry*. 40: 1027-1042.

Ayala-Campaña O. 2006. Determinación de agresividad de hongos entomopatógenos para *Macroductylus sp* (Catzó del Maíz) chillanes-bolivar. Tesis de licenciatura. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 136 p.

Ballesteros-Torres J.M., 2013. Factores nutricionales que afectan la actividad insecticida de *Beauveria bassiana* (BALSAMO) *Vuillemin* contra *Periplaneta americana* L. y la respuesta inmune del insecto. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. 127 p.

Barranco-Florido, J.E. Alatorre.Rosas, R., Gutierrez.Rojas, M., Viniegra-Gonzales, G., Saucedo-Castañeda, G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 910-915.

Bidochka, M. J. y Khachatourians, G. G. 1988. N-acetyl-D-glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54(11): 2699-2704.

Bidochka, M.J., Khachatourians, G. (1990). Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal on Invertebrate Pathology*. 56: 362-370.

Bueno A. de F., Batistela M. J., Bueno C. O. de F., França-Neto J. B., Nishikawa M. A. N., Filho A. L., 2011. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. *Crop Protection*. 30: 937-945.

Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. (Eds.). 2001. *Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential*. Centre for Agriculture and Biosciences International

Campos-Takaki, G.M., Amorim, R.V.S., Ledingham, W.M., Fukushima, K. 2005. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. 32: 19-23.

Carruthers, I.R. Hural K. 1990. Fungi as natural occurring entomopathogens. *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases*. 115-138

Charnley, A.K., St. Leger, R.J. 1991. The role of cuticle-degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. *The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. 33: 267-286.

Cisneros F.H., 2010. Control de plagas agrícolas. Fascículo 13. Lima, Peru. 35 p.

Cruz, M.C.B., Da Silva Varea, G. 2014. Production of lipase by *Beauveria bassiana* on broth supplemented with oily residue. *Biochemistry and Biotechnology Reports*. 3(2): 9-15

Cruz-Martinez, K., Suttle, K. B., Brodie, E.L., Power, M.E., Andersen, G.L. Banfield, J.F. 2007. Despite strong seasonal responses, soil microbial consortia are more resilient to long-term changes in rainfall than overlying grassland. *The Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology journal*. 3: 738-744.

Desgranges, C., Vergoignan, C., Lereec, A., Riba, G., Durand, A., 1993. Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of european corn borer. *Biotechnology. Advances*. 11: 577–587

Dhar, S., Daniel. W.L., Giljohann, D.A., Mirkin, C.A. and Lippard, S.J. 2009. Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) warheads. *Journal of the American Chemical Society*. 131(41): 14652-14653

Dhawan, M. y Joshi, N. 2017. Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage Caterpillar *Pieris Brassicae*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48: 522-529.

Dias B. A, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. (2008) Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 301-306.

Díaz-Gamez G.M., 2014. Uso de la larva de *Tenebrio molitor* como aditivo proteico en la alimentación de codornices. Tesis de licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 98 p.

Domenech, F., Leon, M., Rodriguez-Leon, J.A., Rodriguez, D.E., Alfonso, A., Sanchez, D., 1998. Obtaining a medium for spore production of *Metarhizium anisopliae* in solid state fermentation. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar. 32 (1): 15–22

Donatti AC, Furlaneto-Maia L, Fungaro M.H.P, Furlaneto MC. 2008. Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. Current Microbiology. 56: 256-263.

Dumanchin, R., Michon, M., Farcy, J., Boudinet, G., Rocca-Serra, J. 1972. Extension on TEA CO2 laser capabilities. Journal of quantum electronics. 8: 163-165.

El.Sayed. M.A., El-Shanshoury, A.R., El-Sabbang, S.M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *streptomyces spp.* Plant and Soil. 149: 185-195.

Erler, F., Ates, A. O. 2015. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae) as biological control agents against the june beetle. Journal of Insect Science. 15:44

Fuentes G, Carballo M, 1995. Evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL, para el control de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Centro Literario de Documentación Agrícola. Turrialba, Costa Rica.

Gandarilla-Pacheco, F. L.; Galán-Wong, L. J.; Arévalo-Niño, K.; Elías-Santos M.; Quintero-Zapata, I. 2013. Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. hypocreales: *cordycipitaceae*) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. Agrociencia. 47: 255-266.

García-Gómez, M. J. Huerta-Ochoa, S. Loera-Corral, O. Prado-Barragán, L. A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chemistry. 112: 604-608

García, M. A., Cappello, S., Leshner, J. M., Molina, R. F. 2008. Hongos entomopatógenos como alternativa en el control biológico. Revista de Divulgación. Division Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tabasco. 15(27): 1-10

Gaxiola Castro, L.A., 2014. Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para control del gusano del fruto *Heliothis*

*virescens* (Fabricius 1771) en el cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* (Mill) en Guasave, Sinaloa. Tesis de maestría. Recursos naturales y medio ambiente. Instituto Politécnico Nacional. 117 p.

Gerber G. H. 1975. Reproductive behavior and physiology of *Tenebrio molitor* (Coleóptera: Tenebrionidae). The Canadian Entomologist. 107: 551-559.

Havukkala I, Mitamuta C, Hara S, Hirayae K, Nishizawa Y, Hibi T. 1993 Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. Journal of Invertebrate Pathology. 61: 97-102.

Hegedus, D. D., Khachatourians, G. G. 1996. Identification and differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* using polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. Journal of Invertebrate Pathology. 67: 289-299.

Hegedus, D., Khachatourians, G.G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. Biotechnology Advances. 13: 455-490.

Hegedus, D.D., Bidochka, M.J., Miranpuri, G.S. Khachatourians, G.G. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology. 36: 785-789.

Hernandez A.A., 2016. Evaluación de los hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) para el control de hormigas cortadoras de hojas (*Atta* spp) en eucalipto; Santa Lucía Cotzumalguapa, Escuintla. Universidad Rafael Landívar. Facultad de ciencias ambientales y agrícolas.

Jakymec M. 2001. Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia. Maracaibo, Venezuela. 11: 53-59

Jaronski, S.T., Jackson, M.A., 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. 2: 255–284

Jenkinsa, B. M., Baxterb, L.L, Miles, Jr.c. T. R. Miles, T.R. 1998. Combustion properties of biomass. Fuel processing Technology. 54: 17-46.

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, Oaxaca, México. 119 p.

Kim JS, Roh JY, Choi JY, Wang Y, Shim H J, Je YH. 2010. Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. Fungal Biology. 114: 120-128.

Krishna, C. 2005. Solid-State Fermentation Systems-An Overview. Critical Reviews in Biotechnology. 25: 1-30

Loera, O. 2005. Mejoramiento de aislados de *Beauveria bassiana*. Simposium en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Mérida, Yucatán.

Lomer C. J, Bateman R. P, Johnson D. L, Lagewald T. M. 2001. Biological Control of locusts and grasshoppers. Annual Review of Entomology. 46: 667-702.

Machado A, Monteiro A, Belasco A, Espagnoli M. Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 45: 1157-1163

Matsumoto, Y., Ramírez-Coutiño, L., Rocha-Pino, Z. Viniegra, G., Shirai, K. Marín Cervantes, M.C., 2007. Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. Process Biochemistry. 43: 24-32.

Mata-Villegas. T, 2008. Evaluación de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada CIBA-IPN. Tlaxcala, México.

Méndez, A.; del Pozo, E.; García, I.; González, A. 2010. Evaluación de sustratos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Revista Protección Vegetal. 25: 108-112

Miner, B. G., Sultan, S. E., Morhan, S. G., Padilla, D. K. 2005. Ecological consequences of phenotypic plasticity. Trends in Ecology and Evolution. 20: 658-692.

Mondal S., Baksi S., Koris A., Vatai G., 2016. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Natural Science and Engineering*. 18: 85-99

Montesinos, R. 2008. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Estado de México, México. 109 p.

Montesinos, R. 2008. Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la infectividad en cepas de *Beauveria bassiana* resistentes a 2-desoxi-D-glucosa. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Estado de México, México. 121 p.

Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*.

Moraes, V.A., Costa, J. (2003). Stable expression of recombinant  $\alpha$  3/4 fucosyltransferase III in *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells. *Journal of Biotechnology*. 6: 69-75.

Muñoz, R. Daugulis, A.J., Quijano-Govante, G. Hernandez, M. 2004. Recent advances in two-phase partitioning bioreactors for the treatment of volatile organic compounds. *Biotechnology Advances*. 30: 1017-1720.

Nicholls C. I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Ed. Universidad de Antioquia.

Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R. Loera O. 2006. Efecto del nivel de inóculo sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, México.

Núñez-Gaona O. 2009. Efecto de la actividad de agua y la modificación de la atmósfera gaseosa sobre la producción y calidad de conidios de *Beauveria bassiana*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. 119 p.

Ondráčková E., 2016. The use of Entomopathogenic fungi in biological control of pests. *Acta Fytotechnica and Zootechnica*. 18: 102-105.

Ortiz-Urquiza, A., Vergara-Ortiz, A., Santiago-Alvarez, C., Quesada-Moraga, E., 2010. Insecticidal and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae*

culture sobrenadant protein extracto on the Mediterranean fly. Journal of Applied Entomology. 134: 581-591

Ortiz-Urquiza, L., Riveiro-Miranda, C., Santiago-Álvarez, E., Quesada-Moraga. 2010. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology. 105: 270-278.

Qazi SS, Khachatourians GG. 2007 Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. Journal of Invertebrate Pathology. 95: 48-59.

Quijano-Govantes, G., Ramírez-Coutiño, L., Paniagua, N., Larralde-Corona, C. P., Shirai, K. 2004. Evaluation of pH of culture on the chitinolytic and proteolytic activities of *Verticillium fungicola* using shrimp waste silage. Advances in Chitin Science. 7: 222-225.

Robledo M., Alatorre-Rosas R., Viniegra-González G y Loera O. 2005. Effects of improved *Beauveria bassiana* strains toward *Sphenarium purpuracens* (Orthoptera: *acrididae*). International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto. México.

Rodríguez M.S., Gerding M. y France A., 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de polilla del tomate *Tuta Absoluta Meyrick* (Lepydóptera *Gelechiidae*). Agricultura Técnica (Chile). 66(2): 151-158.

Rodríguez-del-Bosque, L. A. y H. C. Arredondo-Bernal. 2007 Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.

Rodríguez-Gómez D., 2009. Caracterización fisiológica de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Y su mutante resistente a 2-desoxiglucosa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de Salud, México, D.F. 134 p.

Rojas-Gutiérrez, René Leopoldo; Loza-Murguía, Manuel; Vino-Nina, Lourdes; Serrano-Canaviri, Teófilo. 2017. Capacidad biocontroladora de *Beauveria brongniartii* (Sacc.) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) en el control de pulgones *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: *Aphididae*). Journal of the Selva Andina Research Society. 8: 48-68.

Safavi, A. A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Rasoilian, G.R., Bandani, A.R., Butt, T.M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus

*Beauveria bassiana*. Federation of European Microbiological Societies microbiology letters. 270: 116-123.

Samsinakova, A. and Leopold, J. 1971. Quantitative estimation of chitinase and several other enzymes in the fungus *Beauveria bassiana*. Journal on Invertebrate Pathology. 18: 34-42.

Sánchez T.C.I. y Burgos Y. V., 2014. Determinación de antocianinas y valor nutricional de *Tenebrio molitor* alimentados con dietas enriquecidas con maíz morado (*Zea mays L.*). Unidad Politécnica Selesiana. Sede Quito. Ingeniería en biotecnología de los recursos naturales

Santamaria, S. 1998. Laboulbeniales, II. Acompsomyces-Ilyomyces. Flora Mycologica Ibérica.

Schoen J, Modha A, Maslow K, Novak M, Blackburn BJ. (1996). A NMR study of parasitized *Tenebrio molitor* and *Hymenolepis diminuta* cysticercoids. International Journal of Parasitology. 26(7): 713-22.

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

St. leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J., Roberts, D. W. 1993. Protein synthesis in *Metarhizium anisopliae* growing on host cuticle. Mycological Research. 99: 1034-1040.

Steinhaus, E. A. 1963. Insect pathology, introduction. In E. A. Steinhaus (ed.), Insect pathology, an advanced treatise. Academic Press, New York. 143-159

Talaei-hassanloui, R. and Kharazi-pakdel, A. 2006. Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. Journal of Invertebrate Pathology. 94: 102-107.

Tronsmo, A., y Harman, G. E. 1993. Detection and Quantification of N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, Chitobiosidase, and Endochitinase in Solutions and on Gels. Analytical Biochemistry. 208(1):74-79.

Urbaneja, G., y Sandoval, L. 1997. Hidrólisis ácida. Revista de la Facultad de Agronomía. (La Universidad del Zulia). 14: 265-275

Varéa-Pereira G, Tiemi- Ito E, Tomoe Miyagui D, Pimenta Pinotti<sup>1</sup> MH, Janeiro Neves PMO. 2007. Production of extracellular protease by a brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 50(2): 217-223

Vici A.C., da Cruz A.F., Facchini F.D.A., de Carvalho C.C., Pereira M.G., Fonseca-Maldonado R., Ward R.J., Pessela B.C., Fernandez-Lorente G., Torres F.A.G., Jorge J.A., Polizelli M.L.T.M., 2015. *Beauveria bassiana* lipase A expressed in *Komagataella (Pichia) pastoris* with potential for biodiesel catalysis. Frontiers in Microbiology. 6: 1083.

Villalba M., P. L.; Grillo Ravelo, H.; Cupull S., R. 2009. Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. Centro Agrícola. 36: 25-32

Wang, C. Liang, P., Huang, X., Fan, M.Z., Cao, X.X. 2007. Composition and distribution of internal resistance in three types of microbial fuel cells. Applied Microbiology and Biotechnology. 77: 551-588

Whipps J. M y Lumsden R. D. 2001. Commercial Use of Fungi as Plant as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan. 8: 9-22.

Wong, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and Development of a new selection marker for fungal transformation. Tesis de Doctorado. Universidad de Ruperto-Carola de Heidelberg. Alemania. 138 p.

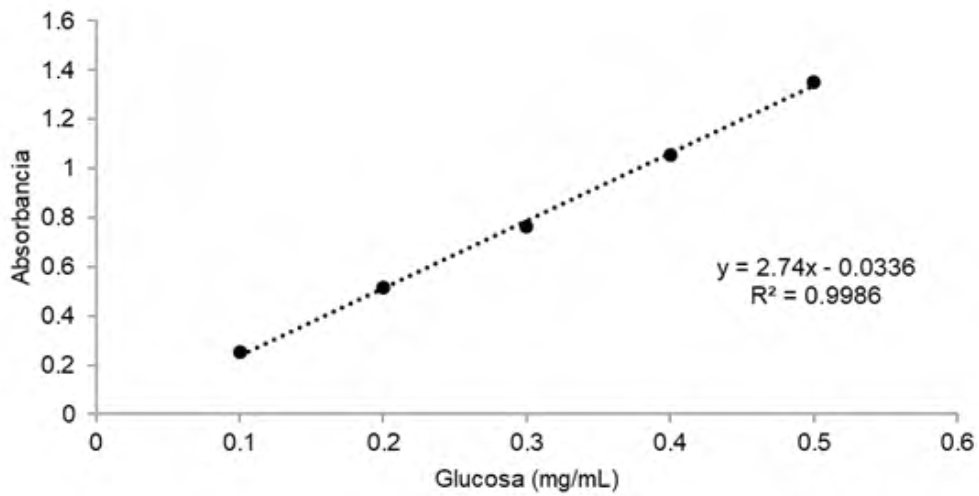
Zavaleta-Mejía, E. 2014. Management Alternatives for Plant Diseases. Terra. 17(3): 201-207

Zimmermann, F. and Breitenmoser, U. 2007. Potential distribution and population size of the Eurasian lynx *Lynx lynx* in the Jura Mountains and possible corridors to adjacent ranges. Wildlife Biology. 13: 406-416.

## 12 ANEXOS

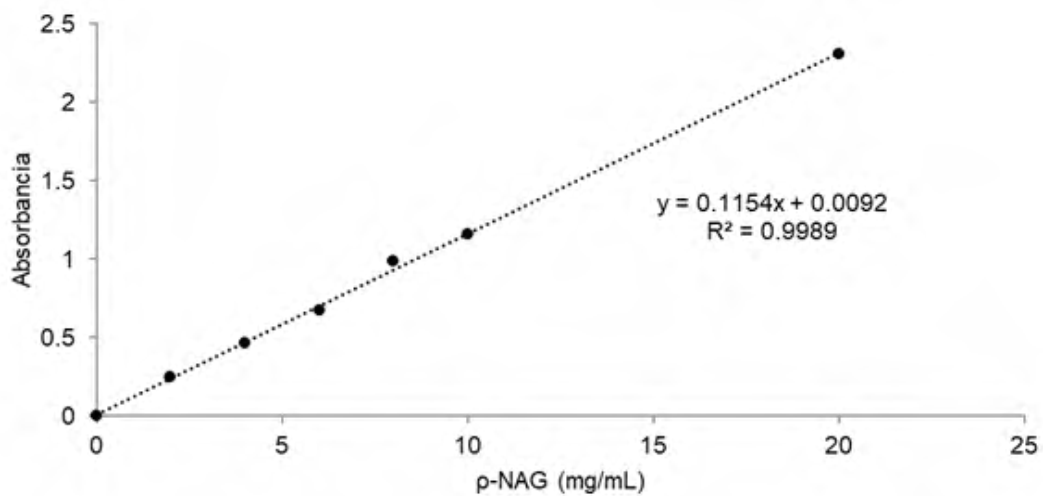
### 12.1 Curvas estándar

#### 12.1.1 Curva estándar de azúcares totales



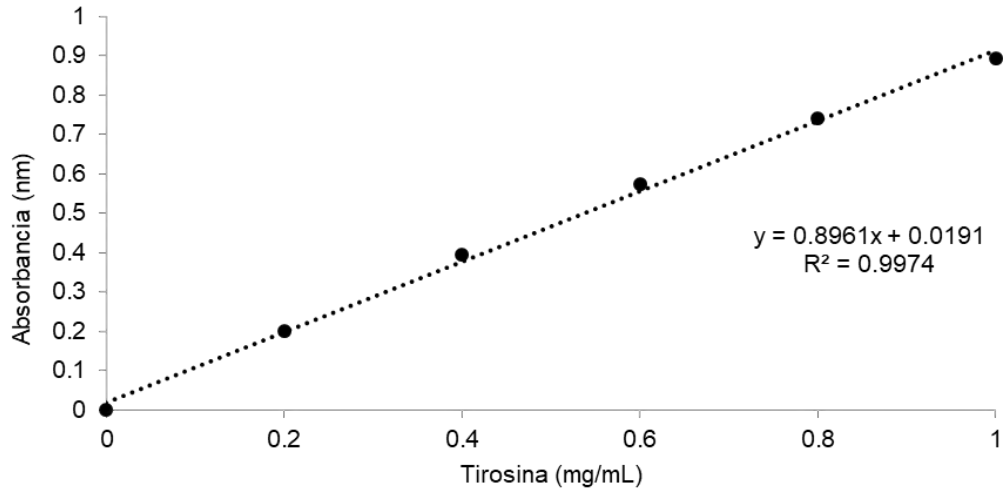
**Figura 17.** Curva estándar de azúcares empleando glucosa como sustrato por el método del fenol sulfúrico (Urbaneja et al., 1997)

#### 12.1.2 Curva estándar de p-nitrofenol



**Figura 18.** Curva estándar de actividad exoquitinasa utilizando p-NAG como sustrato por el método de Tronsmo y Harman (1993)

### 12.1.3 Curva estándar de actividad proteolítica



**Figura 19.** Curva estándar de actividad proteolítica utilizando tirosina como sustrato por el método García-Gómez (2009)

## 12.2 Análisis de varianza

### 12.2.1 Familias de significancia de las actividades enzimáticas

**Tabla 6.** Análisis de varianza para las actividades enzimáticas empleando arroz como sustrato. Letras iguales no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ )

Concentración del inductor (%)	Actividad enzimática	Grupo
0	Endoquitinasas	A
5	Endoquitinasas	B
10	Endoquitinasas	B
15	Endoquitinasas	B
0	Exoquitinasas	A
5	Exoquitinasas	B
10	Exoquitinasas	C
15	Exoquitinasas	C

0	Proteolítica	A
5	Proteolítica	A
10	Proteolítica	B
15	Proteolítica	B

**Tabla 7.** Análisis de varianza para las actividades enzimáticas empleando salvado de trigo como sustrato. Letras iguales no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ )

Concentración del inductor (%)	Actividad enzimática	Grupo
0	Endoquitinasas	B
5	Endoquitinasas	A
10	Endoquitinasas	A
15	Endoquitinasas	B
0	Exoquitinasas	A
5	Exoquitinasas	B
10	Exoquitinasas	C
15	Exoquitinasas	C
0	Proteolítica	A
5	Proteolítica	A
10	Proteolítica	A
15	Proteolítica	B

**Tabla 8.** Análisis de varianza para las actividades enzimáticas empleando maíz quebrado como sustrato. Letras iguales no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ )

Concentración del inductor (%)	Actividad enzimática	Grupo
0	Endoquitinasas	B
5	Endoquitinasas	B
10	Endoquitinasas	A
15	Endoquitinasas	A

0	Exoquitinasas	B
5	Exoquitinasas	A
10	Exoquitinasas	B
15	Exoquitinasas	C
0	Proteolítica	A
5	Proteolítica	A
10	Proteolítica	A
15	Proteolítica	A

### 12.2.2 Análisis de varianza de los bioensayos

**Tabla 9.** Comparación entre sustratos y tratamientos en los bioensayos. Letras iguales no existen diferencias significativas ( $\alpha = 0.05$ )

Sustrato	Grupo	Concentración del inductor (%)
Maíz	A	5
Arroz		10
		15
Salvado	B	0

### 12.3 Trabajos presentados

López-sosa Daniel. Núñez-Gaona Oscar. Estudio del efecto del uso de texturizantes sobre la calidad de conidios de *Beauveria bassiana* obtenida por fermentación sólida. 1er foro estatal de biotecnología. Yo encuentro la ciencia. Xalapa, Veracruz, México. Marzo, (2017)

López-sosa Daniel. García-Gómez María de Jesús. Núñez-Gaona Oscar. Efecto de *tenebrio molitor* (Coleoptera: tenebrionidae) como inductor sobre la virulencia de *Beauveria bassiana* (hypocreales: clavicipitaceaea) en fermentación sólida. Lx Congreso Nacional de Control Biológico. Mérida, Yucatán, México. Noviembre, (2017)

López-Sosa D. García-Gómez M. J. Núñez-Gaona O. Análisis cualitativo de la producción de enzimas de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida utilizando un inductor. Lv Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx. Tlaxcala, Tlaxcala, México. Diciembre, (2017)

López-sosa Daniel. García-Gómez M. J. Núñez-Gaona Oscar. Determinación del tiempo letal 50 de *Beauveria bassiana* producido por fermentación sólida utilizando distintos sustratos. Yo encuentro la ciencia. Xalapa, Veracruz, México. Abril, (2018)

#### **12.4 Publicación**

López-Sosa D, García-Gómez M. J., Núñez-Gaona O. 2017. Fermentación bifásica para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* con diferentes sustratos sólidos. Coloquio de Investigación Multidisciplinaria. 5:1284:1289

López-Sosa D, García-Gómez M. J., Núñez-Gaona O. 2018. Qualitative analysis of the production of enzymes of *Beauveria bassiana* in solid fermentation using an inductor. Mexican Journal of Biotechnology. 3(3): 26-35

## Fermentación bifásica para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* con diferentes sustratos sólidos

D. López Sosa<sup>1</sup>\*, M. J. García Gómez<sup>1</sup>, \*O. Núñez Gaona<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, Oaxaca.  
Circuito Central 200, Col. Parque Industrial, Tuxtepec, Oax., México. C.P. 6830. Tel +52 287 875  
9240 ext 230.

[\\*oscarzq@hotmail.com](mailto:*oscarzq@hotmail.com)

**Área de participación:** Ingeniería Química

### Resumen

El control biológico permite disminuir el uso de compuestos químicos en los cultivos, en éste se pueden usar organismos entomopatógenos como bacterias, nematodos y hongos. Los hongos entomopatógenos por su modo de acción disminuyen la posibilidad de que el hospedero adquiera resistencia; sin embargo para su uso hay que desarrollar métodos económicos de producción que aseguren altos rendimientos y calidad. En este trabajo se utilizó la fermentación bifásica para evaluar el efecto del salvado de trigo, maíz y arroz sobre la producción y viabilidad de conidios de *Beauveria bassiana*. En cultivo líquido se produjo una alta concentración de conidios que fueron utilizados como inóculo para las fermentaciones en medio sólido con cada sustrato. El mayor rendimiento en la producción de conidios aéreos ( $7.21 \times 10^9$  conidios/g de sustrato) con mejor viabilidad (90.5 %) se obtuvo con maíz. Al ser el sustrato más económico, su uso podría reducir los costos de producción de un bioinsecticida a base de *Beauveria bassiana*.

**Palabras clave:** Maíz quebrado, *Beauveria bassiana*, fermentación bifásica, conidios aéreos

### Abstract

Biological control makes it possible to reduce the use of chemical compounds in crops; they can use entomopathogenic organisms such as bacteria, nematodes and fungi. The entomopathogenic fungi by their mode of action reduce the possibility that the host acquires resistance; however for their use it is necessary to develop economic methods of production that assure high yields and quality. In this work, biphasic fermentation was used to evaluate the effect of wheat, maize and rice on the production and viability of *Beauveria bassiana* conidia. In liquid culture was used to produce a high concentration of conidia, and then they were used as inoculum for solid fermentations with each substrate. The highest yield of aerial conidia with better viability (90.5%) was obtained with maize. It is the most economical substrate; therefore its use could reduce the production costs of a bio-insecticide based on *Beauveria bassiana*.

**Key words:** Corn broken, *Beauveria bassiana*, biphasic fermentation, aerial conidia.

## Introducción

La agricultura, desde su inicio en la época de las cavernas, se encuentra en constante cambio; en el siglo XX se convirtió en una de las actividades primarias con mayor importancia para la humanidad, encargada del abasto de alimentos. Con la revolución verde se comenzaron a desarrollar y usar nuevos métodos para aumentar los rendimientos de producción a través de la prevención y cuidado de los cultivos; debido a esto se incrementó el uso de agentes químicos; fertilizantes, herbicidas, plaguicidas, fungicidas entre otros, a su vez se comenzaron a utilizar grandes extensiones de tierra para el monocultivo [Brechtel, 2004]. Pero el uso excesivo de compuestos químicos ha ocasionado contaminación de la tierra y los mantos freáticos provocando daños colaterales a organismos no blanco [FAO, 2013] incluyendo a los humanos.

Debido a esta problemática se han establecido programas para el manejo integrado de plagas (MIP) que son métodos aceptados de manera económica, ecológica y toxicológica [Zavaleta-Mejía, 1999], con lo que se busca disminuir el uso de compuestos de origen químico en el cuidado de los cultivos. El control biológico es un método esencial en el MIP que permite disminuir el uso de compuestos químicos utilizados tradicionalmente para suprimirlas [Whipps y Lumsden, 2001] En este método, se pueden usar organismos entomopatógenos como bacterias, nemátodos y hongos [Padilla y col., 2005]; estos últimos tienen ventajas con respecto a otros organismos que afectan a los insectos, porque invaden al huésped por contacto [Ortiz-Meza y col., 2005] y esta capacidad reduce la posibilidad de que los organismos huésped adquieran resistencia [Matías-Montesinos 2008]. Los hongos entomopatógenos son un grupo con potencial para el MIP, entre los más destacados está *Beauveria bassiana* por su capacidad de infectar a más de 200 especies de insectos en nueve órdenes, además de ser la especie fúngica más ampliamente distribuida en la naturaleza [Zimmermann, 2007]. Para que los agricultores puedan obtener bioinsecticidas a base de estos microorganismos, estos deben producirse en cantidades suficientes, es decir, que se necesita implementar métodos de producción económicos, para la reproducción masiva de sus estructuras reproductivas en sustratos de bajo costo, que aseguren rendimientos elevados y alta calidad.

La fermentación bifásica se realiza secuencialmente en dos fases; líquida y sólida. En la fase líquida se establece el medio de cultivo adecuado para desarrollar la mayor cantidad de biomasa, estos medios generalmente tienen altos contenidos de carbono y nitrógeno. En la fase sólida, el sustrato proporciona un área superficial mayor, que favorece la germinación de conidios aéreos [Lomer y col., 2002].

En este trabajo se propone utilizar la fermentación bifásica como un método para la producción de conidios aéreos de *B. bassiana*, evaluando el uso de 3 residuos agroindustriales como sustratos: arroz quebrado, maíz quebrado y salvado de trigo.

## Metodología

### Materiales

Se utilizaron: agar Sabouraud dextrosa (SD), caldo SD, extracto de levadura (EL) (DIBICO, México, D.F.), arroz quebrado, salvado de trigo y maíz quebrado (forrajeras locales).

### Microorganismo

Se empleó la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2 (donada por el Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México). Ésta se cultivó, modificando la metodología reportada por López-Lastra y col. [2002], en agar SD al 4 % enriquecido con 0.05 % de EL por 7 días a 25 °C, posteriormente los conidios se extrajeron con agua destilada estéril y se conservaron en refrigeración (4 °C). Para preservar la homogeneidad genética, los conservados se emplearon como stock. Las concentraciones de las suspensiones de conidios fueron determinadas por conteo en cámara de Neubauer [Azamar-Jiménez, 2016]

### **Cinética de crecimiento y producción de biomasa en cultivo líquido**

Para determinar el tiempo de máxima producción de biomasa se realizó una cinética inoculando 1.5 mL de una suspensión con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  conidios/mL en matraces de 500 mL con un volumen de 150 mL de caldo SD al 4 % enriquecido con 0.05 % EL. Los matraces, se incubaron a 25°C con agitación orbital (180 rpm) (New Brunswick Scientific, modelo EXCELLA E24R), durante 10 días. Se tomaron muestras cada 24 h y la biomasa se determinó por espectrofotometría (Espectrofotómetro UV-Vis JENWAY modelo 6700) a 740 nm utilizando como blanco el medio de cultivo [Arnáiz y col., 2000]. Para producir la biomasa que se utilizó como inóculo en la fermentación sólida se utilizaron matraces de 1000 mL con 300mL del medio antes descrito inoculado con 3 mL de una suspensión con una concentración inicial de  $1 \times 10^8$  conidios/mL, incubados a 25°C en agitación orbital (180 rpm) durante el tiempo determinado en la cinética.

### **Fermentación sólida**

Se llevó a cabo en cajas de plástico (L 10 cm x A 10 cm x H 4 cm) en las que se agregaron 25g de cada sustrato sólido y 32.5 mL de agua destilada (75 % de humedad). Estas cajas fueron esterilizadas e inoculadas, bajo condiciones estériles, con 32.5 mL de una suspensión de esporas con una concentración de  $3.1 \times 10^9$  conidios/mL. Finalmente se incubaron a 25°C por 7 días, durante este periodo se tomaron muestras cada 24 h para cuantificar los conidios producidos. Ésta se realizó, bajo condiciones estériles, mezclando 1 g de cada sustrato fermentado con 20mL de agua destilada estéril, la mezcla se homogeneizó en un vórtex durante 2 min, se tomó una alícuota de 1 mL para realizar diluciones  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  para facilitar el conteo por cámara de Neubauer mediante microscopio óptico a 40x (Núñez-Gaona, 2009).

### **Viabilidad de los conidios**

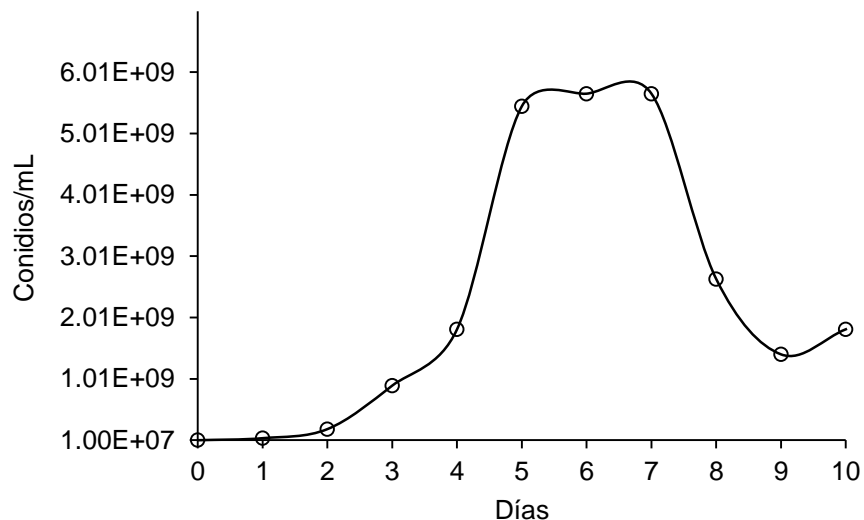
Al término de la fermentación sólida se tomaron alícuotas de cada sustrato se hicieron diluciones seriales hasta alcanzar una concentración entre 50 y 300 conidios en 200  $\mu$ L de agua estéril; este volumen se inoculó en placas Petri de 90mm de diámetro, Las cajas se incubaron a 25°C después de 24 h se observó la aparición de colonias en ellas (Modificado de Monzón, 2001). El porcentaje de viabilidad es igual a la relación del número de colonias que emergieron en este tiempo entre el número de conidios contados por cámara de Neubauer, multiplicado por 100.

## **Resultados y discusión**

### **Cinética de crecimiento en cultivo líquido.**

En la Figura 1 muestra la cinética de crecimiento de *B. bassiana* en cultivo líquido con un medio definido. Se observó la fase de crecimiento exponencial entre los días 3 y 5, posteriormente la fase

de mantenimiento del día 5 al día 7. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Azamar-Jiménez [2016] quien obtuvo el máximo crecimiento de *B. bassiana* durante el quinto día realizando pruebas de conteos de conidios por cámara de Neubauer y determinando la biomasa por peso seco.



**Figura 1. Cinética de crecimiento de *B. bassiana* en caldo SD adicionado con 0.05% de EL, a 25°C y 180 rpm.**

Por otro lado, fue posible asociar la turbidez del medio con la producción de biomasa de *B. bassiana*, debido a que la cuantificación indirecta de la biomasa realizada por espectrofotometría a las muestras obtenidas durante la cinética mostró que al sexto día de crecimiento se observó la máxima de absorbancia (Figura 2). La ventaja del método espectrofotométrico es que es rápido, mientras que el recuento de microorganismos en cámaras no es un método muy exacto debido a las irregularidades en la distribución de la muestra; además pueden confundirse las células con otras formas orgánicas e inorgánicas [Arnáiz y col., 2000].

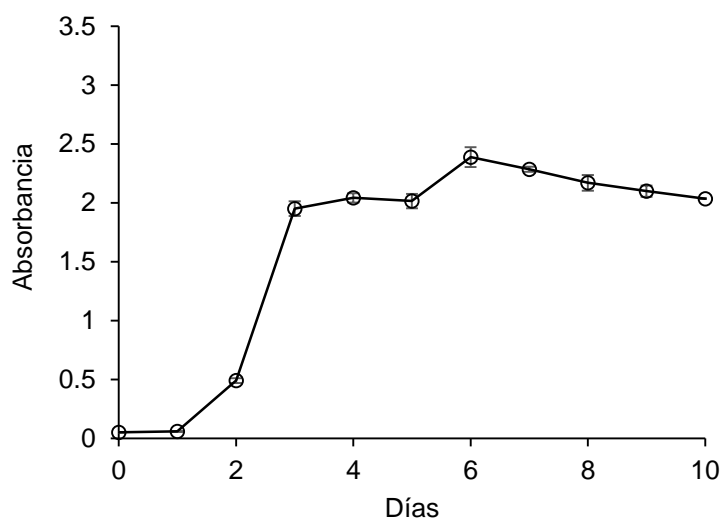
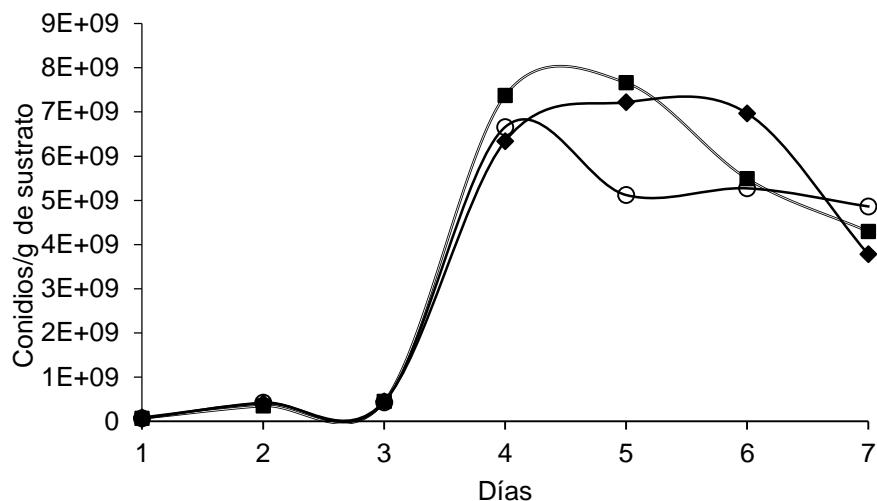


Figura 2.

Determinación espectrofotométrica (740 nm) de la biomasa de *B. bassiana* crecida en caldo SD adicionado con 0.05% de EL, a 25°C y 180 rpm.

#### Efecto del sustrato sobre el crecimiento de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida.

En la Figura 3 se muestra el crecimiento de *B. bassiana* con los tres sustratos. La fase de crecimiento exponencial se observó, para los 3 sustratos, del día 3 al día 4 del bioproceso. La máxima producción de biomasa se alcanzó a los 4 días con salvado de trigo ( $6.65 \times 10^9$  conidios/g de sustrato), y a los 5 días con maíz ( $7.65 \times 10^9$  conidios/g de sustrato) y arroz quebrado ( $7.21 \times 10^9$  conidios/g de sustrato); obteniéndose el mayor título de esporas por gramo de sustrato con maíz quebrado. Es importante señalar que en investigaciones realizadas para producir blastoesporas de *B. bassiana*, el sustrato sólido que se usa con mayor frecuencia es arroz [Gandarilla-Pacheco y col., 2013; Villalba y col., 2009]. Para la mayoría de las especies de hongos entomopatógenos, crecidos sobre arroz se han reportado rendimientos de hasta  $10^{10}$  conidios/g de sustrato, aunque frecuentemente, en la mayoría de las especies, los valores son de  $10^9$  conidios/g de sustrato [Méndez y col., 2010].

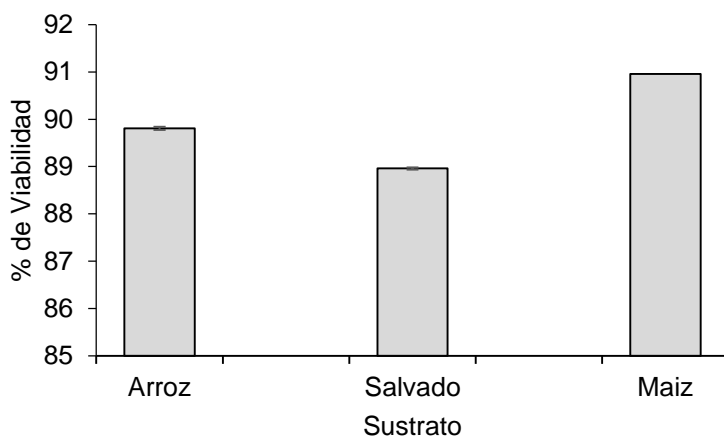


**Figura 3. Cinética de crecimiento de *Beauveria bassiana* en diferentes sustratos, (■) maíz quebrado, (◆) arroz quebrado y (○) salvado de trigo, por fermentación sólida**

**Efecto del sustrato sobre la viabilidad de *Beauveria bassiana*.**

En la Figura 5 se observa la viabilidad de los conidios *Beauveria bassiana* obtenidos por fermentación sólida con tres sustratos. La mayor viabilidad se obtuvo con maíz quebrado (90.5 %), seguida por la de arroz quebrado (89.8 %) y salvado de trigo (88.9%). En contraste, Matías-Montesinos [2008] reportó una viabilidad de entre 68 y 82% para los conidios provenientes de cultivos sólido, utilizando agar maltosa Sabouraud al 2% con 3% de avena y 0.5% de extracto de levadura, a las 20 h de incubación; mientras que Núñez-Gaona [2009] obtuvo una viabilidad del 87% en cultivos similares a los reportados por Matías-Montesinos [2008] pero en un tiempo de cultivo de 10 días.

Con los resultados previos, puede considerarse que los conidios producidos por fermentación sólida utilizando cualquiera de los sustratos analizados tienen una viabilidad considerable para la producción masiva de *B. bassiana*.



**Figura 5. Efecto del sustrato sobre la viabilidad de los conidios aéreos de *B. bassiana* obtenidos por fermentación sólida**

## Trabajo a futuro

Las perspectivas para este trabajo son seleccionar el sustrato para obtener conidios con alta virulencia, utilizando un insecto modelo (*Tenebrio molitor*). Posteriormente, optimizar los parámetros de producción de conidios (temperatura, pH, humedad, actividad de agua) y virulencia (tiempo y dosis letal 50) con la intención de desarrollar un formulado.

## Conclusiones

El maíz quebrado es un sustrato menos costoso que el arroz que, bajo las condiciones de este estudio, permitió la obtención de títulos de esporas/g de sustrato comparables a las reportadas para arroz con un alto porcentaje de viabilidad para los conidios. Es por ello que el maíz quebrado representa una alternativa para la producción masiva de conidios de *B. bassiana* de alta calidad.

## Referencias

1. Aponte, G., Carmona, I. (2000). Producción de conidiosporas de *Beauveria bassiana* como base para el desarrollo de un Bioinsecticida. Tesis de pregrado. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia.
2. Arnáiz, C.; Isac, L.; Lebrato, J. (2000). Determinación de biomasa en procesos biológicos. Grupo de tratamiento de aguas residuales. Tecnología del agua **(205)** 45-52.
3. Azamar Jiménez, I. J. (2016). Caracterización de los perfiles enzimáticos de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida utilizando chapulín como inductor. Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, Oaxaca. México.
4. Brechelt, A. (2004). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAPAL)
5. Gandarilla-Pacheco, F. L.; Galán-Wong, L. J.; Arévalo-Niño, K.; Elías-Santos M.; Quintero-Zapata, I. (2013). **Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. hypocreales: cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico.** Agrociencia **(47)**. 255-266.
6. López-Lastra, C.C.; Hajek, A.E.; Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canad. J. Bot.* **(80)** 1126-1130.
7. Lomer, C. J.; Bateman, R. P.; Johnson, D. L.; Lagewald, T. M. (2001). Biological Control of *locusts* and *grasshoppers*. *Annu. Rev. Entomol.* **(46)** 667-702.
8. Méndez, A.; del Pozo, E.; García, I.; González, A. (2010). Evaluación de sustratos para la producción masiva de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. *Rev. Protección Veg.* **(25)** 108-112.
9. Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) **(63)** 95-103.
10. Núñez-Gaona, O. (2009). Efecto de la actividad de agua y la modificación de la atmósfera gaseosa sobre la producción y calidad de conidios de *Beauveria bassiana*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México.
11. Ortiz Meza, J. A.; González Hernández, A.; Salazar Solís, E.; Torres Guzmán, C. (2005). Aislamiento de cDNAs de expresión diferencial durante el crecimiento *Metarhizium anisopliae* en cutícula de *Phyllophaga ravida* mediante la técnica de RDA. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.

12. Padilla Guerrero, I. E.; González Hernández, A.; Salazar Solís, E.; Torres Guzmán, J. C. (2005). Estudios para evaluar la participación de gene de expresión diferencial en el proceso de invasión de *Metarhizium anisopliae* a su hospedero. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.
13. Matias-Montesinos, R. (2008). Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México.
14. Soto, G. Memorias del Taller Agricultura Orgánica: una herramienta para el desarrollo rural sostenible y la reducción de la pobreza. [http://www.FAO.org/es/esc/common/ecg/30476\\_es\\_RUTAtaller.pdf](http://www.FAO.org/es/esc/common/ecg/30476_es_RUTAtaller.pdf). 19-21 Mayo 2003.
15. Villalba M., P. L.; Grillo Ravelo, H.; Cupull S., R. (2009). Producción de esporas de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre polvos de arroz, sorgo y maíz. Centro Agrícola **(36)** 25-32.
16. Whipps, J. M. and Lumsden, R. D. (2001). Commercial Use of Fungi as Plant as Plant Disease Biological Control Agents: Status and Prospects. CABI International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan Pp 9-22
17. Zavaleta-Mejía, E. (1999). Management Alternatives for Plant Diseases. *Terra* **(17)** 201-207.
18. Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol.* **(17)** 554-596.