

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Efecto del uso de rastrojo de amaranto en la  
producción de hongos entomopatógenos  
por fermentación bifásica utilizando un  
inductor.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**IBT. DANIEL LÓPEZ SOSA**

**Directora:** Dra. María de Jesús García Gómez

**Co-Director:** Dr. Oscar Núñez Gaona





# DEDICATORIA

# AGRADECIMIENTOS

# INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. MARCO TEORICO .....	18
2.1 Control biológico .....	18
2.2 Hongos entomopatógenos .....	20
2.3 <i>Beauveria bassiana</i> .....	22
2.3.1 Morfología.....	25
2.4 Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos .....	22
2.5 Enzimas hidrolíticas presentes durante la infección.....	26
2.5.1 Proteasas.....	26
2.5.2 Quitinasas.....	27
2.5.3 Lipasas .....	28
2.6 Producción de hongos entomopatógenos.....	29
2.7 Fermentación bifásica .....	29
2.8 Rastrojo de amaranto ( <i>Amaranthus hypocondricus</i> ) como sustrato alternativo .....	32
2.9 Insecto modelo.....	33
3. ANTECEDENTES.....	35
3.1 Producción de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> .....	35
3.2 Producción de enzimas asociadas a la virulencia de los hongos entomopatógenos .....	35
3.2.1 Proteasas.....	36
3.2.2 Quitinasas.....	36
3.2.2.1 Endoquitinasas.....	37
3.2.2.2 Exoquitinasas.....	37

3.3	Fermentación bifásica .....	38
3.4	Humedad.....	38
3.5	Actividad de agua.....	39
3.6	Uso de rastrojo de amaranto como sustrato en fermentación sólida .....	39
3.7	Virulencia .....	40
4.	JUSTIFICACIÓN.....	42
5.	HIPOTESIS.....	43
6.	OBJETIVOS.....	44
6.1	Objetivo general.....	44
6.2	Objetivos particulares .....	44
7.	METODOLOGÍA .....	45
7.1	Aislamiento de hongos entomopatógenos .....	45
7.2	Identificación molecular.....	45
7.3	Selección del controlador .....	46
7.4	Inductor .....	46
7.5	Análisis proximal .....	46
7.5.1	Determinación del Nitrógeno total.....	46
7.5.2	Determinación de cenizas.....	48
7.5.3	Determinación de humedad.....	49
7.5.4	Determinación del extracto etéreo .....	49
7.5.5	Determinación de azúcares totales.....	50
7.6	Cinética de crecimiento y producción de biomasa en cultivo líquido.....	51
7.7	Fermentación sólida .....	51
7.7.1	Obtención de muestras.....	51
7.7.2	Determinación del perfil de pH.....	52

7.7.3	Elaboración de curvas de secado para la fermentación sólida .....	52
7.7.4	Cuantificación de la actividad de agua (Aw) durante la fermentación sólida	52
7.7.5	Cuantificación de conidios .....	52
7.7.6	Determinación de las actividades enzimáticas .....	53
7.7.6.1	Obtención del extracto enzimático .....	53
7.7.6.2	Determinación de la actividad de endoquitinasas .....	53
7.7.6.3	Determinación de la actividad de exoquitinasas .....	53
7.7.6.4	Determinación de la actividad proteolítica.....	54
7.7.7	Realización de bioensayos .....	55
7.7.8	Cálculo del Tiempo Letal 50 .....	55
7.7.9	Cálculo de la Dosis Letal .....	55
7.7.10	Cuantificación de la viabilidad.....	55
7.7.11	Análisis estadístico .....	56
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	57
8.1	Aislamiento e identificación de los microorganismos .....	57
8.2	Selección del controlador .....	58
8.3	Determinación del Tiempo Letal 50 para la cepa D .....	59
8.4	Fermentación líquida.....	59
8.5	Análisis proximal .....	60
8.6	Azúcares totales asociados a glucosa .....	61
8.7	Fermentación en medio sólido .....	62
8.7.1	Perfil de comportamiento del pH.....	62
8.7.2	Curvas de secado .....	64
8.7.3	Cinéticas de actividad de agua .....	66

8.7.4	Producción de conidios.....	68
8.7.5	Actividades enzimáticas.....	71
8.7.6	Bioensayos .....	77
8.7.7	Tiempo Letal 50 .....	78
8.7.8	Viabilidad .....	80
8.7.9	Dosis Letal .....	81
9.	CONCLUSIONES .....	85
10.	CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS.....	86
11.	REFERENCIAS .....	88
12.	ANEXOS.....	105

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ventajas y desventajas del control biológico.....	19
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los géneros de HEP .....	21
<b>Tabla 3.</b> Sustratos sólidos evaluados para la producción de los principales Ascomycetos entomopatógenos. ....	31
<b>Tabla 4.</b> Identidad de los aislados.....	57
<b>Tabla 5.</b> Análisis proximal de los sustratos empleados, con y sin inductor .....	61
<b>Tabla 6.</b> Azúcares totales para los sustratos empleados, con y sin inductor .....	62
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre el pH.....	64
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la humedad.....	66
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad de agua .	68
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la producción de conidios .....	71
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad de endoquitinasas. ....	73
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad de exoquitinasas al término del bioproceso. ....	75
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad proteolítica.	77
<b>Tabla 14.</b> Tiempo Letal 50 de los conidios producidos mediante fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor.....	79

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras morfológicas de <i>Beauveria bassiana</i> .....	25
<b>Figura 2.</b> Proceso de infección de HEP.....	24
<b>Figura 3.</b> Estadios del insecto <i>Tenebrio molitor</i> .....	34
<b>Figura 4.</b> Características del ambiente en el cual se realizó el aislado de los hongos. 45	
<b>Figura 5.</b> Aislados identificados .....	57
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético de los aislados obtenidos.....	58
<b>Figura 7.</b> (%) Mortalidad en función del tiempo del aislado D.....	58
<b>Figura 8.</b> Cinéticas de producción para <i>Beauveria bassiana</i> en fermentación líquida.....	60
<b>Figura 9.</b> Producción de biomasa en cultivo líquido .....	60
<b>Figura 10.</b> Perfil de pH en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control. ....	63
<b>Figura 11.</b> Curva de secado en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control.....	65
<b>Figura 12.</b> Cinética de actividad de agua en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control .....	67
<b>Figura 13.</b> Cinética de producción de conidios mediante fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control. ....	69
<b>Figura 14.</b> Producción de conidios mediante fermentación sólida.....	70
<b>Figura 15.</b> Actividad de endoquitinasas en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control. ....	72
<b>Figura 16.</b> Actividad de exoquitinasas en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control.....	74

<b>Figura 17.</b> Actividad proteolítica en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control.....	76
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de mortalidad de los conidios producidos en fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control .....	78
<b>Figura 18.</b> Viabilidad de los conidios producidos mediante fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control .....	81
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de mortalidad de los conidios producidos en arroz mediante fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control .....	82
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de mortalidad de los conidios producidos en rastrojo de amaranto mediante fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control	83
<b>Figura 21.</b> Comparativa entre el Tiempo letal 50 y dosis letal de los conidios producidos mediante fermentación sólida empleando la cepa D y una cepa control	84

## RESUMEN

El control biológico, es un método esencial dentro del manejo integrado de plagas, este permite disminuir el uso de plaguicidas químicos mediante el uso de organismos y/o componentes de éstos para reducir densidades poblacionales de organismos plaga, de esta manera es posible disminuir costos derivados de estos productos químicos, además evitan un mayor daño al ambiente. Los formulados biológicos a base de hongos entomopatógenos que se aplican en el campo requieren de altas concentraciones de conidios viables y con elevada virulencia. Uno de los procesos con mejores rendimientos para la producción de hongos entomopatógenos es la fermentación bifásica, en esta se buscan obtener mediante una fase líquida una alta concentración de biomasa fúngica, que posteriormente se empleará como inóculo en una fermentación en estado sólido. Una de las ventajas en este proceso es el aprovechamiento de los residuos agroindustriales empleados como sustrato sólido. Uno de estos residuos agroindustriales es el rastrojo de amaranto, debido a su alta relación C:N, además de ser contaminante, ya que al terminar la cosecha se abandona en el lugar de cultivo, por lo que su empleo no genera un costo adicional. Por otro lado, el empleo de *Tenebrio molitor* como inductor tiene efecto sobre la virulencia, en fermentación sólida. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del rastrojo de amaranto como sustrato sobre la producción de hongos entomopatógenos por fermentación bifásica utilizando un inductor. Los resultados mostraron que este sustrato no tuvo un efecto significativo sobre la virulencia de *Beauveria bassiana*, sin embargo, sí lo tuvo sobre la producción de conidios, así mismo, los conidios de *Beauveria bassiana* producidos con rastrojo de amaranto en presencia y ausencia del inductor, tuvieron viabilidades aptas para la producción masiva.

## ABSTRACT

Biological control is an essential method within the integrated pest management, this allows to reduce the use of chemical pesticides through the use of organisms and / or their components to reduce population densities of pest organisms, in this way it is possible to reduce derived costs of these chemical products, they also prevent further damage to the environment. Biological formulations based on entomopathogenic fungi that are applied on agricultural fields require high concentrations of viable conidia with high virulence. One of the processes with the best yields for the production of entomopathogenic fungi is biphasic fermentation, in which we seek to obtain a high concentration of fungal biomass through a liquid phase, which will later be used as inoculum in a solid state fermentation. One of the advantages in this process is the use of agro-industrial waste used as a solid substrate. One of these agro-industrial residues is amaranth stubble, due to its high C:N ratio, besides being polluting, since at the end of the harvest it is abandoned at the place of cultivation, so its use does not generate an additional cost. On the other hand, the use of *Tenebrio molitor* as an inducer has an effect on virulence in solid fermentation. The objective of this work was to evaluate the effect of amaranth stubble as a substrate on the production of entomopathogenic fungi by biphasic fermentation using an inducer. The results showed that this substrate did not have an effect on the virulence of *Beauveria bassiana*, however, it did have an effect on conidia production, additionally, conidia of *Beauveria bassiana* produced with amaranth stubble in the presence and absence of the inducer, had viabilities suitable for mass production.

# 1. INTRODUCCIÓN

El deterioro ambiental se ha agravado en los últimos años, por diversas causas como; crecimiento demográfico descontrolado, uso desmedido de agroquímicos y la constante liberación de gases de efecto invernadero originados por la actividad industrial y agroindustrial (FAO, 2019).

El uso desmedido de agroquímicos, fue resultado de la revolución verde, la cual buscaba mejorar los rendimientos de los cultivos mediante el uso de estos productos junto con la utilización de grandes extensiones de tierra para el monocultivo (Brechelt, 2004). Sin embargo, con el monocultivo, el ambiente entró en un desbalance ecológico, afectando la densidad poblacional de los organismos que lo habitan. Dando origen a las plagas agrícolas, concepto que engloba a todos los animales, plantas y microorganismos que tienen un efecto negativo sobre la producción agrícola (Hajek, 2004).

Debido a esta problemática se han diseñado programas de control biológico, un método que permite disminuir el uso de agroquímicos (Whipps y Lumsden, 2001), los cuales se definen como el empleo de organismos y/o sus partes para reducir las densidades poblacionales de plagas. Esto ha permitido disminuir el uso de insecticidas sintéticos, evitar daños al ambiente y al ser humano.

Dentro de los organismos que se emplean en el control biológico se encuentran microorganismos entomopatógenos, virus, bacterias, nemátodos 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 insecto desarrolle la infección y muera (Montesinos-Matías, 2008). Durante la infección, los hongos entomopatógenos liberan enzimas hidrolíticas encargadas de la penetración de la cutícula de los insectos (Montesinos-Matías, 2012).

En la actualidad existen formulados biológicos comerciales, que son productos elaborados a base de organismos o sus partes, con el potencial de reducir las densidades poblacionales de las plagas. Sin embargo, existe una búsqueda constante de alternativas que permitan mejorar los rendimientos, que involucran el uso de inductores de virulencia y/o sustratos económicos para mejorar la calidad y efectividad de estos formulados. Así mismo, es necesario realizar una selección adecuada del microorganismo, por este motivo, un paso determinante es el aislamiento e identificación del agente patógeno. Dando prioridad a la búsqueda de éste en la región donde será empleado.

Los formulados biológicos pueden ser producidos por fermentación líquida (FL) o fermentación sólida (FS). En investigaciones recientes se ha demostrado que en FL las enzimas responsables de la infección son inducibles (Jiménez-Alejandro, 2016), sin embargo, las unidades infectivas producidas (blastoesporas) tienen una viabilidad limitada y no son aptas para su uso a nivel agrícola. Por otro lado, las producidas (conidios) durante la FS son más resistentes a cambios abióticos con mejor viabilidad y efectividad en comparación con las producidas por FL (Lomer *et al.*, 2001).

Actualmente, hay un interés creciente en la fermentación bifásica para la producción de conidios, ésta se realiza en dos etapas secuenciales; líquida y sólida. En donde, el microorganismo entomopatógeno se cultiva en medio líquido hasta que alcanza la máxima concentración de biomasa, posteriormente se transfiere la biomasa a un sustrato sólido (Aponte *et al.*, 2000), generalmente un residuo agroindustrial, para obtener altos rendimientos del agente.

El propósito de este estudio, fue aislar e identificar molecularmente hongos entomopatógenos endémicos de la cuenca del Papaloapan, evaluando su virulencia y viabilidad en fermentación bifásica empleando rastrojo de amaranto (*Amaranthus hypocondricus*) como sustrato sólido por su alta relación carbono nitrógeno además de ser prácticamente gratuita su adquisición y cutícula de *Tenebrio molitor* como

inductor de la virulencia debido a que las enzimas implicadas en la infección de los hongos entomopatógenos son inducibles.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 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 por sus enemigos naturales (Rodríguez y Arredondo, 2007); mediante la acción de parásitos, depredadores y patógenos. Los primeros, llamados también parasitoides, son insectos que viven a expensas de otros insectos (huéspedes) a los que devoran progresivamente hasta causarles la muerte. Los depredadores son insectos u otros animales que causan la muerte de las plagas (presas) succionándoles la hemolinfa o devorándolos. Los patógenos son microorganismos: virus, bacterias, protozoarios, nematodos y hongos, que causan enfermedades o epizootias a las plagas (Cisneros, 2010). A lo largo de la historia han existido ejemplos del uso de enemigos naturales para el control de plagas siendo quizá, el caso más antiguo, el 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 la exitosa introducción de *R. cardinalis* en 1888 para combatir la escama algodonosa (*Icerya purchasi*) en California (Nicholls, 2008).

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 humana. El estudio y aprovechamiento de los enemigos naturales no es nuevo en México. Existen distintos tipos de organismos que son utilizados en el manejo de plagas entre los que resaltan: virus, bacterias, protozoarios, nematodos y hongos entomopatógenos, resaltando estos últimos por lo sencillo de su manejo y producción (Montesinos-Matías, 2008). Los hongos entomopatógenos han recibido mayor atención por su 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 han

reportado alrededor de 750 especies de hongos patógenos para plagas de plantas (Ondráčková, 2016). Algunas de las ventajas y desventajas de su uso en el control biológico se describen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas del control biológico (Modificado de López-Sosa, 2018)

<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
Su 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 contaminan 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	Ignorancia sobre los principios del método
Las plagas no desarrollan resistencia a sus enemigos naturales	Reducido apoyo económico

## 2.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos se encuentran asociados con insectos que viven en diversos hábitats, como agua y suelo. (Carruthers y Hural 1990); por su particular mecanismo de infección, son los principales patógenos de insectos chupadores como áfidos, mosquita blanca, escamas, chicharritas y chinches (Rodríguez-del Bosque, 2007).

Una alternativa al uso de pesticidas sintéticos, es el uso de microorganismos como agentes de control, especialmente los hongos entomopatógenos (HEP) que poseen poco o nulo efecto negativo sobre la salud humana y ambiental (Erler, 2015). El término entomopatógeno ha sido definido por varios autores de diferentes maneras; Devotto *et al* (2010), como aquel microorganismo que posee la capacidad de atacar insectos; García *et al*, (2008), como parásitos obligados o facultativos de insectos, con una alta capacidad de esporulación, sobrevivencia, con sus mayores ventajas centradas en la adaptación a diferentes ambientes, especificidad y capacidad de penetración directa a través del tegumento de los huéspedes. Los HEP, se encuentran virtualmente en todos los grupos taxonómicos excepto la división *Basidiomycota* (Rodríguez-Gómez, 2009; Montesinos-Matías, 2012; Butt, 2015). La mayoría con potencial para el control de insectos plaga pertenecen a las divisiones *Zygomycota* y *Ascomycota* (Tabla 2). Estudios de biología molecular han demostrado que estos hongos, (antes agrupados en los *Hyphomycetes* de la clase *Deuteromycota*) son anamórficos (forma asexual) de los *Ascomycota* dentro del orden *Hypocreales*, familia *Clavicipitaceae*. Además, dentro de la división *Zycomycota*, muchas especies de entomopatógenos están en el orden *Entomophthorales* (Montesinos-Matías, 2012).

**Tabla 2.** Clasificación de los géneros de HEP (Modificado 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>Strongwelsea</i>
				<i>Pandora</i>
				<i>Tarichium</i>
				<i>Zoopthora</i>
			<i>Neozygitaceae</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>Nomurea</i>

Los primeros hongos en ser descritos como causantes de enfermedad y muerte de insectos fueron Hyphomycetes, Por ejemplo, Agostino Bassi en 1835, sugirió que un microorganismo era el responsable de la enfermedad conocida como “muscardina blanca” en el gusano de seda (*Bombyx mori*). La especie de hongo causante de dicha enfermedad fue nombrada después *Beauveria bassiana* en su honor (Steinhaus, 1963; Eler, 2015). Este hecho marcó el inicio del estudio de la patología de insectos, cuyo desarrollo y aplicación comenzó en 1879 con Hagen, quien estudió el posible uso de hongos para el control de insectos (García *et al*, 2008).

Las enfermedades causadas por hongos (micosis) son comunes y ampliamente distribuidas en poblaciones de insectos plaga, pudiendo causar altas mortalidades

mediante epizootias. Una característica común en los HEP es que, con excepción de *Microsporidia*, infectan a su huésped por contacto directo sobre la cutícula, y no por vía oral (Jaronski, 2013). Existen unas 750 especies de HEP en aproximadamente 100 géneros con distribución mundial, no obstante, sólo unos pocos son estudiados de manera intensiva (Cisneros, 2010). Entre estos 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 son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, debido a su eficiencia y fácil producción masiva (Rodríguez *et al*, 2006).

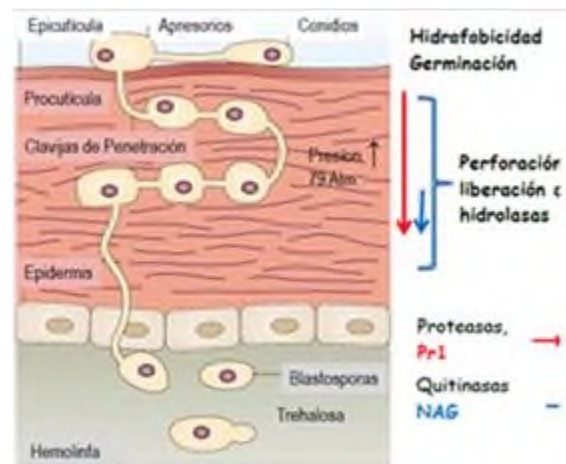
La ventaja de los HEP como controladores biológicos radica en que el insecto huésped difícilmente desarrollará resistencia, su principal desventaja radica en que su eficacia contra las plagas depende de las condiciones ambientales, particularmente temperatura y humedad (Ondráčková, 2016). La temperatura afecta la infección así como el desarrollo en el huésped (Cisneros, 2010) y la humedad es un factor esencial para la germinación y diseminación de las esporas de la mayoría de los hongos (Jenkins *et al*, 1998).

### **2.3 Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos**

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). La patogénesis en los insectos ocurre de manera progresiva, generalmente sus fases de desarrollo son: adhesión, germinación de conidios, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, multiplicación dentro del huésped (García *et al*, 2008), producción de toxinas, muerte del insecto, colonización, protrusión del micelio hacia el exterior, esporulación y diseminación de nuevas estructuras infectivas (Monzón, 2001). El proceso infectivo (Figura 2) inicia cuando la unidad infectiva (espora o

conidio) se adhiere a la cutícula del insecto mediante fuerzas hidrófobas debido a la presencia de proteínas de bajo peso molecular (10 kDa) ricas en cisteínas llamadas hidrofobinas (Rodríguez y Arredondo, 2007), posteriormente, si las condiciones son favorables (temperatura, nutrientes y humedad) se desarrolla un tubo germinativo o haustorio (también denominado hifa de penetración) y un apresorio, este último para fijarse a la cutícula, mientras que el primero comienza la penetración del insecto (Gaxiola-Castro, 2014). Estas estructuras especializadas de infección son raramente observadas en *B. bassiana*, aunque se han visto sobre larvas de *Leptinotarse decemlianeata* por microscopía electrónica de barrido (Montesinos-Matías, 2012). En el proceso de 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 otro químico, que es la acción de enzimas hidrolíticas, principalmente proteasas, esterases, lipasas y quitinasas, secretadas por las hifas, encargadas de hidrolizar la cutícula en la zona de penetración (Monzón, 2001). La penetración se favorece por efecto de la presión hidrostática y la formación de clavijas que penetran la cutícula del huésped (Rodríguez y Arredondo, 2007). Una vez dentro del hemocele, la colonización del insecto 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 su crecimiento, desnutrición y por la acción de metabolitos secundarios (toxinas). Bajo condiciones de humedad relativa elevada, en un periodo de 24 a 48 h después de la muerte del huésped el hongo emerge, esporula y produce una capa de conidios sobre la superficie del insecto para continuar con su ciclo infectivo (Montesinos-Matías, 2012; Jaronski, 2013; Gaxiola-Castro, 2014). En esta fase, el insecto muerto adquiere una coloración característica de acuerdo al hongo por ejemplo, verde si es *Metarhizium* y blanco si es *Beauveria* (Monzón, 2001). 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. La importancia de estas características varía con el aislado y con el huésped (Gaxiola-Castro, 2014).



**Figura 2.** Proceso de infección de HEP, con énfasis en la acción sinérgica de presión mecánica y liberación de enzimas que degradan la cutícula del huésped (Modificado de Montesinos-Matías, 2008).

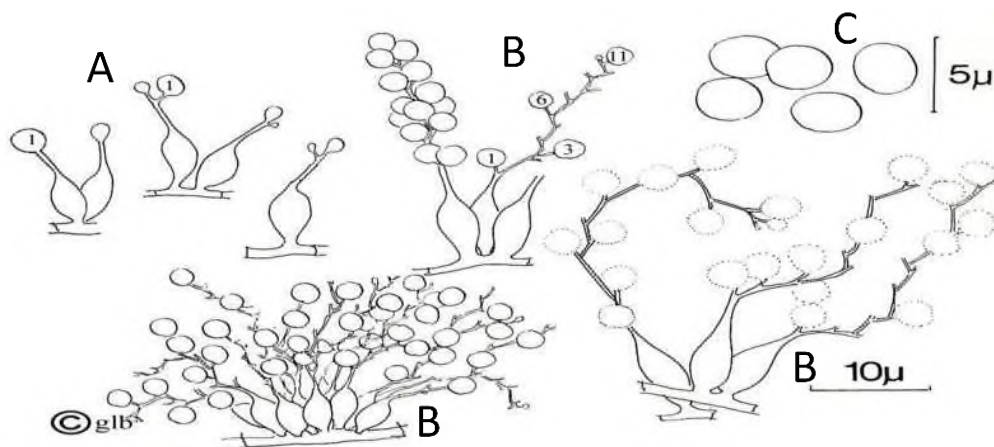
## 2.4 *Beauveria bassiana*

Es un hongo basidiomiceto que ha sido estudiado por más de 100 años y a la fecha no se le conoce algún efecto adverso sobre mamíferos, únicamente presenta acción patógena ante insectos (Hernández, 2016). *Beauveria* también es conocido por la producción de metabolitos secundarios con características tóxicas para insectos. Infecta alrededor de 707 especies de insectos en 521 géneros de 149 familias que comprenden 15 órdenes (Núñez-Gaona, 2009). Ha sido empleado para combatir plagas agrícolas de importancia económica, como: picudo del algodón (*Anthonomus grandis* Boh), perforador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner), broca del café (*Hypothenemus hampei*) entre otros (Rodríguez-Gómez, 2009). Es cosmopolita (Villalba *et al.*, 2009), de sencilla identificación, y de aparición frecuente en la naturaleza, tiene un amplio rango de huéspedes, fácilmente se puede aislar de insectos muertos o del suelo. Tiene la capacidad de vivir de manera parásita o saprófita, lo que le permite subsistir en ausencia de un huésped, además de poseer 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).

### 2.4.1 Morfología

Es un hongo heterótrofo, morfológicamente está formado por hifas septadas con longitudes de 2.5 a 25  $\mu\text{m}$ , en las que se generan conidióforos simples y raramente agrupados. Los conidióforos, se originan de forma acropeta, dando forma de zigzag al raquis durante la reproducción asexual (Figura 1). Su crecimiento sobre el suelo genera enraizamiento micelial, desarrollado en conjunto con la materia orgánica (Ballesteros-Torres, 2013), sin embargo, durante la infección de insectos, el conidio germina produciendo micelio y blastosporas, estructuras semejantes a levaduras (Wong, 2003). En medio sólido o semi sólido produce, conidios aéreos y en medios líquidos, conidios sumergidos cuya principal característica es que carecen de pared celular (blastoesporas) (Núñez-Gaona, 2009). Los conidios aéreos son más adecuados para el control de plagas de insectos que las blastosporas (Hegedus *et al.*, 1992).



**Figura 1.** Estructuras morfológicas de *Beauveria bassiana*. (A) Conidiogeno, (B) Conidioforo, (C) Conidio. (Modificado de López-Sosa, 2018)

## 2.5 Enzimas hidrolíticas presentes durante la infección

Pese a la complejidad de la acción enzimática durante la infección de los HEP, se ha relacionado con su capacidad infectiva y patogenicidad (Rodríguez-Gómez, 2009). La cutícula del insecto, primera barrera que debe traspasar un HEP, está constituida principalmente por quitina, proteínas, lípidos y compuestos fenólicos (Hegedus y Khachatourians, 1995; Monzón, 2001); por lo que el hongo debe emplear una combinación de mecanismos, uno físico con uno enzimático. Se ha comprobado la presencia de quitinasas (NAsa) y proteasas (Pr1 y Pr2) durante el proceso infectivo, verificándose que están estrechamente relacionadas con la virulencia de los HEP (Ballesteros-Torres, 2013).

### 2.5.1 Proteasas

Son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos, de acuerdo con su mecanismo de acción se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas (Rodríguez-Gómez, 2009). Dentro de estas proteasas existen dos, las cuales han sido estudiadas por su actividad dentro de la capacidad entomopatógenos de *Beauveria bassiana* estas son las Pr1 y Pr2. Las enzimas Pr1 (quimoelastasas o proteasas semejantes a subtilisina) y Pr2 (proteasas similares a tripsina) han sido descritas y caracterizadas en *M. anisoplie*, donde Pr1 son las principales dentro del procesos de hidrólisis de la cutícula, debido a la composición de esta última, 61-70% por proteínas (Bidochka, 1988), con las Pr2, como cooperadoras, ejerciendo un efecto sinérgico con Pr1. En *Beauveria bassiana* se han reportado funciones similares (Donatti *et al.*, 2008). La secreción de la carboxipeptidasa por *Beauveria bassiana* sobre la cutícula del huésped indica que ésta contiene los aminoácidos indispensables para el hongo, probablemente después de que Pr1 solubiliza las proteínas hasta péptidos de la cutícula. Dada la especificidad de acción de estas (Pr1), se considera que sirve como mecanismo de adaptación al huésped. Las metaloproteasas actuarían como

respaldo, complementando la acción de Pr1 (Rodríguez-Gómez, 2009). Varéa-Pereira *et al* (2007) realizaron un estudio en el que la producción de proteína extracelular en *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 con glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. La inducción de proteasas, por la presencia de cutícula de insectos en el medio de cultivo, ha sido reportada para *Beauveria bassiana* tanto con medios de cultivo líquidos (Qazi y Khachatourians, 2007; Donatti, 2008; Dias, 2008) como para sólidos (Barranco-Flrido *et al*, 2002).

### 2.5.2 Quitinasas

Junto con las quitosanasas tienen una participación relevante durante la penetración de la cutícula del insecto, 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 los polímeros de quitina, que se encuentra en la cutícula de los insectos (Arakane y Muthukrishnan, 2009). La hidrólisis de quitina se realiza por un sistema sinérgico y consecutivo, en una primera etapa las endoquitinasas, hidrolizan moléculas complejas hasta oligómeros; en una segunda las exoquitinasas producen monómeros de N-acetilglucosamina. Este proceso es empleado por hongos para el crecimiento, germinación de conidios, formación de apresorios y elongación de hifas (Ballesteros-Torres, 2013). Las quitinasas se encuentran en niveles basales y son inducibles. Las proteasas proveen los aminoácidos necesarios para el crecimiento, pero reprimen la síntesis de estas enzimas (Rodríguez-Gómez, 2009). Al exponerse las fibras de quitina y por acción de las hexosaminidasas se liberan oligómeros de NAG, que inducen la síntesis de quitinasas, lo que redundaría en la represión de la síntesis de proteasas hasta que los niveles de NAG disminuyen (Bidochka y Khachatourians, 1988). Se ha reportado que la glucosa reprime la síntesis de enzimas que depolimerizan la cutícula de los insectos (St. Leger *et al*. 1986;

Montesinos-Matías, 2012). Para los HEP, las quitinasas son herramientas relevantes durante el proceso de infección. *Beauveria bassiana* tiene la capacidad de secretar estas enzimas; en los primeros 4 días de crecimiento del hongo, están presentes en mayor concentración que las proteasas, las últimas aparecen después del quinto día de crecimiento (Ballesteros-Torres, 2013). A pesar de que las quitinasas tienen un papel importante sobre la virulencia, sólo se requieren durante un periodo de tiempo corto durante la penetración del huésped, su mayor producción se ha observado 40 h posteriores a la inoculación, durante la fase saprobia después de la muerte del insecto (Havukkala, 1993).

### 2.5.3 Lipasas

Pertenecen a la familia de las carboxil éster hidrolasas, presentan actividad contra los enlaces éster carboxílicos de los triglicéridos, actúan en la fase orgánica-acuosa liberando ácidos grasos y glicerol, desempeñan un papel importante durante la infección de insectos, hidrolizando enlaces éster en las lipoproteínas, grasas y ceras que se encuentran de manera abundante en el exoesqueleto (Cruz y Da Silva, 2014; Vici *et al*, 2015). Las lipasas penetran significativamente la cutícula liberando nutrientes, una vez que el integumento se rompe por su acción, continúa de manera inmediata la degradación de la cutícula por las proteasas Pr1 que se encargan de hidrolizar los componentes proteicos de la procutícula. Se ha identificado un mecanismo de defensa por parte de los insectos, asociado con la secreción de lactona B, responsable de la inhibición de la actividad lipolítica impidiendo subsecuentemente la infección (Mondal *et al*, 2016). Dawhan y Joshi (2017), compararon la actividad enzimática extracelular de *Beauveria bassiana* con su patogenicidad en contra de la mariposa de la col (*Pieris Brassicae*) reportando que los aislados con una actividad lipasa menor mostraron menor efectividad, lo que hace factible el considerar a las lipasas como un factor importante en la virulencia de *Beauveria bassiana*.

## 2.6 Producción de hongos entomopatógenos

La producción de hongos entomopatógenos se basa en su multiplicación masiva junto con sus estructuras reproductivas (Blastosporas y conidios) en un sustrato natural. Se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales: arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más empleados. La producción va desde métodos artesanales, semi-industriales de media escala, hasta la producción industrial a gran escala. La diferencia entre estos métodos no se manifiesta en la calidad del producto final, sino en los procesos empleados y volúmenes de producción; debido a que con un buen control de calidad se obtiene un producto de alta calidad con cualquiera de los métodos (Monzón, 2001).

En general el proceso está constituido por 2 etapas; inóculo y producción (Aponte *et al.*, 2000; Jaronski, 2013). La primera etapa consiste en el aislamiento, purificación de la cepa y selección del cultivo. El aislamiento consiste en la obtención del hongo a partir de insectos, plantas; o medios artificiales. Después del aislamiento se procede a la obtención de un cultivo puro. Este último paso es determinante para proveer el inóculo requerido para el proceso. Con el cultivo puro, se debe asegurar un aislamiento reciente, con todas las características relacionadas con su viabilidad y patogenicidad (Monzón, 2001). La etapa de producción implica la preparación de los sustratos, inoculación e incubación, proceso de secado y cosecha del hongo. La mayoría de los sistemas de producción de hongos entomopatógenos son bifásicos (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 sólidos para la producción de conidios aéreos

## 2.7 Fermentación bifásica

El uso de hongos para el control de plagas agrícolas depende de diferentes factores, por ejemplo, la producción de altas concentraciones de unidades infectivas estables a bajo costo. Los sistemas de producción industrial para algunos HEP utilizan métodos de fermentación en 2 etapas en los cuales el inóculo fúngico, hifa o micelio, es producido en medio líquido y después transferido a un sustrato sólido con el fin de incrementar la producción de conidios (Machado *et al*, 2010). Esta técnica es conocida como fermentación bifásica y ha sido desarrollada como una forma alternativa para mejorar la producción industrial, resultando en períodos de incubación más cortos, mayor producción de conidios y mejor control de calidad (Mascarin *et al*, 2010).

Los fundamentos para esta técnica fueron dados por Bartlett y Jaronski (1988). El principal es la colonización por el hongo de un sustrato, sólido (generalmente, un grano de cereal) con su subsecuente crecimiento vegetativo y conidiación (Monzón, 2001). Inicialmente el hongo crece en medio líquido hasta el final de la fase exponencial, para después ser transferido a un sustrato sólido (Aponte *et al.*, 2000). El medio líquido empleado deberá tener una relación adecuada de carbono y nitrógeno (Jaronski, 2013). En la fermentación sólida, el sustrato además de proveer un área superficial elevada para mejorar la aireación, sirve también como soporte físico para la producción de unidades infectivas (conidios aéreos) siendo utilizado como fuente de nutrientes por el hongo. La fermentación bifásica ofrece múltiples ventajas. Adicionalmente este sistema confiere una mayor competitividad a los hongos producidos, reduciendo el riesgo de contaminación del soporte sólido. Además, este proceso asegura una colonización uniforme del sustrato, favoreciendo un crecimiento fúngico uniforme. Finalmente, la colonización y producción de conidios ocurren a mayor velocidad, reduciendo los tiempos del proceso (Machado *et al*, 2010). Una vez terminado el período de producción en el sustrato sólido, el hongo pasa a un proceso de secado y posterior cosecha obteniendo un polvo que puede ser una mezcla de esporas, conidios, micelio y pequeñas partículas del sustrato (Monzón,2001).

Se han evaluado una amplia variedad de sustratos para la producción de *Ascomycetos*, siendo arroz y cebada los más utilizados en los trópicos y en el hemisferio norte, respectivamente. Existe un considerable esfuerzo para identificar subproductos agroindustriales económicos, para emplearlos como sustratos (Tabla 3) (Jaronski, 2013). Muy pocos estudios han examinado cuantitativamente algunos aspectos nutricionales tales como la relación C:N (Ortiz-Orquiza *et al*, 2010) o concentraciones controladas de carbohidratos (Domenech *et al*, 1998), no obstante, los subproductos del procesamiento del arroz permanecen como los sustratos elegidos con mayor frecuencia principalmente porque se encuentran disponibles a un bajo costo.

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

Sustrato	Hongo
Subproductos agrícolas	<i>Metarhizium</i>
Arroz quebrado	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Virutas de Yuca	<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>
Salvado de arroz	<i>Metarhizium, Beauveria</i>
Soya	<i>Metarhizium, Beauveria</i>

En los últimos años se ha reportado el uso de múltiples soportes inertes (inorgánicos). Estos incluyen diatomita (Jaronski, 2013), una piedra silícica sedimentaria; que puede obtenerse en una gran variedad de tamaños que van desde varios milímetros de diámetro hasta un polvo fino. Tiene una gran relación superficie volumen y puede absorber líquidos en cantidades de hasta 1.1 a 1.4 veces su peso. También se ha reportado el uso de gránulos de arcilla para la producción de *Beauveria bassiana* (Desgranges *et al*, 1993). A diferencia de los cereales y otros materiales orgánicos, estos sustratos tienen la ventaja de permitir un control flexible sobre los nutrientes, adaptándolos para la cepa, así como la posibilidad de ser reciclados después de lavarlos y esterilizarlos (Jaronski, 2013), siendo el costo su principal desventaja.

## **2.8 Rastrojo de amaranto (*Amaranthus hypocondricus*) como sustrato alternativo**

El amaranto es una especie de maduración anual, de tipo herbácea de diversos colores (del verde hasta el morado), de raíces pivotantes con abundantes ramificaciones, que facilitan la absorción de agua y nutrientes, la raíz principal sirve de sostén a la planta manteniendo la panícula. Las raíces primarias llegan a tener una consistencia leñosa y terminan anclando firmemente la planta. El tallo puede llegar a medir desde los 0.4m hasta los 3m de altura (Tapia, 1997).

Al término de la cosecha todos los residuos de la planta permanecen en el área de cultivo sin aprovechamiento alguno, favoreciendo la generación de gases de efecto invernadero. Sin embargo, el rastrojo de amaranto tiene potencial para ser empleado como una fuente de carbono gratuita (el único costo es recolectarlo y

transportarlo). Al tener altas relaciones C:N, puede emplearse para la producción de enzimas, polifenoles, así como sustrato para la producción de hongos entomopatógenos por fermentación sólida.

## **2.9 Insecto modelo**

De todos los aspectos relacionados con la calidad de un agente de control biológico, el bioensayo es el más importante. Puede llegar a resultar un proceso laborioso y costoso, pero es la única manera de evaluar la calidad del producto final. Debido a la diversidad en el modo de acción de los microorganismos empleados en estos procesos, 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 los insectos causantes de plagas estacionales (Núñez-Gaona, 2009).

*Tenebrio molitor* es una plaga cosmopolita de granos almacenados, cereales y sus productos (Montesinos-Matías, 2012). Como características morfológicas, posee dos pares de alas, las delanteras, son endurecidas, llamadas elitros. Las internas, son membranosas y usadas para volar. Estos insectos poseen metamorfosis completa, con etapas de huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3). Las larvas se especializan en la búsqueda de distintos tipos de alimentos como: granos, harinas, tabaco, y comida en general; es resistente a temperaturas extremas, pudiendo permanecer vivas durante 80 días a -50°C (Rodríguez-Gómez, 2009), son empleadas como alimento para algunas clases de mascotas; las pupas, son un estadio de quietud y el adulto se especializa en la reproducción y dispersión (Rodríguez-Gómez, 2009).

Las hembras suelen depositar de 250 a 1,000 huevecillos ovalados con forma de riñón de color blanco, aisladamente o en racimo. 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 estadio larvario tiene una duración de 8 a 10 semanas, el de pupa un promedio de 2 semanas, y en la etapa adulta tarda de 4 a 8 semanas hasta desovar (Sánchez y Burgos, 2014). La temperatura óptima para su desarrollo es de 25 a 27 °C, no completando su ciclo con valores mayores a 30°C, la mayor ovoposición ocurre alrededor de los 26 °C (Díaz-Gamez, 2014).

*Tenebrio Molitor* ha servido como modelo de investigación en muchos estudios debido a que son fáciles de adquirir. Además, su cría dentro del laboratorio es sencilla, debido al tipo de alimentación y las condiciones para mantenerlos (Rodríguez-Gómez, 2009). Debido a lo anterior y que las enzimas hidrolíticas de los hongos entomopatógenos son inducibles se han realizado estudios con la cutícula de dicho insecto. (Jiménez-Alejandro, 2016; López-Sosa *et al.*, 2018)



**Figura 3.** Estadios del insecto *Tenebrio molitor*. A) Larva, B) pupa, C) adulto. Fotografía tomada dentro del laboratorio de bioprocesos por Daniel López Sosa.

## 3. ANTECEDENTES

### 3.1 Producción de conidios de *Beauveria bassiana*

Como antecedente directo se encuentran los estudios realizados por López-Sosa *et al.*, (2017,2018) donde se realizaron fermentaciones bifásicas para la obtención de conidios de *Beauveria bassiana*, encontrando los mejores tiempos de producción al 5to día del bioproceso con distintos sustratos sólidos. Gandarilla-Pacheco (2013) realizó fermentaciones sólidas con tiempos de producción de hasta 14 d utilizando rastrojos de maíz y arroz, encontrando concentraciones máximas de hasta  $1 \times 10^{10}$  conidios/g de sustrato entre los días 13 y 10. Gómez-Vásquez (2018) reportó que en fermentación líquida con medio Sabouraud adicionado con 0.05% de extracto de levadura, se obtuvo una concentración de conidios de  $7 \times 10^9$  conidios /mL al tercer día de producción, adicionalmente, así mismo, el autor reportó que el tiempo de producción máxima de conidios se redujo al cuarto día.

### 3.2 Producción de enzimas asociadas a la virulencia de los hongos entomopatógenos

En 1992 Ed-Sayed *et al.*, realizaron pruebas cualitativas para determinar la producción de enzimas con diferentes hongos entomopatógenos entre ellos *M. anisoplae*, *B. bassiana*, *Nomuraea atypicola* y *N. anemonoide* empleando la galería de pruebas comerciales API ZYM®, resultados semejantes se reportaron posteriormente (Ed-Sayed *et al.*, 2008; 2009) con distintas cepas de hongos entomopatógenos, los resultados mostraron la producción de enzimas hidrolíticas similares entre sí por parte de los hongos entomopatógenos. Qazy *et al.*, (2008), reportaron que al añadir fuentes de carbono y nitrógeno al medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) se benefició la producción de proteasas. En el 2016 Jiménez-Alejandro produjo distintas enzimas entre las que se encontraron proteasas,

quitinasas y lipasas, concluyendo que, en fermentación líquida las enzimas de *Beauveria bassiana* son inducibles.

### 3.2.1 Proteasas

Rodríguez-Gómez, (2009) determinó la actividad proteolítica de una cepa silvestre de *B. bassiana* en un medio con glucosa al 2.8 % (p/p) y nitrato de sodio, como únicas fuentes de C y N alcanzando una concentración de proteasas igual a 310 U/g. Montesinos-Matías, (2012) indujo la producción de proteasas en *B. bassiana* utilizando cutícula de *T. molitor* y glucosa a diferentes concentraciones como fuente de carbono, obteniendo la mayor concentración de proteasas (90 U/mL) con la cepa silvestre, con cutícula de *T. molitor* como única fuente de carbono y nitrógeno. En contraste la adición de 5 g/L de glucosa produjo 4 U/mL de proteasas, lo que significó una disminución del 95% con respecto al blanco. López-Sosa, (2018) determinó la actividad proteolítica de la *B. bassiana* 885.2 en distintos sustratos, obteniendo el mayor rendimiento (2.6  $\mu\text{mol/mL}$ ) con una mezcla arroz/inductor (95/5 %).

### 3.2.2 Quitinasas

En la literatura se describen dos tipos de quitinasas principales, secretadas por hongos entomopatógenos: exo y endo, (Arakane *et al.*, 2009). Estas presentan diversas isoformas, característica que, puede estar relacionada con la diversidad de los huéspedes que son infectados por los hongos (St. Leger *et al.*, 1993). La producción de quitinasas 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), también, se ha reportado el

efecto represor de la glucosa sobre la síntesis de estas enzimas (de Moraes *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2005; Safavi *et al.*, 2007).

### 3.2.2.1 Endoquitinasas

Rocha-Pino (2007) evaluó los perfiles de producción de endoquitinasas, N-acetilhexosaminidasas y proteasas con valores de pH controlado (5.0) y variable en cultivos sumergidos empleando *L. lecanii*, observando la expresión de endoquitinasas desde las primeras horas de cultivo alcanzando una concentración mayor en las fermentaciones (100 U/g sustrato sólido con pH controlado a las 108 h, para pH variable, se alcanzó la mayor producción (300 U/g sustrato sólido a las 120 h. Jiménez-Alejandro, (2016) produjo endoquitinasas con hongos entomo y fitopatógenos, en fermentación líquida, utilizando maltosa, polvo de camarón y peptona, reportando la mayor actividad de quitinasas (4.865 U/mL) con una cepa de *L. lecanii*.

### 3.2.2.2 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, obteniendo concentraciones de 540 y 965.5 U/g sustrato sólido con esporas y micelio respectivamente. En fermentaciones sólidas se observó el mismo comportamiento, con las mayores concentraciones de enzimas para esporas y micelio de 1016 y 1673 U/g SSI respectivamente, sin embargo, dichos valores se alcanzaron hasta las 144 h, lo que se consideró como una desventaja por la necesidad de mantener la asepsia del cultivo por un tiempo prolongado. Rodríguez-Gómez, (2009) reportó que en medios con glucosa al 2.8 % (p/p) y nitrato de sodio, como únicas fuentes de C y N, la producción de hexosaminidasas con una cepa de

*B. bassiana* alcanzó títulos de 1.74 UI/g Jiménez-Alejandro (2016) realizó estudios en fermentación líquida con hongos fito y entomopatógenos, determinando la actividad de exoquitinasas siendo una cepa de *Penicillium* la que produjo la mayor concentración de dichas enzimas (1150 mU/mL).

### **3.3 Fermentación bifásica**

La producción masiva de hongos entomopatógenos es de interés para el desarrollo de formulados biológicos, diversos autores reportan que un método eficiente es la fermentación bifásica (Jenkins *et al.*, 1998; Cruz-Martínez, 2007; Villalba *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2010). Señalando que previo a la inoculación de un sustrato sólido, se requieren la producción de biomasa y/o blastoesporas provenientes de un cultivo líquido. López-Sosa *et al.*, (2017) produjeron conidios de *B. bassiana* por fermentación bifásica con distintos sustratos sólidos (arroz, maíz y salvado de trigo), sin encontrar diferencias significativas en la producción y viabilidad de conidios producidos con los diferentes sustratos.

### **3.4 Humedad**

El contenido de humedad juega un papel significativo sobre el rendimiento final en la producción de los conidios aéreos por fermentación sólida, pero la optimización de este parámetro puede ser compleja. Muchos hongos mitospóricos prefieren contenidos de humedad elevados. Jenkins *et al.*, (1998) indicaron que los valores de este parámetro son frecuentemente calculados como la relación entre el porcentaje de agua presente en el sustrato húmedo con respecto al peso seco de este, 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 de los soportes. También, mostraron interés en la

actividad de agua ya que puede interactuar con varios factores físicos y químicos que afectan el crecimiento fúngico debido a que altera el potencial químico que existe entre el medio y el soluto intracelular, necesario para permitir el ingreso del agua a las células.

### **3.5 Actividad de agua**

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. Observaron crecimiento solo en el intervalo de  $A_w$  de 0.97 a 0.99, asimismo establecieron que el tiempo de cultivo, en fermentación sólida puede ser reducido hasta un 50 % sin causar alteraciones importantes en el rendimiento final de conidios aéreos.

López-Sosa *et al.*, (2017), realizó curvas de actividad de agua en fermentación bifásica utilizando distintos sustratos sólidos (arroz, maíz y salvado de trigo), reportando que no existieron diferencias significativas entre los sustratos en un intervalo de  $A_w$  de 0.96 a 0.99.

### **3.6 Uso de rastrojo de amaranto como sustrato en fermentación sólida**

El uso de rastrojo de amaranto como sustrato sólido para la producción de hongos entomopatógenos es un tópico que no ha sido explorado. Sin embargo, recientemente se evaluó su uso para la producción de polifenoles por fermentación sólida utilizando *A. niger* como inóculo ( $2.68 \times 10^7$  esporas/gramo de sustrato seco); a las 72 h de fermentación se obtuvieron  $327.06 \pm 47.02$   $\mu\text{g}$  de polifenoles /g de sustrato (Soriano-Santos *et al.*, 2006) siendo una característica importante la del volumen de inóculo del trabajo, debido que en fermentación sólida los títulos de

inoculo son de  $1 \times 10^8$  esporas/gramo de sustrato seco, para permitir una producción elevada del microorganismo; esto puede implicar el empleo del rastrojo de amaranto como un sustrato para la producción elevada de conidios de hongos entomopatógenos.

### 3.7 Virulencia

Diversos autores han reportado que la virulencia de los HEP 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 Maltosa Sabouraud al 2 % con 3 % de avena (p/p) enriquecido con extracto de levadura al 0.05 % (p/p), observando un 97 % de mortalidad al día 15 para la cepa 885.2. Además de un tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) de  $5.91 \pm 0.56$  días. Posteriormente, el mismo autor en 2012, reportó que las larvas de *T. molitor* mostraron una mayor resistencia a la infección de *B. bassiana* con respecto a los adultos, lo que se atribuyó, a una disminución en la respuesta inmune de los insectos adultos, debido a que en esta etapa la prioridad es la reproducción, además 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*), mostraron una mortalidad a las  $70 \pm 15$  h de entre el 79 a 95 % en insectos sumergidos en una concentración de  $4.4 \times 10^{13}$  conidios/mL, esta concentración es mayor a la utilizada por Montesinos-Matías, (2008) que fue de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Núñez-Gaona, (2009) reportó un tiempo letal 50 (TL<sub>50</sub>) de 16.9 d, utilizando *B. bassiana* en fermentación sólida con salvado de trigo como sustrato sólido. López-Sosa *et al.*, (2017) evaluaron el efecto de *T. molitor* como inductor

sobre la virulencia de *B. bassiana*, reportando que la relación arroz/inductor (90/10 %) alcanzó el 100 % de mortalidad al día 14.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto negativo que presentan los insecticidas sintéticos utilizados para la eliminación de plagas, el control biológico representa una alternativa capaz de reducir el uso de estos productos que a lo largo de los años han ocasionado serios problemas de contaminación y efectos adversos sobre la salud del humano y ganado.

Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de infectar a insectos de distintos órdenes, causantes de daños en cultivos de importancia económica, por ese motivo son los controladores más utilizados en los programas de control biológico.

El principal objetivo en la producción de formulados biológicos elaborados a partir de hongos entomopatógenos, es la obtención de la mayor cantidad de unidades infectivas viables y virulentas para su posterior uso en el control de plagas. Para cumplirlo se analizan parámetros relevantes que incluyen los métodos de producción, composición y costo del sustrato, entre otros.

La fermentación bifásica es un proceso que conjuga las mejores características de las fermentaciones líquida y sólida; es por ello que representa una alternativa ante las limitaciones de la fermentación líquida para la producción de conidios resistentes al ambiente. Además de la reducción de tiempos de proceso en fermentación sólida

Por otro lado, los residuos agroindustriales con una relación C: N adecuada para soportar el crecimiento microbiano y de bajo costo son una alternativa viable para procesos fermentativos para la producción de hongos entomopatógenos a nivel industrial. Tal es el caso del rastrojo de amaranto, que al ser un residuo agrícola sin costo y que no forma parte de la canasta básica mexicana, tiene un alto potencial para este uso.

## 5. HIPOTESIS

El uso de rastrojo de amaranto como sustrato en fermentación bifásica permitirá un nivel elevado de producción de hongos entomopatógenos con viabilidad y virulencia similar a los obtenidos con sustratos convencionales. Además, la adición de *T. molitor* al medio de cultivo inducirá la virulencia de los conidios del hongo entomopatógeno utilizado.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del uso de rastrojo de amaranto en la producción de hongos entomopatógenos por fermentación bifásica utilizando un inductor.

### 6.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar hongos entomopatógenos en la región del Papaloapan.
- Seleccionar la cepa fúngica en función de su virulencia analizada por bioensayos
- Producir biomasa por fermentación líquida en un medio definido (SDA).
- Evaluar las cinéticas de producción del hongo entomopatógenos producidos con y sin inductor por fermentación sólida utilizando rastrojo de amaranto y arroz.
- Determinar la viabilidad de los hongos entomopatógenos producidos por fermentación bifásica.
- Determinar el Tiempo Letal 50 y Dosis Letal de los hongos entomopatógenos producidos mediante fermentación bifásica

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Aislamiento de hongos entomopatógenos

Se realizó en la región de la cuenca del Papaloapan, específicamente en la comunidad de Rancho Grande, Valle Nacional Oaxaca (17.844256,-96.333192), en los campos de cultivos de café, se recolectaron micosados (Figura 4), los cuales se transportaron en cámaras húmedas al laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec y se cultivaron en Agar Papa Dextrosa, de manera serial hasta obtener cultivos puros (Gandarilla-Pacheco, 2013).



**Figura 4.** Características del ambiente en el cual se realizó el aislamiento de los hongos. Fotografía tomada por Daniel López Sosa.

### 7.2 Identificación molecular

Se produjo micelio por fermentación líquida, inoculando 1.5 mL de una suspensión de esporas de los hongos aislados con una concentración inicial de  $1 \times 10^7$  esporas/mL en un volumen final de 150 mL de caldo Sabouraud Dextrosa (SD) al 4 % (p/p) enriquecido con 0.05 % (p/v) de extracto de levadura (EL) incubándose a 25 °C y 180 rpm, durante 7 días. Se extrajo el ADN genómico de las cepas puras con la ayuda de un kit comercial (UltraClean), una vez realizada la extracción se enviaron dichas muestras al Instituto de Biotecnología de la UNAM unidad

Cuernavaca (IBt) para su secuenciación. Los resultados se analizaron con el software bioinformático MEGA X y se construyó un árbol filogenético.

### **7.3 Selección del controlador**

Según el árbol filogenético construido se determinó que el aislado D correspondía a al género *Beauveria* y especie *bassiana*, el cual es un hongo ampliamente utilizado para el control biológico, al cual se le realizó un bioensayo para determinar su virulencia, este se produjo por fermentación líquida, inoculando 5 mL de una suspensión de esporas con una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  esporas/mL en un volumen de 150 mL de caldo SD al 4 % (p/p) enriquecido con 0.05 % (p/p) de EL. Los cultivos, se incubaron a 25°C y 180 rpm, durante 7 días. Posterior a esto se realizaron bioensayos de acuerdo a lo reportado por Montesinos-Matías, (2008).

### **7.4 Inductor**

Se utilizó *T. molitor*, el cual se mantuvo separado en sus tres estadios en cajas de plástico de aproximadamente 45 L (60cm L x 25cm A x 30cm H), fueron alimentados con una mezcla estéril de salvado de trigo (250 g) y avena (30 g). Se utilizaron cadáveres de adultos previamente molidos en mortero, como inductor.

### **7.5 Análisis proximal**

#### **7.5.1 Determinación del Nitrógeno total**

Para el análisis de los sustratos sólidos y para conocer la relación Carbono/Nitrógeno (C:N) de estos, se determinó el porcentaje de nitrógeno total de acuerdo a la norma oficial mexicana (NOM-155-SCFI-2012) de la siguiente manera:

En un tubo de digestión se agregaron 12 g de sulfato de potasio, 1 g de sulfato de cobre, 1 g de muestra y 20 mL de ácido sulfúrico. El tubo se incubó aproximadamente por 2 h a 250 °C (hasta obtener un color claro). Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 85 mL de agua destilada. En el depósito de álcali de una unidad de destilación se colocaron 55 mL de hidróxido de sodio al 50% (p/v) y el tubo de digestión se colocó en la unidad de destilación. En la plataforma de recepción se colocó un matraz Erlenmeyer con 50 mL de ácido bórico al 4 % p/v más 8 gotas de indicador de Wesslow, la mezcla se destiló hasta obtener un volumen de 150 mL y se retiró el matraz de recepción. El destilado se tituló con ácido clorhídrico 0.1 N.

El porcentaje de nitrógeno total se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% N = \frac{(V)*(N)*(0.014)(100)}{M} \dots(1)$$

Dónde:

%N: Porcentaje de nitrógeno total

V: Volumen de ácido clorhídrico gastado al titular la muestra (mL)

N: Normalidad del ácido clorhídrico utilizado en la titulación

M: Peso de la muestra (g)

0.014: Miliequivalentes del nitrógeno

El porcentaje de proteína se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%P = \%N (F) \dots(2)$$

Dónde:

%P: Porcentaje de proteína presente

%N: porcentaje de nitrógeno total

F: Factor para transformar el nitrógeno a proteína

### 7.5.2 Determinación de cenizas

Se realizó siguiendo la metodología reportada en la norma mexicana (NMX-F-607-NORMEX-2013). Se colocó un crisol en una estufa a 105 °C durante 2 h, dejándose enfriar en un desecador y se determinó el peso del crisol (A). Se agregó 1 g de muestra (B) y se carbonizó lentamente en una parrilla hasta que ya no hubo desprendimiento de humo. Se colocó el crisol dentro de la mufla a 550 ± 25 °C de 5-6 h, después se pasó a una estufa a 100 °C durante 20 min y posteriormente se colocó en un desecador para finalmente determinar el peso del crisol con ceniza (C).

El porcentaje de cenizas se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(C-A)}{B} (100) \dots(3)$$

Dónde:

C: Peso del crisol con ceniza (g)

A: Peso del crisol vacío (g)

B: Peso de la muestra (g)

### 7.5.3 Determinación de humedad

Se realizó siguiendo la metodología de la norma oficial mexicana (NMX-116-SSA1-1994) de la siguiente manera: Se colocó una cápsula con gasa en una estufa a  $100 \pm 2$  °C durante 2 h, posteriormente, la capsula se trasladó a un desecador y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Después, se pesó ( $M_1$ ), se colocaron 3 g de muestra homogeneizada, después se tapó y pesó ( $M_2$ ). Se colocó en una estufa y se dejó secar durante 4 h a  $100 \pm 2$  °C, al final de este tiempo, se transfirió a un desecador, dejándose enfriar hasta temperatura ambiente. Finalmente se pesó ( $M_3$ ). La humedad del producto expresada en porcentaje se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Humedad = \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100 \dots(4)$$

Donde:

$M_1$ : Peso de la cápsula con gasa (g)

$M_2$ : Peso de la cápsula con gasa más muestra húmeda (g)

$M_3$ : Peso de la cápsula con gasa más muestra seca (g)

### 7.5.4 Determinación del extracto etéreo

Se realizó siguiendo la metodología de la norma oficial mexicana (NOM-086-SSAI-1994). Se pesó 1 g de la muestra y se agregó otro de sulfato de sodio, la mezcla se colocó dentro de un cartucho de extracción, el cual se depositó en un vaso de precipitado, se dejó secar durante 6 h y se cubrió con algodón. Posteriormente, se colocó el cartucho en un extractor Soxhlet y se ajustó al matraz previamente tratado

el cual se dejó secar 30 min a  $103 \pm 2$  °C (PB). Se adicionaron 40 mL de éter de petróleo, se conectó el refrigerante al extractor y se calentó el matraz hasta tener un flujo de 3-6 gotas por segundo. Se efectuó la extracción durante 4 h, después, se suspendió el calentamiento, se quitó el extractor del matraz y se dejó evaporar el disolvente a baja temperatura. Se dejó secar en una estufa a 100 °C hasta peso constante y se pesó (PG). El porcentaje de extracto etéreo total se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ extracto etéreo} = \frac{(PG-PB)}{PM} (100) \dots(5)$$

Dónde:

PG: Peso del matraz con grasa seca (g)

PB: Peso del matraz a peso constante (g)

PM: Peso de la muestra (g)

### **7.5.5 Determinación de azúcares totales**

Se tomaron 200 µL de una solución de carbohidratos, la cual se obtuvo agregando 20 mL de agua destilada a 5 g de cada sustrato (arroz y rastrojo de amaranto) con los diferentes niveles de inductor (0, 5, 10, 15 %), posteriormente se agregaron 100 µL de fenol al 5 % (p/v), inmediatamente se adicionaron 500 µL de ácido sulfúrico concentrado dejándose reposar durante 10 min, al término de este tiempo se mezcló y colocó en un baño de agua a temperatura ambiente durante 20 min, posteriormente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (Lector de microplacas BIORAD, modelo iMark). Empleándose una curva de

glucosa a diferentes concentraciones (1-8 mg/mL) como estándar (Urbaneja *et al.*, 1997).

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

Se determinó el tiempo de máxima producción de biomasa realizando una cinética, se inocularon 1.5 mL de una suspensión de esporas del hongo entomopatógeno seleccionado (Aislado D) con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL a 150 mL de caldo SD al 4 % (p/p) enriquecido con 0.05 % (p/v) de EL, los cultivos se incubaron a 25 °C a 180 rpm (New Brunswick Scientific, modelo EXCELLA E24R), durante 11 días. Se tomaron muestras cada 24 h y la biomasa se determinó por espectrofotometría (Espectrofotómetro UV-Vis JENWAY modelo 6700). Se hizo un barrido para encontrar la absorbancia máxima (740nm), utilizando como blanco el medio de cultivo (Arnáiz *et al.*, 2000).

## **7.7 Fermentación sólida**

Se realizaron en cajas de plástico (10cm L x 10cm A x 4cm H) agregando 25 g de cada sustrato (tamaño de partícula de 1.50 mm) con inductor (5, 10, 15% p/p) más un blanco por tratamiento y 32.5 mL de agua destilada (75 % de humedad) correspondiente a 0.99 de  $A_w$ . Cada unidad experimental se realizó por triplicado. Estas cajas se inocularon bajo condiciones asépticas, con 32.5 mL de una suspensión de conidios con una concentración de  $2 \times 10^9$  conidios/mL. Se incubaron a 25 °C por 8 días, durante este periodo se tomaron muestras cada 24 h para análisis posteriores (López-Sosa *et al.*, 2017).

### **7.7.1 Obtención de muestras**

En condiciones estériles se tomaron cada 24 h muestras representativas (aprox. 5 g) de cada tratamiento y su respectivo blanco, colocándolas en tubos para centrifuga de 50 mL. Las muestras se usaron para determinar la actividad de agua ( $A_w$ ), pH, humedad y conidios producidos.

### **7.7.2 Determinación del perfil de pH**

Para la elaboración del perfil de pH, se empleó un potenciómetro siguiendo la metodología descrita por Jiménez-Alejandro, (2016).

### **7.7.3 Elaboración de curvas de secado para la fermentación sólida**

La determinación de la humedad a lo largo de la fermentación sólida fue mediante la metodología descrita por Giraldo-Zuniga, (2010) empleando una termobalanza (Ohaus MB23) .

### **7.7.4 Cuantificación de la actividad de agua ( $A_w$ ) durante la fermentación sólida**

Se empleó un higrómetro (aqualab, PAWKIT), siguiendo la técnica descrita por Núñez-Gaona, (2009), se determinó la  $A_w$  cada 24 h durante el tiempo que duró la fermentación sólida construyéndose curvas de actividad de agua.

### **7.7.5 Cuantificación de conidios**

Se realizó una suspensión de cada muestra, agregando 20mL de agua destilada estéril, posteriormente se homogeneizó durante 2min. Una vez realizada la suspensión, se tomaron alícuotas de 1mL y se realizaron diluciones seriales de

$1 \times 10^1$  a  $1 \times 10^3$  para facilitar el conteo en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) empleando un microscopio óptico (Olympus Ch2) a 40x (Núñez-Gaona, 2009).

## **7.7.6 Determinación de las actividades enzimáticas**

### **7.7.6.1 Obtención del extracto enzimático**

El extracto enzimático se obtuvo suspendiendo el sustrato fermentado (5 g) en agua destilada estéril 1:4 (p/v). La suspensión se homogeneizó con un vórtex durante 2 min, empleándose el sobrenadante para realizar las determinaciones enzimáticas posteriores.

### **7.7.6.2 Determinación de la actividad de endoquitinasas**

Se hicieron reaccionar 100  $\mu$ L de extracto enzimático (muestras y testigos) con 100  $\mu$ L de una suspensión de quitina coloidal al 1% (p/v) en solución amortiguadora de fosfatos 5 mM a pH 6.7 (sustrato). La mezcla de reacción se incubó a 30 °C y 180 rpm por 24 horas (los testigos no se incubaron, se homogenizaron y se les cuantificó a una longitud de onda de 510nm). Al término de este tiempo, se agregó 1mL de agua destilada para detener la reacción, se mezcló un un vórtex y posteriormente se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. Una unidad enzimática se definió como 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).

### **7.7.6.3 Determinación de la actividad de exoquitinasas**

A 200  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de solución buffer de citratos-fosfatos 0.2 M a pH 5.6. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (pNAG) 1 mg/mL. La mezcla se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora, después de este tiempo la reacción se detuvo adicionando 1 mL de NaOH 0.02 M y se midió la absorbancia a una longitud de onda igual a 400 nm, utilizando como blanco los mismos reactivos únicamente sustituyendo el extracto enzimático por agua destilada estéril. Una unidad de actividad N-acetilhexosaminidasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones descritas (Tronsmo y Harman, 1993). Se realizó un curva patrón (0-20mg/mL) empleando p-nitrofenol como sustrato.

#### **7.7.6.4 Determinación de la actividad proteolítica**

Se empleó la metodología reportada por García-Gómez *et al.* (2009), haciendo reaccionar 250  $\mu\text{L}$  de una solución de caseína al 2% (Hammerstein, Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, USA), preparada en amortiguador de citratos y fosfatos 0.1 M y pH 5, con 250  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático a 30 °C y 180 rpm por 10 min, al término de este periodo se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido tricloroacético (TCA) 0.4 M (J.T. Baker, Phillipsburg, PA, USA) homogeneizándose con un vórtex, la mezcla se centrifugó a 11,000  $\times g$  durante 15 min a una temperatura de 4 °C. A 250  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se le adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu (SIGMA, St. Louis, MO, USA) diluido en agua destilada en una proporción 1:5, esta mezcla se dejó reaccionar a 30 °C durante 30 min, después de este tiempo se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 665 nm. La curva estándar se construyó utilizando tirosina a diferentes concentraciones (0-1  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ). Definiéndose; una unidad de actividad proteasa como la cantidad de enzima que produce el color equivalente a 1  $\mu\text{M}$  de tirosina en 1 ml de reacción por minuto a 30 °C y pH 5.

### **7.7.7 Realización de bioensayos**

Se seleccionaron larvas de *T. molitor* sanas, activas, del mismo tamaño y estadio. Una unidad experimental consistió en 12 larvas que fueron sumergidas por 15 segundos en una suspensión de  $1 \times 10^8$  conidios/mL. Cada unidad experimental se colocó en una caja de plástico transparente con avena estéril. Las cajas fueron incubadas a 25 °C con un fotoperiodo luz/oscuridad de 12/12 h. (Montesinos-Matías, 2008). Cada experimento se realizó por triplicado. Los resultados fueron reportados con respecto al % de mortalidad diaria.

### **7.7.8 Cálculo del Tiempo Letal 50**

Con los resultados obtenidos de los bioensayos, se realizó un análisis PROBIT para calcular este parámetro.

### **7.7.9 Cálculo de la Dosis Letal**

Se realizaron bioensayos con distintas concentraciones de conidios ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidios/mL), producidos con rastrojo de amaranto o arroz quebrado como sustratos sólidos, además de cada uno de los niveles de inducción (0, 5, 10, 15 % p/p). Al término de los bioensayos se calculó el Tiempo letal 50 para cada tratamiento y se determinó la mejor Dosis Letal.

### **7.7.10 Cuantificación de la viabilidad**

Al término de la fermentación sólida se tomaron muestras representativas (3g) de cada sustrato y se realizaron diluciones seriales con un volumen de 10mL, hasta alcanzar concentraciones entre 50 y 300 conidios en 500  $\mu$ L de agua destilada estéril; este volumen se inoculó en placas Petri, empleando el medio de cultivo

Sabouraud Dextrosa Agar Las cajas se incubaron a 25 °C, después de 24 h se observó la aparición de colonias (Monzón, 2001). El porcentaje de viabilidad se calculó como la relación del número de colonias que emergieron entre el número de conidios inoculados después de este tiempo - por 100.

#### **7.7.11 Análisis estadístico**

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

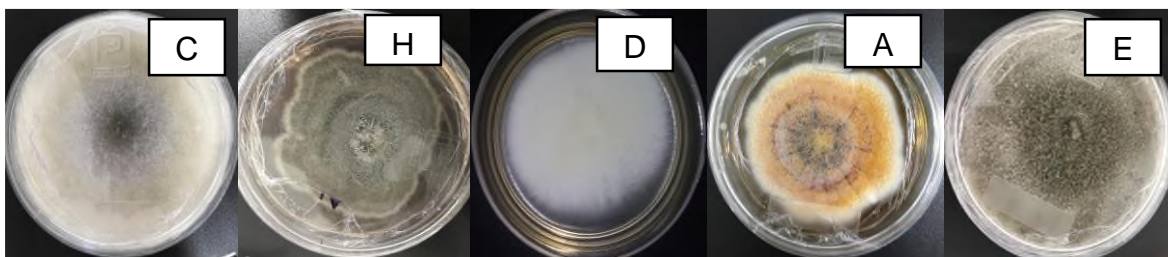
## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Aislamiento e identificación de los microorganismos

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la caracterización de los microorganismos aislados en rancho grande Valle Nacional Oaxaca (17.844256,-96.333192) se identificó mediante análisis molecular que la cepa D pertenece al género *Beauveria* un microorganismo ampliamente empleado en control biológico. En la Figura 5 se presenta la morfología colonial de cada aislado.

**Tabla 4.** Identidad de los aislados

Identificación	Microorganismo	Procedencia
A	<i>Aspergillus spp</i>	Hoja sana de café
C	<i>Trichoderma simplex</i>	Hoja sana de café
D	<i>Beauveria bassiana</i>	Insecto micosado
E	<i>Mucor baineri</i>	Insecto micosado
H	<i>Aspergillus flavus</i>	Hoja sana de café



**Figura 5.** Morfología colonial de los Aislados

En la Figura 6 se presenta el análisis filogenético realizado para identificar aislados, dicho análisis permitió la identificación de cada uno de ellos. Como se observa en la figura, el aislado D tuvo mayor similitud con la especie *Beauveria bassiana*, identificándolo como miembro de ésta, decidiéndose realizar el resto del trabajo con él, cabe destacar que los aislados C y H, los cuales corresponden a los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus flavus* respectivamente serán empleados para

investigaciones dentro el equipo de trabajo de Biotecnología sustentable de la Universidad del Papaloapan.



Figura 6. Árbol filogenético de los aislados obtenidos. Elaborado mediante MEGA X

## 8.2 Selección del controlador

En la Figura 7 se presenta el porcentaje de mortalidad en función del tiempo para la cepa D, se observó que el 100 % se alcanzó al día 14 lo que representó una disminución de tres días con respecto al valor reportado por López-Sosa, (2017) para una cepa mutada de *Beauveria bassiana*. Esta variación pudo deberse a las múltiples resiembras de la cepa mutada, al método de producción de producción, el uso de inductor, o a una elevada virulencia natural de la cepa D.

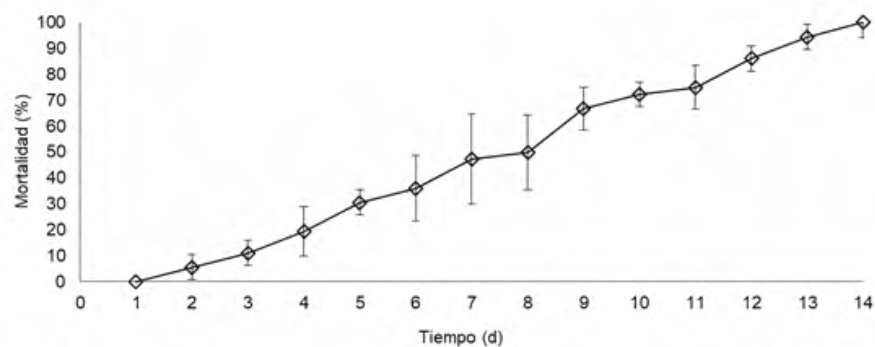


Figura 7. Evaluación de la mortalidad (%) en función del tiempo (d) para la cepa D

### **8.3 Determinación del Tiempo Letal 50 para la cepa D**

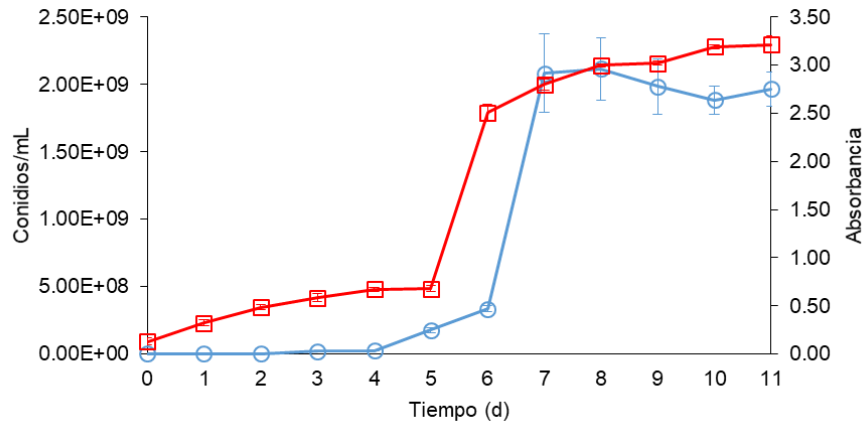
El tiempo letal 50 estimado para la cepa D (*Beauveria bassiana*) fue de  $4.76 \pm 2.25$  d, el cual fue  $6.43 \pm 4.21$  d menor al valor reportado por López-Sosa, (2018) estudio donde se realizaron fermentaciones sólidas empleando como sustrato maíz quebrado y *Tenebrio molitor* (85/15 %) y produciendo la cepa 882.5 de *Beauveria bassiana* correspondiente al cepario del laboratorio de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, la diferencia puede atribuirse a diversos factores como; tipo de fermentación, cepa y uso de inductores en la fermentación sólida. Este TL50 se calculó para determinar la virulencia inicial de la cepa D.

### **8.4 Fermentación líquida**

#### **8.4.1 Producción de biomasa y conidios**

En la Figura 8 se muestran los resultados de las cinéticas de producción de biomasa y conidios en función del tiempo por *Beauveria bassiana* en cultivo líquido. Se observó la duración de la fase de crecimiento exponencial entre los días 4 y 7, la fase de mantenimiento entre los días 7 y 11. Esto contrasta con lo reportado por Gómez-Vásquez (2018) quien obtuvo el máximo crecimiento (final de la fase de crecimiento exponencial) para *B. bassiana* 885.2 al quinto día, realizando los conteos de conidios por cámara de Neubauer y determinando la biomasa por peso seco.

En la misma figura se presenta el perfil de producción de biomasa, determinada por el cambio en la turbidez de la muestra. Se observó la máxima absorbancia al séptimo día de crecimiento. Este método espectrofotométrico representa las ventajas de rapidez y sencillez (Arnáiz *et al.*, 2000).



**Figura 8.** Cinéticas de producción de *Beauveria bassiana* en fermentación líquida. Conteo de conidios (-○-), biomasa determinada por absorbancia (-□-).

Cuando se compararon ambas cinéticas se observó que la producción de biomasa (Figura 9) y conidios se encuentran asociadas entre sí, esto coincide con lo reportado por López-Sosa *et al.*, (2017) quienes obtuvieron las máximas concentraciones de producción de biomasa y conidios al quinto día. Debido a este comportamiento, se estableció el séptimo día de fermentación líquida como el de mayor producción de conidios y biomasa, para su posterior uso como inóculo para la fermentación sólida, lo anterior permitió reducir el tiempo del proceso global sin afectar permitiendo la concentración inicial y calidad del inóculo.



**Figura 9.** Producción de biomasa en cultivo líquido. Fotografía tomada por Daniel López Sosa en dentro del Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan.

## 8.5 Análisis proximal

La Tabla 5 muestra el análisis proximal, en ella se observó el alto contenido de carbohidratos presentado por ambos sustratos independientemente del inductor, cabe señalar que la relación C: N tiene un papel determinante en fermentación sólida (Jaronski, 2013). El alto contenido de carbohidratos en el rastrojo de amaranto puede deberse a concentraciones elevadas de celulosa, hemicelulosa y lignina. (García-Pereyra, 2009)

**Tabla 5.** Análisis proximal de los sustratos empleados, con y sin inductor

Sustrato	Inductor (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteínas (%)	Grasas (%)	Carbohidratos (%)
Arroz	0	9.72±0.36	9.53±0.45	8.53±0.20	0.66±0.03	71.56
	5	8.53±0.19	10.04±0.65	15.86±0.10	1.03±0.04	64.54
	10	7.69±0.20	9.55±0.76	15.56±0.85	5.37±0.18	61.83
	15	6.13±0.09	8.69±0.29	16.66±0.33	1.61±0.17	66.91
Rastrojo de amaranto	0	7.25±0.15	12.29±0.14	10.54±0.31	0.96±0.06	68.96
	5	6.52±0.45	12.25±0.40	16.34±0.67	1.15±0.03	63.74
	10	6.62±0.19	11.72±0.25	16.04±0.55	10.84±0.12	54.78
	15	6.28±0.22	12.22±0.21	19.47±0.44	8.74±0.08	53.29

## 8.6 Azúcares totales asociados a glucosa

En la Tabla 6 se presenta la relación de azúcares totales asociados a glucosa para ambos sustratos con y sin inductor, se observó que dichos azúcares son entre 7 y 9 veces mayores para cada uno de los tratamientos con arroz en comparación a los obtenidos en rastrojo de amaranto, esto nuevamente puede atribuirse al alto contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina presentes en el rastrojo (García-Pereyra, 2009).

**Tabla 6.** Azúcares totales para los sustratos empleados, con y sin inductor

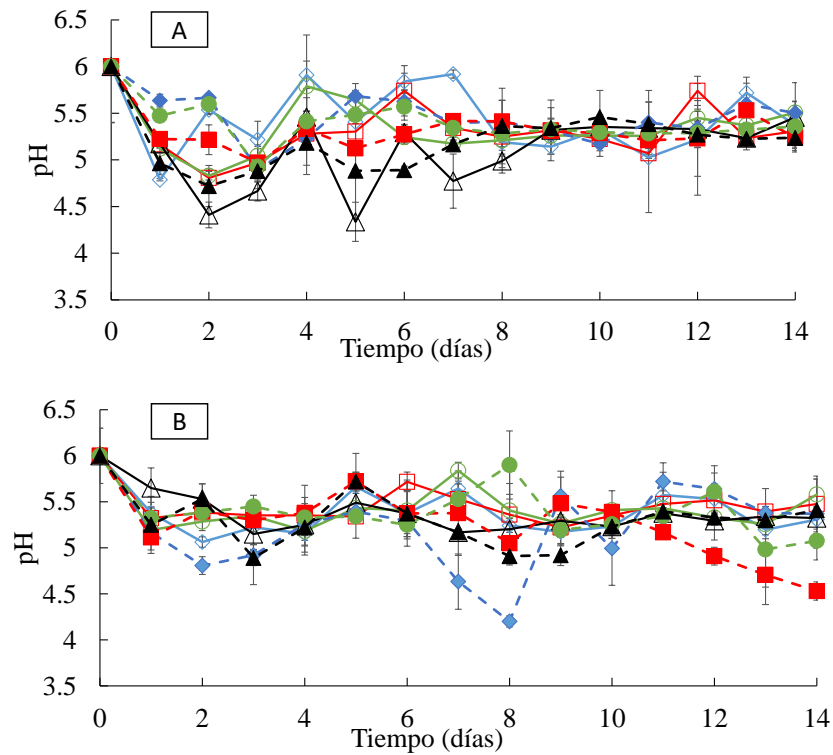
Sustrato	Inductor	Glucosa (mg/mL)
Arroz	0	9.33±0.32
	5	9.73±0.34
	10	10.14±0.71
	15	10.54±0.16
Rastrojo de amaranto	0	1.24±0.14
	5	1.02±0.17
	10	1.29±0.25
	15	0.86±0.13

## 8.7 Fermentación en medio sólido

### 8.7.1 Perfil de comportamiento del pH

La Figura 10 muestra el comportamiento del pH durante la fermentación para las cepas D y *Bb* 885.2 (control) con arroz o rastrojo de amaranto como sustratos con distintas cantidades de inductor (0, 5, 10, 15 %). Se observó que para ambas cepas con arroz/inductor como sustrato (Figura 10A) el pH descendió desde un valor inicial de  $6.04\pm 0.67$  hasta alcanzar un mínimo de  $4.31\pm 0.21$  al quinto día (mezcla 85/15 cepa D), De manera general este parámetro presentó un comportamiento irregular durante los primeros seis días del proceso, posteriormente se mantuvo prácticamente constante hasta el final de la fermentación. Cuando se empleó rastrojo de amaranto/inductor como sustrato, (Figura 10B) se observó un ligero descenso del pH desde el inicio del bioproceso, sin embargo, este no lo fue de manera constante, cabe resaltar que el pH no regreso en ningún momento de la fermentación a su valor inicial (6.0). Los valores mínimos obtenidos fueron con cepa *Bb* 885.2 para una mezcla 90/10 (rastrojo/inductor) correspondientes a  $4.2\pm 0.06$ . De manera global se observó la disminución en el valor del pH a lo largo de la fermentación independientemente de los tratamientos con ambos sustratos, lo cual puede atribuirse a diversos factores; producción de conidios a lo largo de la

fermentación, tipo de sustrato y mezcla utilizada, además de la producción de diversas enzimas hidrolíticas, entre otros.



**Figura 10.** Perfil de pH en fermentación sólida con las cepa D y Bb 885.2 como control, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A), rastrojo de amaranto (B). Bb 885.2; 100/0 (---◆---), 95/5 (---■---), 90/10 (---●---), 85/15 (---▲---). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (△).

Los resultados del análisis de varianza ( $\alpha= 0.05$ ) se muestran en la tabla 7, no se observaron diferencias significativas entre los sustratos, independientemente de la cantidad de inductor, ni entre las cepas

**Tabla 7.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre el pH.

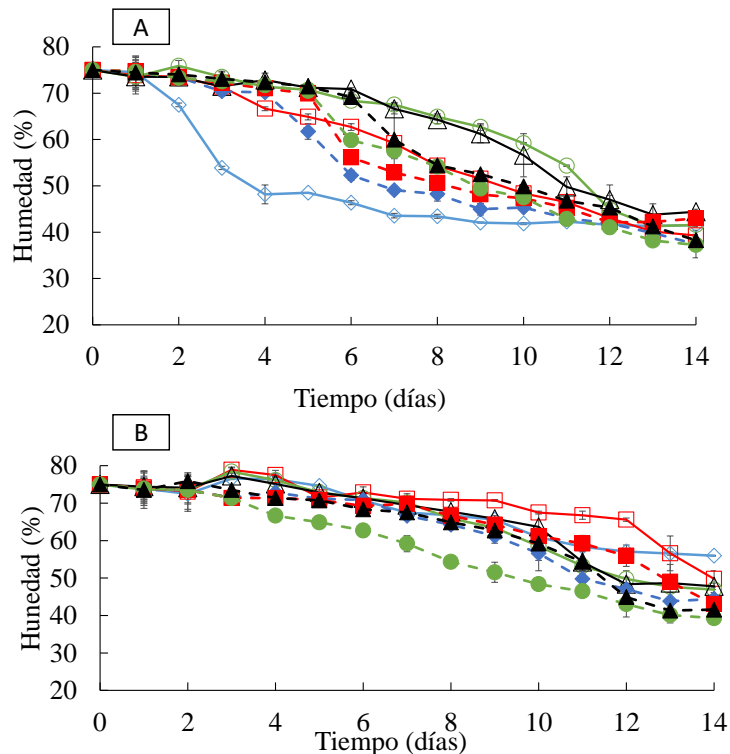
Sustrato	Inductor (%)	pH	
		Cepa D	<i>Bb 885.2</i>
Arroz	0	5.37 <sup>aA</sup>	5.50 <sup>aA</sup>
	5	5.30 <sup>aA</sup>	5.24 <sup>aA</sup>
	10	5.50 <sup>aA</sup>	5.36 <sup>aA</sup>
	15	5.46 <sup>aA</sup>	5.24 <sup>aA</sup>
Rastrojo de amaranto	0	5.37 <sup>aA</sup>	5.31 <sup>aA</sup>
	5	4.53 <sup>aA</sup>	5.48 <sup>aA</sup>
	10	5.08 <sup>aA</sup>	5.59 <sup>aA</sup>
	15	5.41 <sup>aA</sup>	5.33 <sup>aA</sup>

Prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos. Letras minúsculas indican comparación entre el nivel del inductor. Letras mayúsculas indican comparación entre cepas.

### 8.7.2 Curvas de secado

En la Figura 11 se presentan los perfiles de secado para la fermentación sólida con arroz o rastrojo de amaranto como sustratos y ambas cepas (cepa D y control) con distintas mezclas sustrato/inductor (0, 5, 10, 15%). Se observó para arroz (Figura 11A) una disminución en la humedad del soporte directamente proporcional al tiempo de fermentación, cabe resaltar que dicha disminución fue más acentuada con el sustrato sin inductor para ambas cepas, lo que se atribuyó a la pobre retención de agua por parte del arroz. Para las fermentaciones con rastrojo de amaranto como sustrato (Figura 11B) se observó una disminución en el contenido de humedad del sustrato constante y directamente proporcional al tiempo de fermentación, resaltando que la mayor velocidad de pérdida de humedad se observó

con las mezclas 90/10 (sustrato/inductor) con Bb 885.2, la cual presentó el menor contenido de humedad desde el tercer día de la fermentación. La disminución en el contenido de humedad en función del tiempo se atribuyó a la colonización completa del soporte sólido por la cepa aunado a los requerimientos fisiológicos de ésta (Mishra *et al.*, 2016)



**Figura 11.** Curvas de secado para fermentación sólida empleando las cepas D y Bb 885.2, con distintas mezclas de sustrato/inductor empleando arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb 885.2; 100/0 (---◆---), 95/5 (---■---), 90/10 (---●---), 85/15 (---▲---). Ceba D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (△).

Los resultados del análisis de varianza ( $\alpha = 0.05$ ) mostraron diferencias significativas entre ambos sustratos, siendo los tratamientos con arroz los que alcanzaron los menores valores de humedad al final de la fermentación (Tabla 8).

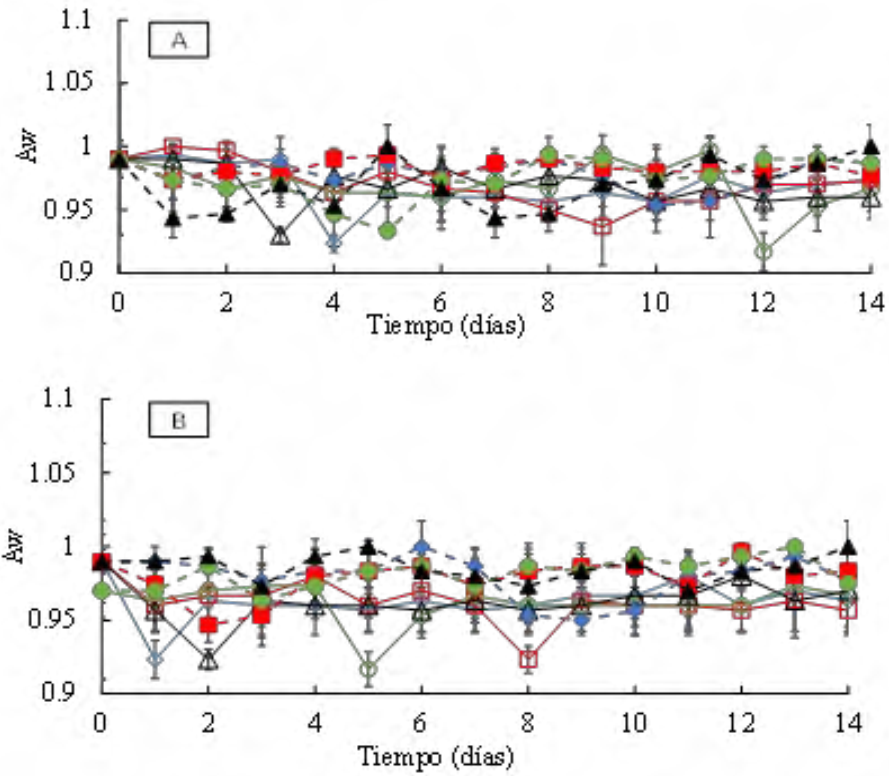
**Tabla 8.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la humedad.

Sustrato	Inductor (%)	Humedad (%)	
		Cepa D	<i>Bb</i> 885.2
Arroz	0	41.54 <sup>bA</sup>	37.43 <sup>bA</sup>
	5	39.27 <sup>cA</sup>	42.99 <sup>aA</sup>
	10	41.54 <sup>bA</sup>	37.24 <sup>bA</sup>
	15	44.42 <sup>aA</sup>	38.26 <sup>bA</sup>
Rastrojo de amaranto	0	55.96 <sup>aB</sup>	44.42 <sup>aB</sup>
	5	49.77 <sup>bB</sup>	43.04 <sup>abB</sup>
	10	46.93 <sup>bB</sup>	39.27 <sup>bB</sup>
	15	47.78 <sup>bB</sup>	41.54 <sup>cB</sup>

Empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas indican diferencias significativas. Letras minúsculas representan comparación entre el nivel del inductor. Letras mayúsculas representan comparación entre cepas.

### 8.7.3 Cinéticas de actividad de agua

En la Figura 12 se presentan los perfiles de actividad de agua ( $A_w$ ) en función del tiempo (d) para las fermentaciones sólidas las cepas D y *Bb* 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, se observaron valores mínimos de 0.93 para la cepa D y la mezcla 90/10 arroz/inductor (Figura 12A), lo cual no afectó el crecimiento del hongo (Arnau-Sala *et al.*, 2019). En fermentaciones con rastrojo de amaranto/inductor (Figura 12B) se presentó un comportamiento similar, sin embargo, el valor alcanzado fue de 0.91 para la mezcla con 10% de inductor con la cepa D, esto se atribuyó a que el rastrojo de amaranto tiene un alto contenido de carbohidratos complejos, los cuales pueden tener un efecto adverso sobre éste, no se observaron diferencias significativas entre sustratos ni inductor, solo entre cepas (Tabla 9).



**Figura 12.** Cinética de actividad de agua en fermentación sólida con las cepas D y Bb885.2, utilizando mezclas de sustrato/inductor para arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb885.2; 100/0 (◆-), 95/5 (-■-), 90/10 (-●-), 85/15(-▲-). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (△).

**Tabla 9.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad de agua.

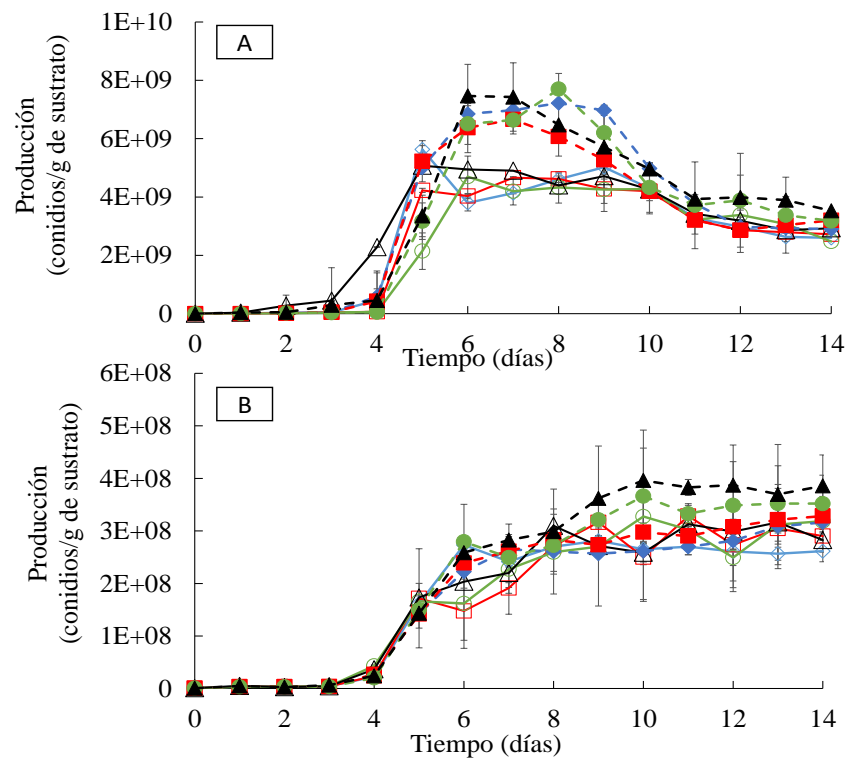
Sustrato	Inductor (%)	Actividad de agua	
		Cepa D	<i>Bb 885.2</i>
Arroz	0	0.97 <sup>aB</sup>	0.98 <sup>aA</sup>
	5	0.97 <sup>aB</sup>	0.98 <sup>aA</sup>
	10	0.96 <sup>aB</sup>	0.98 <sup>aA</sup>
	15	0.96 <sup>aB</sup>	1.00 <sup>aA</sup>
Rastrojo de amaranto	0	0.96 <sup>aB</sup>	0.98 <sup>aA</sup>
	5	0.95 <sup>aB</sup>	0.98 <sup>aA</sup>
	10	0.96 <sup>aB</sup>	0.98 <sup>aA</sup>
	15	0.97 <sup>aB</sup>	1.00 <sup>aA</sup>

Empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos. Letras minúsculas indican tratamientos con diferente nivel de inductor. Letras mayúsculas se refieren a diferentes cepas.

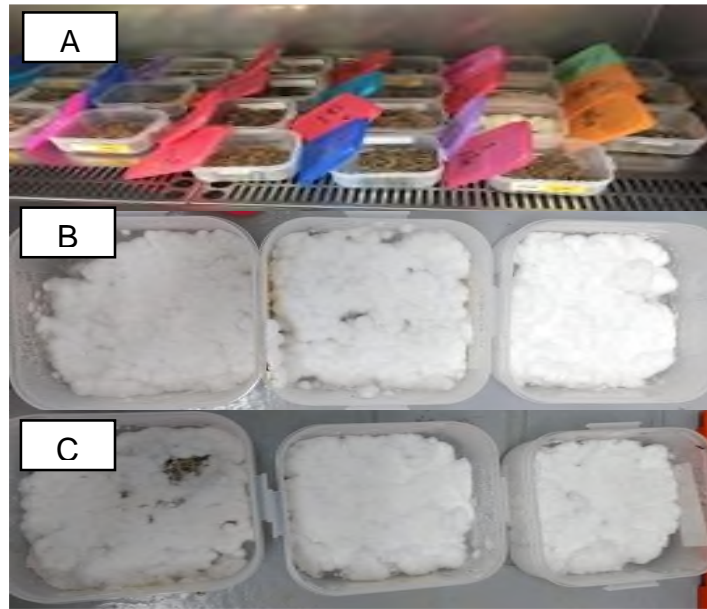
#### 8.7.4 Producción de conidios

La Figura 13 presenta la producción de conidios en función del tiempo por fermentación sólida para las cepas D y *Bb 885.2*, empleando mezclas de sustrato/inductor. De manera general, se observaron perfiles de crecimiento similares, independientemente de la cepa y nivel de inductor, la fase exponencial comenzó a partir del tercer día, durando hasta el sexto día cuando comenzó la estacionaria que duró hasta el décimo día, disminuyendo de manera gradual hasta el final de la fermentación con arroz/inductor, (Figura 13A), la máxima de producción para este tratamiento se alcanzó al octavo día con la cepa *Bb 885.2* y la mezcla 90/10 ( $7.70 \times 10^9 \pm 4.75 \times 10^8$  conidios/g de mezcla). La Figura 13B muestra el perfil de producción para las mezclas de rastrojo de amaranto/inductor, en ella se observó un comportamiento similar al tratamiento anterior, donde la fase exponencial comenzó al tercer día de fermentación manteniéndose prácticamente, durante todo

el proceso, no obstante, la máxima producción alcanzada fue con la mezcla 85/15 y la cepa Bb 885.2 y cuyo valor fue 16 veces menor con respecto al obtenido en el tratamiento anterior con la mezcla 90/10; esto se atribuyó a la concentración de carbohidratos simples presentes en cada sustrato, para el arroz estos fueron 7.5 veces en mayor concentración que en rastrojo de amaranto, lo que soportó un mayor crecimiento su asimilación es más rápida. La Figura 14 se muestran las fermentaciones en estado sólido, se observa la colonización completa de *Beauveria bassiana* empleando arroz (Figura14B) y rastrojo de amaranto (Figura 14C).



**Figura 13.** Producción de conidios por fermentación sólida con las cepas D y Bb 885.2 utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb885.2; 100/0 (- -♦- -), 95/5 (- -■- -), 90/10 (- -●- -), 85/15(- -▲- -). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (Δ).



**Figura 14.** Producción de conidios por fermentación sólida. A) Etapa inicial. B) Producción empleando arroz como sustrato al 8avo día de la fermentación. C) Producción empleando rastrojo de amaranto como sustrato al 8avo día de la fermentación. Fotografía tomada por Daniel López Sosa dentro del laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan.

El análisis de varianza ( $\alpha= 0.05$ ) no mostro diferencias significativas para el uso de inductor, independientemente del sustrato empleado, sin embargo, el sustrato sí mostro diferencias significativas sobre la producción de conidios (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la producción de conidios.

Sustrato	Inductor (%)	Conidios/g sustrato	
		Cepa D	Bb 885.2
Arroz	0	2.60E+09 <sup>aA</sup>	2.90E+09 <sup>aA</sup>
	5	2.73E+09 <sup>aA</sup>	3.20E+09 <sup>aA</sup>
	10	2.48E+09 <sup>aA</sup>	3.18E+09 <sup>aA</sup>
	15	2.93E+09 <sup>aA</sup>	3.53E+09 <sup>aA</sup>
Rastrojo de amaranto	0	2.62E+08 <sup>aB</sup>	3.16E+08 <sup>aB</sup>
	5	2.90E+08 <sup>aB</sup>	3.28E+08 <sup>aB</sup>
	10	3.19E+08 <sup>aB</sup>	3.52E+08 <sup>aB</sup>
	15	2.83E+08 <sup>aB</sup>	3.86E+08 <sup>aB</sup>

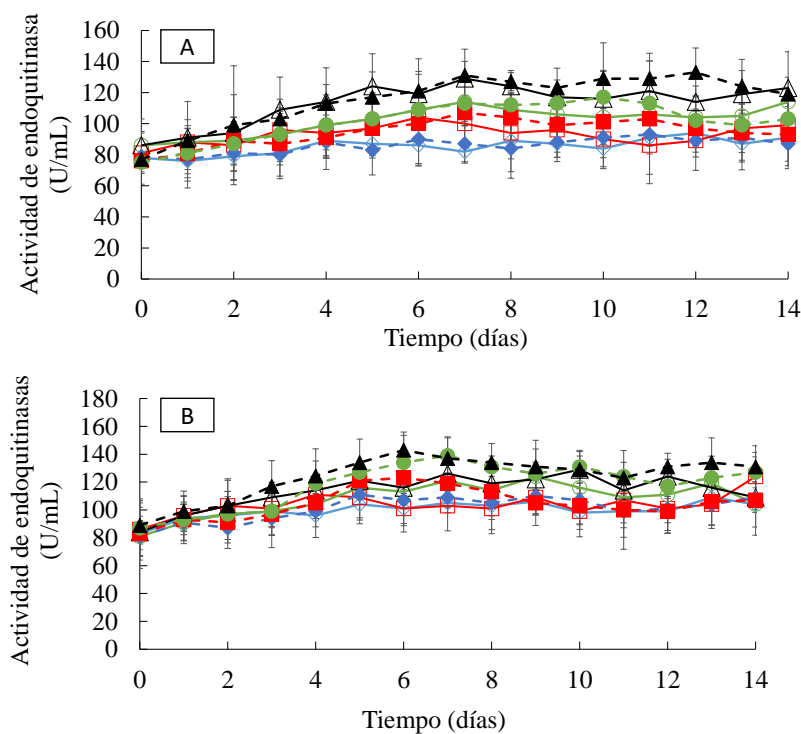
Letras minúsculas indican efecto del nivel del inductor. Letras mayúsculas indican comparación entre cepas. Empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas representan diferencias significativas.

## 8.7.5 Actividades enzimáticas

### 8.7.5.1 Determinación de la Actividad de endoquitinasas

En La Figura 15 se presenta la actividad de endoquitinasa en función del tiempo en fermentación sólida para ambos sustratos (arroz y rastrojo de amaranto) con las cepas D y Bb 885.2, en la Figura 15A se presentan los perfiles de actividad de enzimática empleando mezclas de arroz e inductor en distintas proporciones para ambas cepas, se observó un incremento gradual en función del tiempo en la actividad de las endoquitinasas, resaltando que dicha actividad se vio favorecida por la presencia del inductor para ambas cepas. Empleando mezclas de rastrojo de amaranto/inductor como sustrato (Figura 15B), se observó un incremento constante

de la actividad enzimática en función del tiempo, obteniendo los mayores títulos en los tratamientos con una concentración de inductor más elevada, lo que implicaría que la cantidad de inductor presente en el sustrato influiría de manera positiva sobre la actividad de estas enzimas, concordando con lo descrito por Jiménez-Alejandro, (2016) quien reportó que el nivel de inducción es un factor importante para la producción de quitinasas. En un trabajo previo (Lopez-Sosa, 2018) se estudió el efecto de *T. molitor* como inductor sobre la producción de endoquitinasas, se reportó que la producción de endoquitinasas se vio influenciada de manera directa por el porcentaje de inductor presente en el sustrato, resultado que concuerda con lo reportado en este trabajo.



**Figura 15. Cuantificación de la Actividad de endoquitinasas por fermentación sólida para las cepas D y Bb 885.2, empleando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb 885.; 100/0 (---◇---), 95/5 (---□---), 90/10 (---○---), 85/15(---▲---). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (▲).**

El análisis de comparación de medias empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha=0.05$ ), mostró que el mejor tratamiento para la producción de endoquitinasas fue con rastrojo amaranto como sustrato y Bb 885.2,

independientemente del porcentaje de inductor presente, los únicos tratamientos que mostraron diferencias significativas con respecto al resto, el nivel de inductor mostró un efecto significativo empleando arroz y la cepa D (Tabla 11).

**Tabla 11.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad de endoquitinasas.

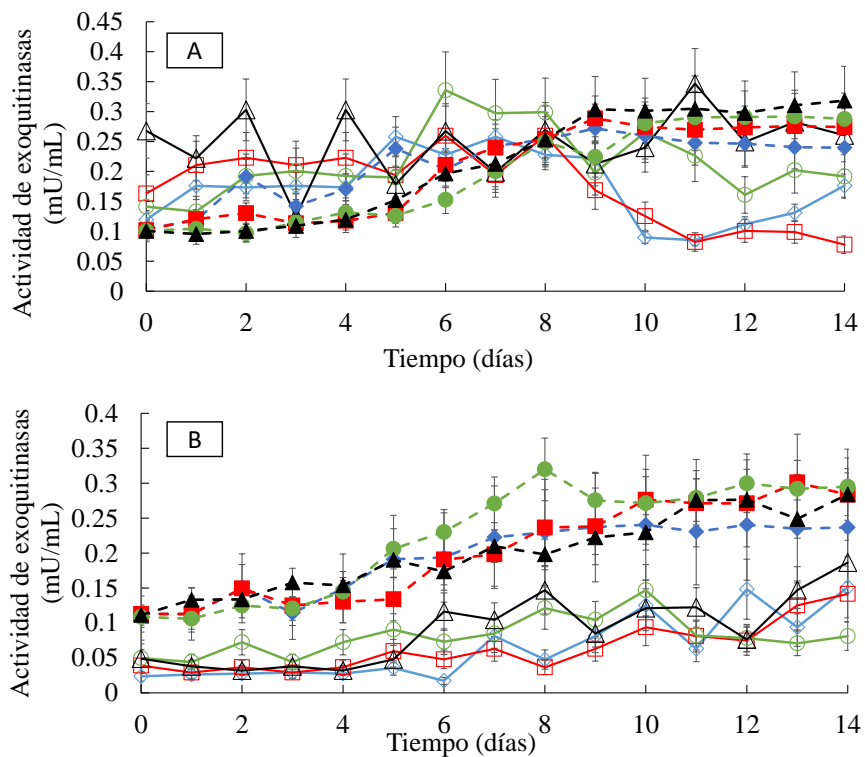
Sustrato	Inductor (%)	Endoquitinasas (U/mL)	
		Cepa D	Bb 885.2
Arroz	0	91.03 <sup>bB</sup>	87.98 <sup>bAB</sup>
	5	99.14 <sup>abB</sup>	93.72 <sup>abAB</sup>
	10	114.91 <sup>abB</sup>	103.44 <sup>abAB</sup>
	15	123.19 <sup>aB</sup>	119.15 <sup>aAB</sup>
Rastrojo de amaranto	0	104.11 <sup>aAB</sup>	109.17 <sup>aA</sup>
	5	124.3 <sup>aAB</sup>	107.91 <sup>aA</sup>
	10	104.92 <sup>aAB</sup>	127.91 <sup>aA</sup>
	15	109.38 <sup>aAB</sup>	131.19 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas representan el efecto del nivel del inductor. Letras mayúsculas son para la comparativa entre cepas. Empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas representan diferencias significativas.

### 8.7.5.2 Determinación de la actividad de exoquitinasas

En la Figura 16 se presenta la actividad de exoquitinasas para la fermentación sólida en función del tiempo. La determinación de esta actividad para mezclas de arroz/inductor con las cepas D y Bb885.2 (Figura 16A). En ella se observó que la actividad de estas enzimas se incrementó gradualmente en función del tiempo a lo largo de la fermentación hasta el octavo día manteniéndose prácticamente constante hasta el final de la misma. En contraste los perfiles mostrados por la cepa D para las mezclas 100/0 y 95/15 a partir del octavo día descendieron acentuadamente hasta el onceavo, posteriormente, la mezcla sin inductor mostró un repunte que se mantuvo hasta el final de la fermentación. En el caso de las

mezclas rastrojo de amaranto/inductor (Figura 16B), se observaron para ambas cepas perfiles crecientes con el tiempo, sin embargo, los tratamientos con Bb 885.2 presentaron mayores títulos de actividad enzimática. Elawati *et al.*, (2019), concluyeron que la producción de quitinasas estuvo de manera general asociada a la producción de conidios de *Beauveria bassiana*, lo cual se confirmó al comparar las Figuras 16B con la Figura 13B en ambas los perfiles de actividad exoquitinasa y producción de conidios mostraron perfiles semejantes comparados según su cepa correspondiente.



**Figura 16.** Determinación de la Actividad de exoquitinasas en fermentación sólida para las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb 885.2; 100/0 (-◆-), 95/5 (-◻-), 90/10 (-◊-), 85/15(-▲-). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (◻), 90/10 (◊), 85/15 (Δ).

Un análisis de varianza con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 (Tabla 12), determinó que; existieron diferencias significativas para el inductor independientemente de la cepa y el sustrato en la producción de exoquitinasas. No se encontraron diferencias significativas entre sustratos, pero si entre cepas.

*Beauveria bassiana* 885.2 obtuvo las mayores actividades de endoquitinasas, lo cual se atribuyó a las características de esta cepa; ya que fue mutada aleatoriamente teniendo como característica principal una mayor velocidad de conidiación y mayor producción de enzimas hidrolíticas (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2004).

**Tabla 12.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad de exoquitinasas al final de la fermentación.

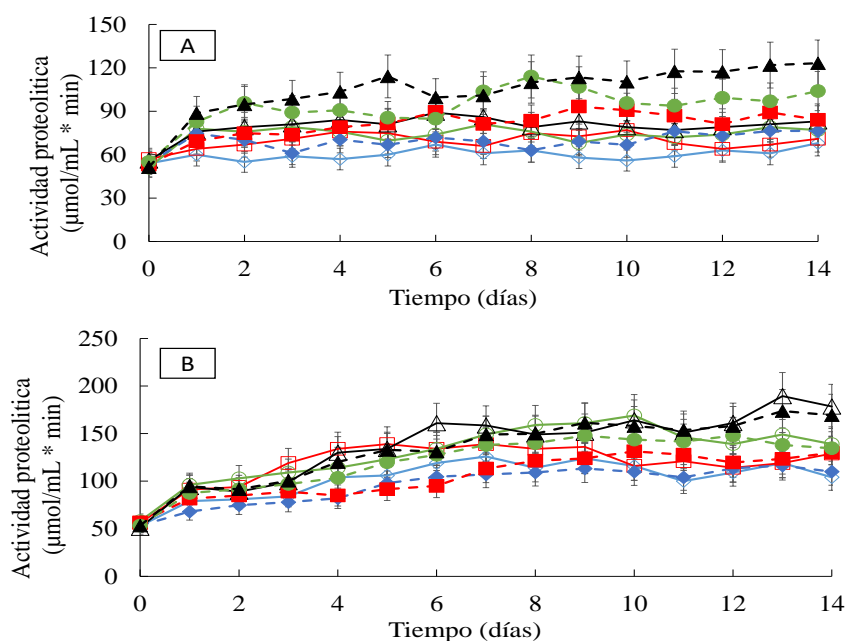
Sustrato	Inductor (%)	Exoquitinasas (mU/mL)	
		Cepa D	<i>Bb</i> 885.2
Arroz	0	0.17 <sup>bB</sup>	0.24 <sup>bA</sup>
	5	0.077 <sup>cB</sup>	0.27 <sup>abA</sup>
	10	0.19 <sup>bB</sup>	0.28 <sup>abA</sup>
	15	0.26 <sup>bB</sup>	0.31 <sup>aA</sup>
Rastrojo de amaranto	0	0.15 <sup>abB</sup>	0.23 <sup>aA</sup>
	5	0.14 <sup>bB</sup>	0.28 <sup>aA</sup>
	10	0.08 <sup>cB</sup>	0.29 <sup>aA</sup>
	15	0.18 <sup>aB</sup>	0.28 <sup>aA</sup>

La prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas representan diferencias significativas. Letras minúsculas refieren comparativa entre los niveles del inductor. Letras mayúsculas indican comparaciones entre cepas.

### 8.7.5.3 Cuantificación de la actividad proteolítica

La Figura 17 presenta el perfil de la actividad proteolítica en función del tiempo para fermentación sólida empleando mezclas de sustrato/inductor con distintos porcentajes de inductor con las cepas D y *Bb* 885.2. Para las fermentaciones con mezclas de arroz e inductor (Figura 17A) se observó que el perfil de la actividad enzimática se incrementó de manera gradual en función del tiempo de fermentación, el porcentaje del inductor tuvo un efecto positivo sobre esta actividad enzimática,

los mayores títulos se obtuvieron con 15% de inductor y *Beauveria bassiana* 885. En contraste la menor actividad se obtuvo con los tratamientos sin inductor y la cepa D. Los tratamientos con rastrojo de amaranto e inductor (Figura 17B) tuvieron un perfil semejante, siendo los valores más elevados los obtenidos con los tratamientos con 15% de inductor para ambas cepas y los menores con los tratamientos sin inductor. De manera general la mayor actividad proteolítica se obtuvo en los tratamientos con rastrojo de amaranto, esto puede deberse a que dicho sustrato representa una fuente de nutrientes menos accesible para la asimilación del entomopatógeno en comparación con arroz. Comparando estos resultados con un trabajo previo (López-Sosa, 2018) donde se reportó una mayor actividad proteolítica con salvado de trigo, un sustrato complejo, esto se debe al estrés que provoca en los microorganismos para generar mayor cantidad de enzimas proteolíticas para asimilar con mayor facilidad los nutrientes del sustrato. Así mismo es posible observar un incremento de esta actividad en función del porcentaje de inductor presente en cada mezcla.



**Figura 17. Cuantificación de la Actividad proteolítica en fermentación sólida para las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb 885.2; 100/0 (---◇---), 95/5 (---□---), 90/10 (---○---), 85/15(---△---). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (△).**

Se realizó un análisis comparativo de medias empleando la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% (Tabla 13). No existieron diferencias significativas entre sustratos ni cepas, pero si entre el porcentaje de inductor.

**Tabla 13.** Análisis de varianza del efecto del inductor sobre la actividad proteolítica.

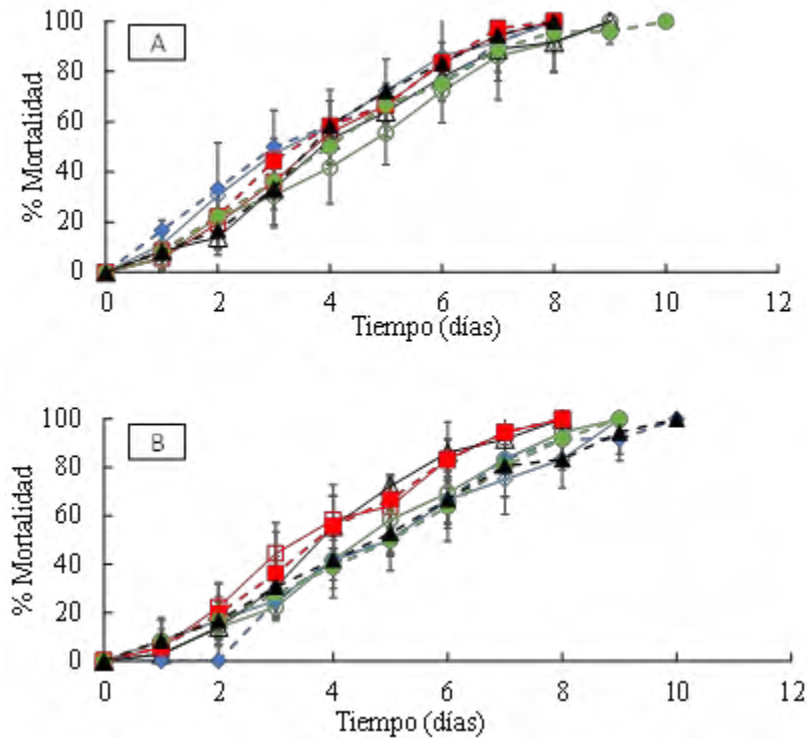
Sustrato	Inductor (%)	Act. Proteolítica ( $\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min}$ )	
		Cepa D	<i>Bb 885.2</i>
Arroz	0	68.29 <sup>aB</sup>	76.40 <sup>cB</sup>
	5	71.93 <sup>aB</sup>	84.14 <sup>bcB</sup>
	10	77.74 <sup>aB</sup>	103.98 <sup>abB</sup>
	15	83.58 <sup>aB</sup>	123.18 <sup>aB</sup>
Rastrojo de amaranto	0	104.01 <sup>bA</sup>	109.97 <sup>bA</sup>
	5	129.18 <sup>bA</sup>	129.87 <sup>bA</sup>
	10	139.83 <sup>bA</sup>	134.54 <sup>abA</sup>
	15	178.55 <sup>aA</sup>	169.27 <sup>aA</sup>

Empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas corresponden a diferencias significativas. Letras minúsculas representan comparación entre el porcentaje del inductor. Letras mayúsculas indican comparación entre cepas.

### 8.7.6 Bioensayos

En la Figura 18 se presenta el porcentaje de mortalidad para los conidios de ambas cepas obtenidos por fermentación bifásica en función del tiempo. Para las mezclas arroz/inductor (Figura 18A) se observó que los tratamientos con 10 % de inductor para ambas cepas mostraron los mayores tiempos de bioensayo para alcanzar el 100 % de mortalidad (10 d) junto con los tratamientos con 15 % de inductor con la cepa D. El menor tiempo en el cual se alcanzó el 100% de mortalidad fue de 8 días con el resto de los tratamientos empleando arroz como sustrato empleando la cepa D. Para los tratamientos con mezclas de rastrojo de amaranto/inductor como sustrato (Figura 18B) resaltaron los valores obtenidos con las mezclas relaciones 95/5 para

ambas cepas, para la cepa D los valores obtenidos con las mezclas 85/15, todas ellas alcanzaron el 100% de mortalidad al octavo día del bioensayo. Cabe resaltar, que independientemente del sustrato el 100 % de mortalidad se alcanzó a los 8 días para todas las mezclas óptimas.



**Figura 18.** Porcentaje de mortalidad en función del tiempo de los conidios producidos por fermentación bifásica con las cepas D y Bb 885., utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Bb 885.2; 100/0 (-♦-♦-), 95/5 (-■-■-), 90/10 (-●-●-), 85/15(-▲-▲-). Cepa D 100/0 (◇),95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (Δ).

### 8.7.7 Tiempo Letal 50

En la Tabla 14 se presentan los valores para el Tiempo letal 50, la mayor virulencia (menor TL50) se presentó con Bb 885.2 empleando la mezcla arroz/inductor 95/5 ( $2.92 \pm 0.24$  d), comparado con lo reportado por López-Sosa, (2018) quien realizó bioensayos con una cepa de *Beauveria bassiana* encontrando un Tiempo Letal 50 de 6.43 días, en fermentaciones bifásicas utilizando maíz quebrado como sustrato sólido, empleando la cepa de *Beauveria bassiana* 885.2 (Bb 885.2), valor que fue 2.07 veces mayor al obtenido en este trabajo, lo que puede atribuirse a el tiempo de

cosecha para los conidios provenientes de la fermentación líquida, en este trabajo fueron a los 14 y el previo a los 7 días, esta variación sobre la virulencia se puede atribuir a que a los 14 días de fermentación líquida los conidios de *Beauveria bassiana* se encuentran sometidos a un estrés por falta de nutrientes lo que resultaría en una mayor agresividad durante los bioensayos.

Se realizó un análisis de varianza empleando la prueba Tukey con un nivel de confianza del 95% (Tabla 14), no existieron diferencias significativas entre los sustratos ni entre cepas, sin embargo, sí se observaron con los tratamientos con arroz sin inductor para la cepa D. Esto puede deberse a la rápida capacidad de colonización de esta cepa, aunado a que dicho sustrato muestra una ventaja para su crecimiento con respecto al rastrojo de amaranto, ya que este último presentó una mayor dificultad para la asimilación de carbohidratos (Figura 13).

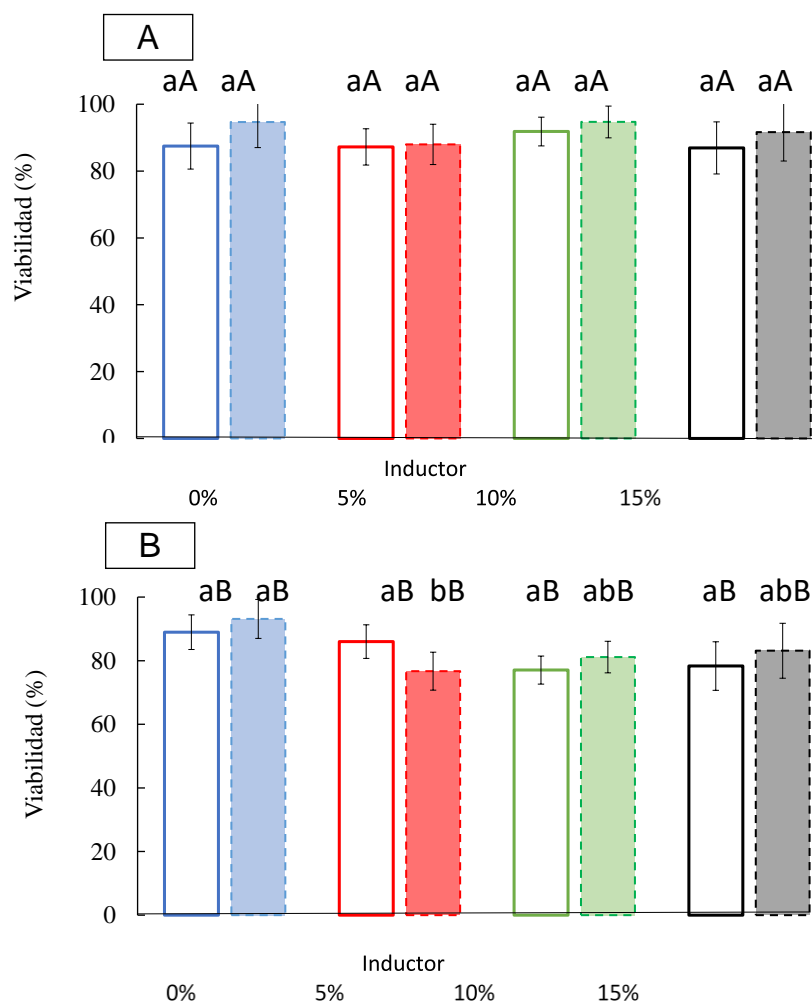
**Tabla 14.** Tiempo Letal 50 de los conidios producidos mediante fermentación bifásica con las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor.

Sustrato	Inductor (%)	Tiempo Letal 50 (Días)	
		Cepa D	Bb 885.2
Arroz	0	3.10±0.23 <sup>bA</sup>	3.02±0.27 <sup>aA</sup>
	5	3.51±0.13 <sup>aA</sup>	2.92±0.24 <sup>aA</sup>
	10	3.82±0.18 <sup>aA</sup>	3.20±0.31 <sup>aA</sup>
	15	3.79±0.63 <sup>aA</sup>	3.07±0.18 <sup>aA</sup>
Rastrojo de amaranto	0	3.94±0.31 <sup>aA</sup>	3.80±0.41 <sup>aA</sup>
	5	3.14±0.26 <sup>aA</sup>	3.15±0.23 <sup>aA</sup>
	10	4.04±0.17 <sup>aA</sup>	3.80±0.34 <sup>abA</sup>
	15	3.59±0.39 <sup>aA</sup>	3.69±0.19 <sup>abA</sup>

Empleando la prueba de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05. Letras distintas corresponden a diferencias significativas. Letras minúsculas representan comparación entre el porcentaje del inductor. Letras mayúsculas indican comparación entre cepas.

### 8.7.8 Viabilidad

En la Figura 18 se muestra la viabilidad alcanzada por las cepas al final de las fermentaciones bifásicas. La Figura 18A presenta la viabilidad obtenida para las mezclas arroz/inductor con ambas cepas (D y Bb 885.2). En la Figura 18B se observan los resultados de viabilidad obtenidos con las mezclas de rastrojo de amaranto/Inductor. Se observó que la mezcla con 10% de inductor, tuvo el valor de viabilidad menor para todos los tratamientos ( $77.34 \pm 7.67\%$ ) sin embargo es aceptables para la producción masiva (Núñez-Gaona, 2009). Al realizar un análisis de varianza con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05, no se observaron diferencias significativas entre las cepas ni el nivel de inductor, sin embargo, sí entre los sustratos (Figura 18 A y B). Los resultados sugieren que los conidios producidos con cualquiera de los tratamientos empleados, presentan una viabilidad adecuada para su producción masiva, cuyo valor debe de estar cercano al 80% (Arcas *et al.*, 1999; Grimm, 2001; Batta, 2007; Núñez-Gaona, 2009; López-Sosa *et al.*, 2018).

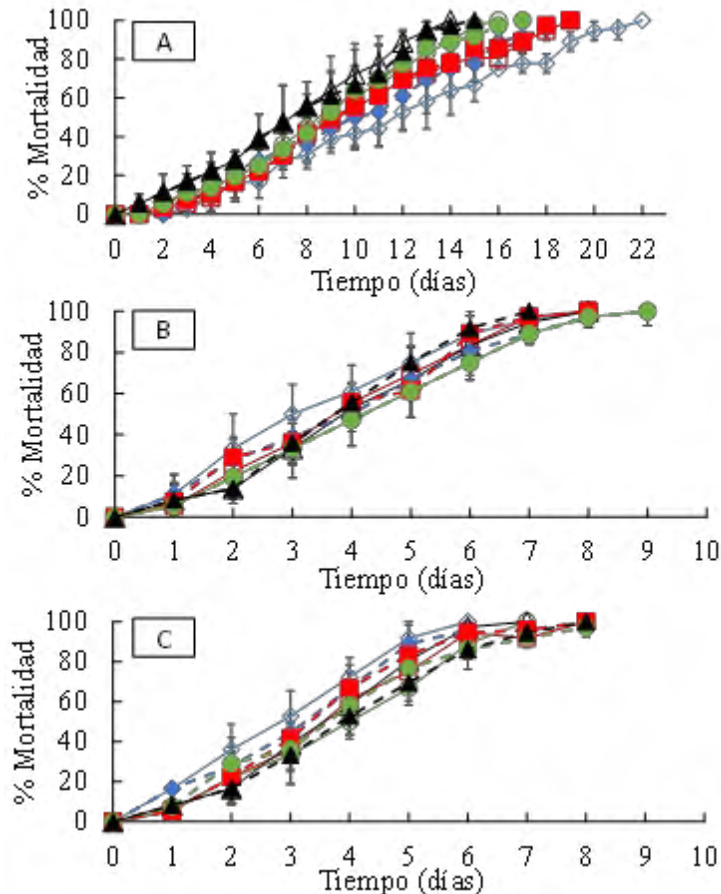


**Figura 18.** Viabilidad de los conidios producidos por fermentación bifásica con las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, Arroz (A) y rastroyo de amaranto (B). Líneas continuas y tramas vacías “Cepa D”, líneas punteadas y tramas rellenas “Bb 885.2”. Letras distintas representan diferencias significativas. Letras minúsculas corresponden a comparaciones entre el porcentaje del inductor. Letras mayúsculas indican comparaciones entre cepas.

### 8.7.9 Dosis Letal

En la Figura 19 se presentan los resultados de los bioensayos con distintas concentraciones ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  Conidios/mL) empleando mezclas de arroz/inductor como sustrato para ambas cepas (D y Bb 885.2). Las cepas tuvieron perfiles semejantes, sin embargo, para las concentraciones menores el 100 % de mortalidad se alcanzó en un mayor tiempo (15-22 días) (Figura 19A). Para las otras concentraciones los tiempos en que se alcanza el 100% de mortalidad se

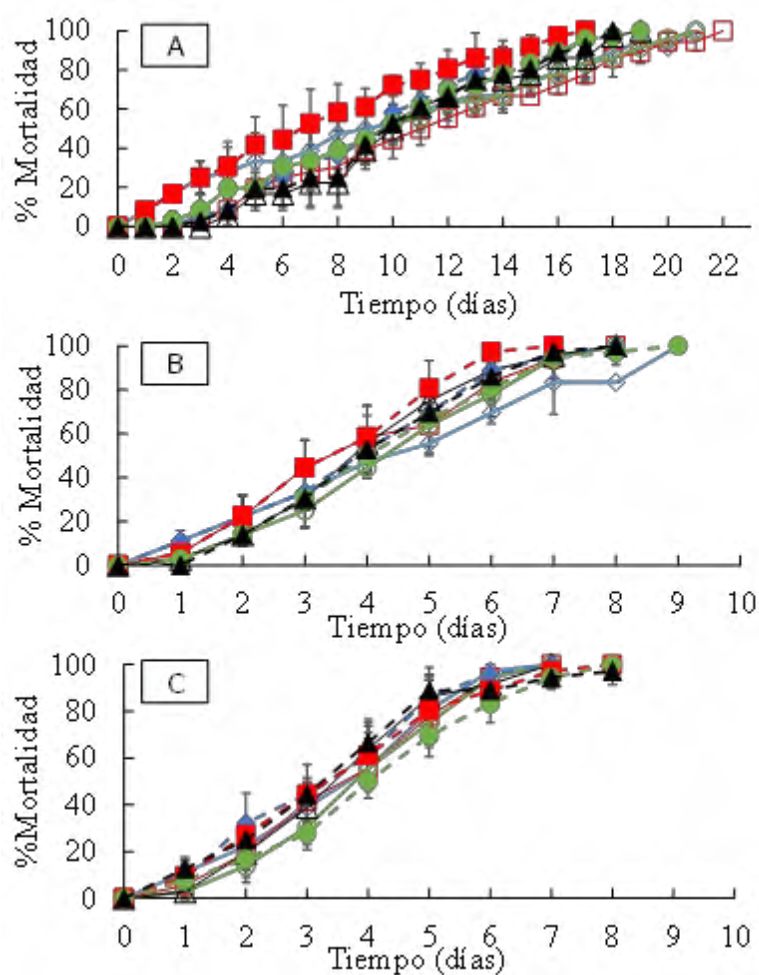
encuentran entre los 7 y 10 días respectivamente (Figuras 19B y 19C), lo que sugiere que la concentración óptima para los bioensayos corresponde a  $1 \times 10^8$  conidios/mL.



**Figura 19.** Porcentaje de mortalidad de los conidios producidos en arroz por fermentación bifásica con las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor y varias concentraciones de conidios.  $1 \times 10^7$  conidios/mL (A).  $1 \times 10^8$  conidios/mL (B) y  $1 \times 10^9$  conidios/mL (C). Bb 885.2; 100/0 (---◆---), 95/5 (---■---), 90/10 (---●---), 85/15 (---▲---). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (△).

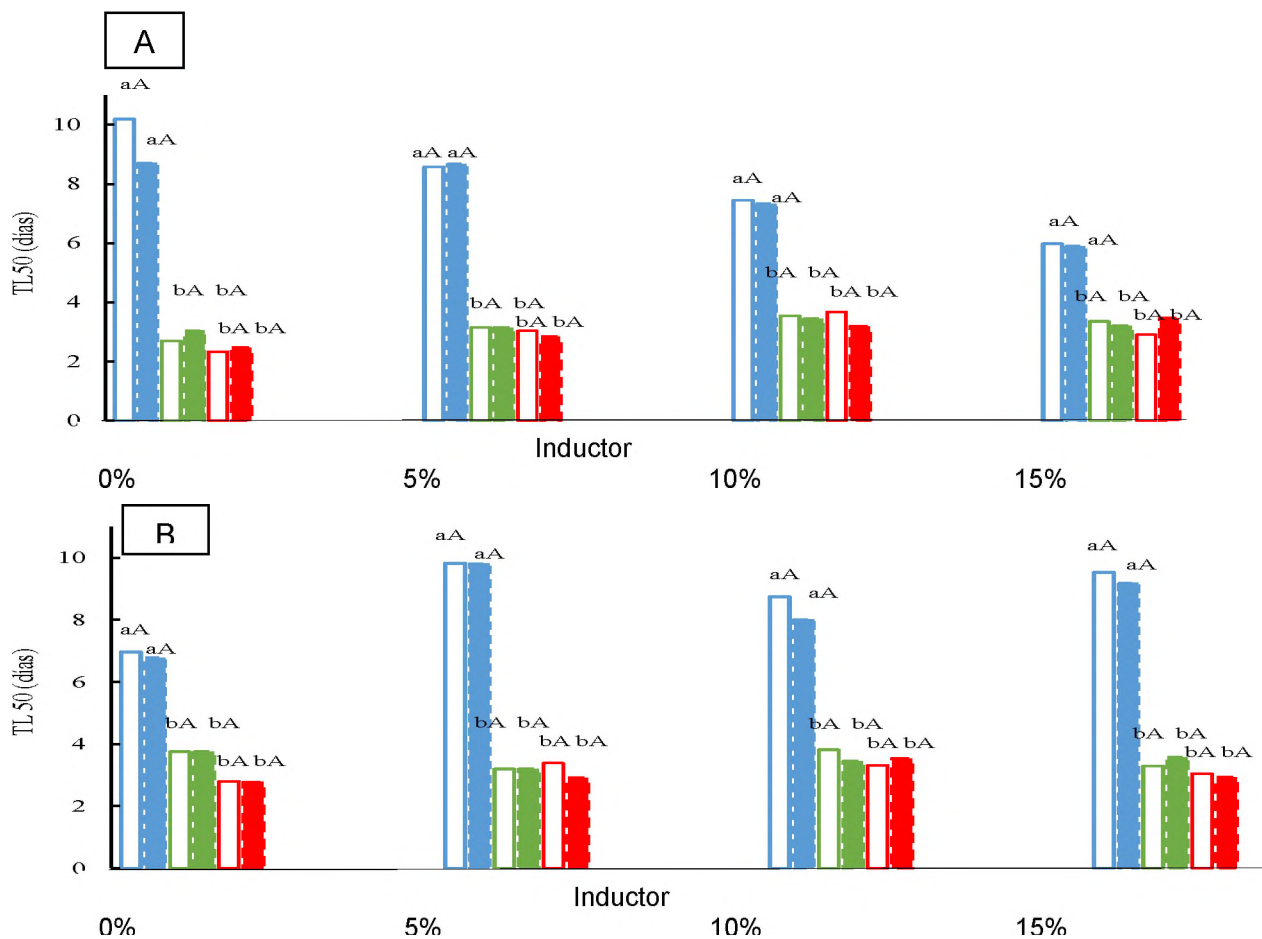
Para el caso de mezclas de rastrojo de amaranto/inductor con las mismas concentraciones de conidios (Figura 20) con ambas cepas (Bb 885.2 y cepa D). En la Figura 20A se muestran los resultados obtenidos para concentraciones de  $1 \times 10^7$  conidios/mL con ellas se alcanzaron valores del 100% de mortalidad entre los 18 y 22 días en ambas cepas, lo que contrastó con los tiempos para el resto de

concentraciones,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidios/mL (Figura 20B y 20C respectivamente) con las que valor de 100% de mortalidad se alcanzó entro los días 7 y 9 respectivamente. Estos últimos resultados, fueron similares a los obtenidos con las mismas con las mismas concentraciones y mezclas de arroz/inductor, lo que sugirió que el sustrato no tiene efecto sobre el % de mortalidad, mientras que la concentración de conidios si lo tiene. La concentración óptima de conidios para realizar los bioensayos fue de  $1 \times 10^8$  conidios/mL.



**Figura 20.** Porcentaje de mortalidad de los conidios producidos en rastrojo de amaranto por fermentación bifásica con las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor y distintas concentraciones de conidios.  $1 \times 10^7$  conidios/mL (A).  $1 \times 10^8$  conidios/mL (B) y  $1 \times 10^9$  conidios/mL (C). Bb 885.2; 100/0 (-◆-), 95/5 (-■-), 90/10 (-●-), 85/15 (-▲-). Cepa D 100/0 (◇), 95/5 (□), 90/10 (○), 85/15 (Δ).

Comparando el Tiempo Letal 50 y las diferentes concentración de conidios (Figura 21), para los conidios producidos en mezclas de arroz/inductor (Figura 21A) y rastrojo de amaranto/inductor (Figura 21B), no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de inductor, pero sí entre concentraciones, siendo las concentraciones de  $1 \times 10^7$  conidios/mL las que presentaron un mayor Tiempo Letal 50 para todos los tratamientos, sin embargo, las concentraciones de  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  conidios/mL no presentaron diferencias significativas entre sí, para todos los tratamientos. La concentración óptima con la mejor relación Tiempo Letal 50: Dosis Letal, corresponde a  $1 \times 10^8$  conidios/mL.



**Figura 21.** Comparación entre el Tiempo letal 50 y dosis letal de los conidios producidos mediante fermentación bifásica con las cepas D y Bb 885.2, utilizando distintas mezclas de sustrato/inductor, arroz (A) y rastrojo de amaranto (B). Líneas continuas y tramas vacías “Cepa D”, líneas punteadas y tramas rellenas “Bb 885.2”. Colores azules, concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, colores verdes, concentración de  $1 \times 10^8$  conidios/mL, colores rojos, concentración de  $1 \times 10^9$  conidios/mL. Letras distintas representan diferencias significativas. Letras mayúsculas indican comparación entre porcentajes del inductor. Letras minúsculas refieren comparación entre concentraciones de conidios.

## 9. CONCLUSIONES

El análisis filogenético realizado permitió caracterizar a nivel género y especie distintos aislados de la comunidad de Rancho Grande, Valle Nacional, Oaxaca, destacando el aislado D, identificado como *Beauveria bassiana*, ya que es un hongo entomopatógeno ampliamente estudiado y empleado para control biológico.

El uso de *Tenebrio molitor* como inductor no afecta de manera significativa la producción de conidios de *Beauveria bassiana*, en fermentación sólida empleando arroz y rastrojo de amaranto como sustrato.

Los conidios de *Beauveria bassiana* producidos mediante fermentación sólida empleando rastrojo de amaranto y arroz como sustrato presentaron virulencias similares.

El rastrojo de amaranto como sustrato en fermentación sólida produce un menor nivel de conidios en comparación con los producidos en arroz, resaltando que presentaron valores de virulencia y viabilidad aceptables para la producción masiva.

Independientemente del sustrato y el nivel de inductor empleado, la Dosis Letal más eficiente fue la correspondiente a  $10^8$  conidios/mL.

## 10. CONTRIBUCIONES Y PERSPECTIVAS

### **Contribuciones**

Este trabajo contribuyó con el aislamiento e identificación de una cepa de *Beauveria bassiana* con la capacidad de ser empleada para la producción de bioinsecticidas.

Este trabajo sirve como antecedente para el uso del rastrojo de amaranto como sustrato en fermentación sólida, para la producción de conidios de *Beauveria bassiana*. A su vez proporciona el conocimiento de algunos parámetros para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* mediante fermentación bifásica, empleando dicho sustrato.

También proporcionó el conocimiento del efecto de emplear *Tenebrio molitor* como inductor de virulencia de los conidios producidos de *Beauveria bassiana* empleando rastrojo de amaranto como sustrato.

## **Perspectivas**

Realizar un estudio en donde se involucren diversos pretratamientos del rastrojo de amaranto para emplearlo como sustrato, con la finalidad de elevar la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación sólida.

Estudiar la correlación enzimática de la cepa aislada de *Beauveria bassiana* con su virulencia y patogenicidad, debido a que no se ha descrito con exactitud dicha correlación.

## 11. REFERENCIAS

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*. Vol. 73: 332-338.

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. Pp. 6-22

Arakane Y, Muthukrishnan S. 2009. Insect chitinase and chitinase-like proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(2): 201-2016.

Arcas, J. A.; Díaz, B. M., Lecuona, R. E. 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology* 67: 151-158.

Arnáiz, C.; Isac, L.; Lebrato, J. 2009. Determinación de biomasa en procesos biológicos. Grupo de tratamiento de aguas residuales. *Tecnología del agua* 205: 45:52.

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.

Arnau-Sala, Raquel-Barrena, Adriana-Artola y Antoni-Sánchez. 2019. Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. Critical Reviews in Environmental Science and Technology.1547-1597.

Arzumanov, T., Jenkins N., Roussos, S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochemistry 40: 1037-1042.

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 posgrado. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.

Barranco-Flrido, Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, 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.

Bartlett, M. C. Jaronski, S. T. 1988. Mass production of entomogenous fungi for biological control of insects. In: *Fungi in Biological Control Systems*, pp. 65-85. Ed. M. N. Burge, Manchester University Press, Manchester, NY.

Batta, Y., A. 2007. Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdale* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina:Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology* 103:1406-1414.

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., ST Leger, R. J., Joshi, L., Roberts, D. W.1995. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycological Research* 99 (4): 403-406.

Bongaarts J., 2009. Human population growth and the demographic transition. *Phil. Trans. R. Soc. B* (2009) 364, 2985–2990

Brechelt, A. 2004. El manejo ecológico de plagas y enfermedades. *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL)*

Butt, T., M., Wang, C., Shah, F., A., Hall, R. 2006. Degeneration of entomogenous fungi. In: An Ecological and Societal Approach to Biological Control: Eilenberg, J., Hokkanen, H., M., T. (eds.) Springer Holanda 213-226.

Campos R. A. Arruda W, Boldo J T. Silva M. V, Barros N. M, Azevedo J. L, Schrank A, Vainstein M.H 2005. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. Current Microbiology 50:257:261.

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

Cisneros F.H., 2010. Control de plagas agrícolas. Fascículo 13

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*.

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. Vol. 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. *Biotechnol. Adv.* 11, 577–587

Devotto, L.M. Gerding y A. France, 2000. Hongos entomopatógenos: una alternativa para la obtención de biopesticidas. *Bioleche.* 23:30-33.

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

Dias BA, 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. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Domenech, F., Leon, M., Rodriguez-Leon, J.A., Rodriguez, D.E., Alfonso, A., Sanchez, D. 1998. Obtaining a medium for spore production of *Metarhizium anisoplae* in solid state fermentation. *Rev. ICIDCA Sobre 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. *Curr. Microbiol.* 56: 256-263.

Elawati N E, Pujiyanto S, Kusdiyantini E. 2018. Production of extracellular chitinase *Beauveria bassiana* under submerged fermentation conditions. *Journal of Physics.* Vol. 1025.

Erlor, F., Ates, A. O. 2015. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *metarhizium anisoplia* as biological control agents against the june beetle. *Journal of Insect Science.*

Fang, W., Pei, Y., Bidochka, M., J. 2007. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology.* 153: 1017-1025.

FAO. 2019. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. Roma.

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* provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia* 47:255-266.

García, M. A., Cappello, S., Lesher, J. M., Molina, R. F. 2008. Hongos entomopatógenos como alternativa en el control biológico. *Kuxulkab*.

García-Pereyra J., Valdés-Lozano C., Olivares-Saenz E., Alvarado-Gómez O., Alejandre-Iturbide G., Salazar-Sosa E. & Medrano-Roldán H. 2009. Rendimiento de grano y calidad del forraje de amaranto (*Amaranthus spp.*) cultivado a diferentes densidades en el noreste de México. *Revista internacional de bótica experimental*. 78: 53-60.

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

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

Gómez-Vásquez C. García-Gómez M. J., Núñez-Gaona O. 2018. Efecto del medio sobre la producción de enzimas hidrolíticas de *Beauveria bassiana* por fermentación bifásica *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*. 6:1350:1155

Grimm, C. 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protection* 20: 623-630.

Hajek A. E. (2004). *Natural Enemies. An introduction to biological control*. Cambridge University Press, New York.

Havukkala I, Mitamura 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. 1988. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnology Letters*, 10(9):637-642.

Hegedus, D.D., Khachatourians, G.G. 2015. The impact of Biotechnology on *Hyphomycetes* fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology advances*. 3: 455-490.

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.

Jaronski S.T., 2013. Mass production of entomopathogenic fungi: State of the Art. *Invertebrates and entomopathogens*. 357-413.

Jaronski, S.T., Jackson, M.A., (2012). Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, second ed. Academic Press, New York. 255–284

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

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. Vol. 114: 120-128.

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.

López-Sosa D. Evaluación de la virulencia y viabilidad de los conidios de *Beauveria bassiana* producidos mediante fermentación bifásica utilizando un inductor. Tesis de licenciatura. Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, Oaxaca, México. 2018

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

López-Sosa D. Núñez-Gaona O. 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. 2017

García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., L.A. Prado-Barragán. (2008). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry* 112: 604–608

Machado, L. A., Maher, C. G., Herbert, R. D., Clare, H., McAuley, J. 2010. The effectiveness of the McKenzie method in addition to first-line care for acute low back pain: a randomized controlled trial. *BioMed Central Medicine*

Mascarin G. M., Alves S. B., Lopes R. B 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53 (4): 753-761.

Mata-Villegas. T, 2008. Evaluacion de matrices de esporulación y formulación de un micoinsecticida a base de esporas del hongo entomopatogeno *Beauveria bassiana*. 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. *Rev. Protección Vegetal*. 25:108-112

Mishra, S., Kumar, P., & Malik, A. 2016. Suitability of agricultural by-products as production medium for spore production by *Beauveria bassiana* HQ917687. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 5(2), 179–184.

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. *Relacion entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de Beauveria bassiana*. Tesis de maestria. Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Itztapalapa.

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

Morales Ramirez F. 2012. Estimación de la concentración y tiempo letal del nemátodo entomopatógeno *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) para el control de *Cosmopolites sordidus* (Coleóptera: Curculionidae). Departamento de ciencia y producción agropecuaria. Zamorano, Honduras.

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

NMX-F-607-NORMEX-2013. 2013. Determinación de cenizas en alimentos. Normas mexicanas.

NOM-086-SSA1-1994. 2006. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos. Normas mexicanas dirección general de normas.

NOM-116-SSA1-1994. 2006. Determinación de humedad en productos alimenticios. Normas mexicanas dirección general de normas.

NOM-155-SCFI-2012. 2012. Análisis de agua - medición de nitrógeno total kjeldahl en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Norma mexicana.

Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R y Loera O. 2005. Effect of water activity on grown and conidia production in *Beauveria bassiana*. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.

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

Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R., Loera O. 2005. Effect of wáter activity on grown and conidia production in *Beauveria bassiana*. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto México.

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 den medio sólido. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima México.

Núñez-Gaona, O. 2004. Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa México.

Ondráčková E., 2016. The use of Entomopathogenic fungi in biological control of pests. Acta fytotechn. zootechn., 18, 2015(Special Issue): 102-105.

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 ravidia* mediante la técnica de RDA. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto.

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. J. Appl. Entomol. 134, 581–591

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.

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

Robledo Monterrubio M., Loera O, Alatorre-Rosas R, Viniegra-González G. Obtención y caracterización de mutantes de *Beauveria bassiana* con luz UV y 2-deoxi-D-glucosa. V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Universidad de Chapingo Chapingo, Estado de México. 2004

Rodríguez M.S., Gerding M., 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. H. C. Arredondo-Bernal (eds.). 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. Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. División de Ciencias Biológicas y de Salud, México, D.F.

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*. Vol. 270: 116-123

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.

Soriano-Santos, Jorge., Loera-Corral, Octavio., Escamilla-Hurtado, María Lourdes, Vázquez-Chávez, Lilia, Hernández- Magaña, Arturo., Guerrero-Legarreta, Isabel. 2006. Fermentación sólida del rastrojo de amaranto (*amaranthus hypocondricus*) y olote de maíz (*zea mays*) por *aspergillus niger* para la obtención de polifenoles. iv Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Morelia. Mexico 2006.

St Leger R., Screen S. 2001. Prospects for Strain Improvement of fungal pathogens of Insects and Weeds. Fungal biological Control Agent: Progress, Problems and Potential. CABI International. Fungi as Biocontrol Agents. Edts T. M. Butt, C. Jackson and N. Magan p 219-237.

St Leger, R. J., Cooper, R. M., Charnley, A. K. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. Journal of General Microbiology, 132(6):1509-1517

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

Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M., Mozaffari, J. 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*. 16(5): 525-534

Tronsmo, A., & 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., Sandoval, L. (1997). Hidrólisis ácida. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 1997, 14: 265-275, 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*. Vol. 50(2): 217-223

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*. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 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

Whipps J. M y 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. 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. 147

Zahid H.J., Robinson E., Kelly R. L., (2016). Agriculture, population growth and statistical analysis of the radiocarbon record. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113(3): 931-935.

Zavaleta-Mejía, E. (2014). Management Alternatives for Plant Diseases, (January 1999).

## 12. ANEXOS

### 12.1 Análisis Estadísticos

#### General Linear Model: Ceba D Humedad Arroz\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	44.4	A
10	3	41.5	B
0	3	41.5	B
5	3	39.3	C

Means that do not share a letter are significantly different.

#### General Linear Model: Ceba D Humedad Rastrjo\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
0	3	56.0	A
5	3	49.8	B
15	3	47.8	B
10	3	46.9	B

Means that do not share a letter are significantly different.

#### General Linear Model: Control Humedad Arroz\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
5	3	43.0	A
15	3	38.3	B
0	3	37.4	B
10	3	37.2	B

Means that do not share a letter are significantly different.

#### General Linear Model: Control Humedad Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
0	3	44.4	A
5	3	43.0	A B
15	3	41.5	B
10	3	39.3	C

Means that do not share a letter are significantly different.

#### General Linear Model: Ceba D Aw Arroz\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
------------	---	------	----------

5	3	1.0	A
0	3	1.0	A
10	3	1.0	A
15	3	1.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Aw Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	1.0	A
10	3	1.0	A
0	3	1.0	A
5	3	1.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Aw Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	1.0	A
10	3	1.0	A
0	3	1.0	A
5	3	1.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Aw Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	1.0	A
5	3	1.0	A
10	3	1.0	A
0	3	1.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D pH arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
10	3	5.5	A
15	3	5.5	A
0	3	5.4	A
5	3	5.3	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D pH Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
------------	---	------	----------

15	3	5.4	A
0	3	5.4	A
10	3	5.1	A
5	3	4.5	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control pH Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
0	3	5.5	A
10	3	5.4	A
15	3	5.2	A
5	3	5.2	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control pH Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
10	3	5.6	A
5	3	5.5	A
15	3	5.3	A
0	3	5.3	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Cepa D Humed, Cepa D Humed, Control Hume, Control Hume

Level	N	Mean	StDev
Cepa D Humedad Arroz_1	12	41.698	1.940
Cepa D Humedad Rastrjo_1	12	50.114	3.840
Control Humedad Arroz_1	12	38.982	2.834
Control Humedad Rastrojo	12	42.072	2.077

### One-way ANOVA: Cepa D Aw Ar, Cepa D Aw Ra, Control Aw A, Control Aw R

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Control Aw Arroz_1	12	0.98750	A
Control Aw Rastrojo_1	12	0.98417	A B
Cepa D Aw Arroz_1	12	0.96833	B C
Cepa D Aw Rastrojo_1	12	0.96417	C

Means that do not share a letter are significantly different.

## One-way ANOVA: Cepa D pH ar, Cepa D pH Ra, Control pH A, Control pH R

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Control pH Rastrojo_1	12	5.4233	A
Cepa D pH arroz_1	12	5.4108	A
Control pH Arroz_1	12	5.3333	A
Cepa D pH Rastrojo_1	12	5.0967	A

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: Cepa D Conidios Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	2.92750E+09	A
5	3	2.72500E+09	A
0	3	2.60000E+09	A
10	3	2.47643E+09	A

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: Cepa D Conidios Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
10	3	318625000.0	A
5	3	290125000.0	A
15	3	282750000.0	A
0	3	261666667.7	A

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: Control Conidios Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	3.52750E+09	A
5	3	3.20250E+09	A
10	3	3.17643E+09	A
0	3	2.90000E+09	A

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: Control Conidios Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	385909090.9	A
10	3	352125000.0	A
5	3	328375000.0	A

0 3 316250000.0 A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Endo Arroz\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	123.0	A
10	3	114.0	A B
5	3	99.0	A B
0	3	91.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Endo Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
5	3	124.0	A
15	3	109.0	A
10	3	104.0	A
0	3	104.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Endo Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	123.0	A
10	3	114.0	A B
5	3	99.0	A B
0	3	91.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Endo Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
5	3	124.0	A
15	3	109.0	A
10	3	104.0	A
0	3	104.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Endo Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	119.0	A

10	3	103.0	A B
5	3	93.0	A B
0	3	87.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Endo Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	131.0	A
10	3	127.0	A
0	3	109.0	A
5	3	107.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Exo Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	0.3	A
10	3	0.2	B
0	3	0.2	B
5	3	0.1	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Exo Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	0.2	A
0	3	0.2	A B
5	3	0.1	B
10	3	0.1	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Exo Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	0.3	A
10	3	0.3	A B
5	3	0.3	A B
0	3	0.2	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Contrl Exo Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
10	3	0.3	A
15	3	0.3	A
5	3	0.3	A
0	3	0.2	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Proteasas Arroz\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	83.0	A
10	3	77.0	A
5	3	71.0	A
0	3	68.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D Proteasas Rastrojo\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	178.6	A
10	3	139.0	B
5	3	129.0	B
0	3	104.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Proteasas Arroz\_1 versus Inductor\_1

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	123.2	A
10	3	104.0	A B
5	3	84.1	B C
0	3	76.4	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control Proteasas Rastrjo\_1 versus Inductor\_1

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductor_1	N	Mean	Grouping
15	3	169.3	A
10	3	134.5	A B
5	3	129.9	B
0	3	110.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Cepa D Conid, Cepa D Conid, Control Coni, Control Coni

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Control Conidios Arroz_1	12	3201606250	A
Cepa D Conidios Arroz_1	12	2682231250	B
Control Conidios Rastrojo_1	12	345664773	C
Cepa D Conidios Rastrojo_1	12	288291667	C

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Cepa D Endo , Cepa D Endo , Control Endo, Control Endo

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Control Endo Rastrojo_1	12	118.50	A
Cepa D Endo Rastrojo_1	12	110.25	A B
Cepa D Endo Arroz_1	12	106.75	A B
Control Endo Arroz_1	12	100.50	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Cepa D Exo A, Cepa D Exo R, Control Exo , Control Exo R

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Control Exo Arroz_1	12	0.27998	A
Control Exo Rastrojo_1	12	0.27471	A
Cepa D Exo Arroz_1	12	0.17644	B
Cepa D Exo Rastrojo_1	12	0.14002	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Cepa D Prote, Cepa D Prote, Control Prot, Control Prot

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
Cepa D Proteasas Rastrojo_1	12	137.64	A
Control Proteasas Rastrojo_1	12	135.91	A
Control Proteasas Arroz_1	12	96.92	B
Cepa D Proteasas Arroz_1	12	74.75	B

### General Linear Model: TL50CepaD arroz versus Inductorr

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductorr	N	Mean	Grouping
10	3	3.5	A
15	3	3.4	A
5	3	3.1	A
0	3	2.7	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: TL50control arroz versus Inductorr

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductorr	N	Mean	Grouping
10	3	3.4	A
15	3	3.2	A
5	3	3.1	A
0	3	3.0	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: TL50Cepa D Rastrojo versus Inductorr

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductorr	N	Mean	Grouping
10	3	3.8	A
0	3	3.5	A
5	3	3.4	A
15	3	3.3	A

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: TL50Control Rastrojo versus Inductorr

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Inductorr	N	Mean	Grouping
0	3	3.8	A
15	3	3.6	A B
10	3	3.4	A B
5	3	3.2	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: TL50Control , TL50Cepa D R, TL50control , TL50CepaD ar

Grouping Information Using Tukey Method

	N	Mean	Grouping
TL50Cepa D Rastrojo	12	3.4976	A
TL50Control Rastrojo	12	3.4907	A
TL50control arroz	12	3.2077	A

TL50CepaD arroz 12 3.1844 A

### General Linear Model: Cepa D TL50 Dosis arroz versus Dosis

Dosis	N	Mean	Grouping
10 <sup>7</sup>	12	8.0	A
10 <sup>8</sup>	12	3.2	B
10 <sup>9</sup>	12	3.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control TL50 Dosis arroz versus Dosis

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Dosis	N	Mean	Grouping
10 <sup>7</sup>	12	7.7	A
10 <sup>8</sup>	12	3.2	B
10 <sup>9</sup>	12	3.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Cepa D TL 50 Dosis rastrojo versus Dosis

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Dosis	N	Mean	Grouping
10 <sup>7</sup>	12	8.8	A
10 <sup>8</sup>	12	3.5	B
10 <sup>9</sup>	12	3.1	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### General Linear Model: Control TL50 Dosis Rastroj versus Dosis

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Dosis	N	Mean	Grouping
10 <sup>7</sup>	12	8.4	A
10 <sup>8</sup>	12	3.5	B
10 <sup>9</sup>	12	3.0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

### One-way ANOVA: Cepa D TL50, Control TL50, Cepa D TL 50, Control TL50

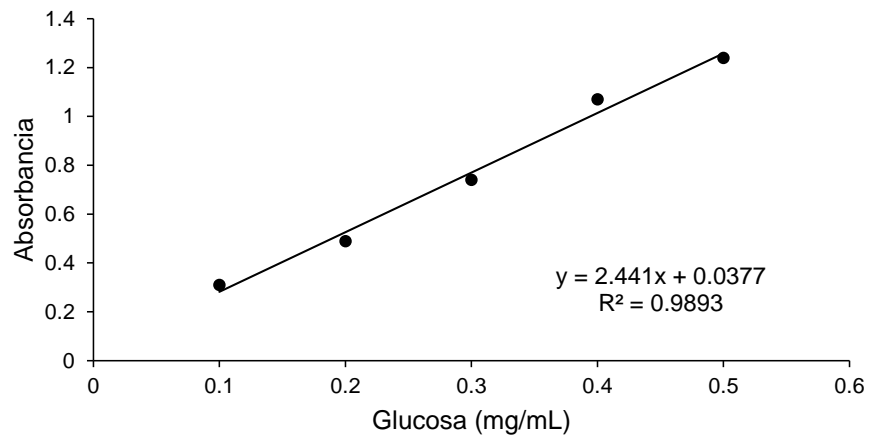
	Mean	Grouping
Cepa D TL 50 Dosis rastrojo	36 5.136	A
Control TL50 Dosis Rastroj	36 4.990	A
Cepa D TL50 Dosis arroz	36 4.739	A

Control TL50 Dosis arroz 36 4.617 A

Means that do not share a letter are significantly different.

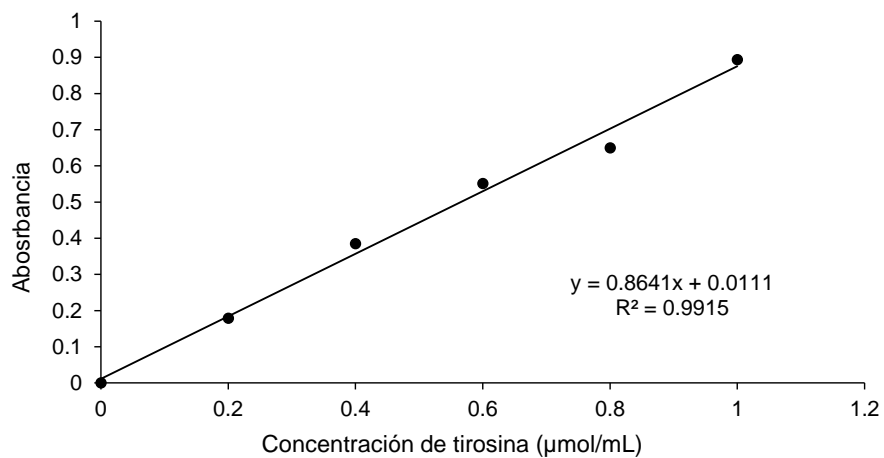
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals

## 12.2 Curva patrón de glucosa



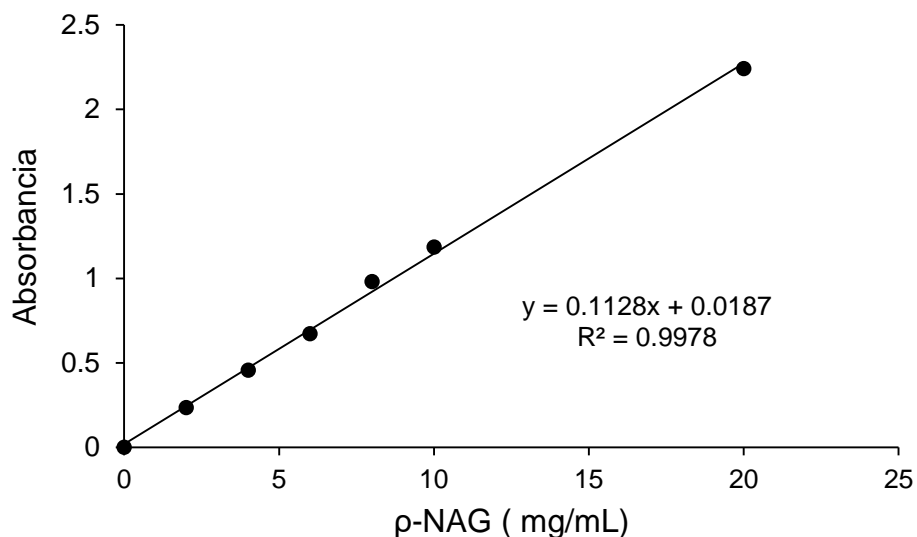
**Figura 22.** Curva patrón de glucosa. Empleada para la determinación de azúcares totales

## 12.3 Curva patrón de tirosina



**Figura 23.** Curva patrón de tirosina, empleada para la determinación de actividad proteolítica.

## 12.4 Curva patrón de p-nitrofenil



**Figura 24.** Curva patrón de p-nitrofenil, empleada para la determinación de exoquitinasas.

## 12.5 Secuencia de los hongos identificados

### Aislado A

```
GTAGGTGACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGTGTTCCCTAGCGAGCCC  
AACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATT  
CCTGGCCTCCGGCGGCTCTCAGCCCCCGGCCCGCGCCCCCCCCGAGACACC  
CCGAACCCTGTCCGATCTACTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTA  
AAACTTTCAAC
```

### **Aislado C**

CGTAGGTGAACCTTCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAA  
TGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGGGTC  
GCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACCTCTCATTTTA  
TACACCCTCGCGGGTTTTTTTTATAATCTGAACCTTCTCCGCGCCTCTCCTAGG  
CCTTTCTA

### **Aislado D**

CGTAGGTGAACCTCGGAAGGATCATTAATAATCAATAATTTTGGCTTGTCCAT  
CATTATCTATTTACTGTGAACTGTATTACTTGACGCTTGAGGGATGTTCCA  
TTGCTATAAGGATAGGCATTGGAAATGTTAACCGAGTCATAATCAAGCTTAGG  
CTTGGTATCCTATTATTATTTACCAAAGAATTCAGAATTAATATTGTAACATAG  
AC

### **Aislado E**

CTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATAATCAATAATTTTGGCTTGTCCAT  
CATTATCTATTTACTGTGAACTGTATTACTTGACGCTTGAGGGATGTTCCA  
TATCAATAAGCGGAGGACCTGACGCCGCGAACTATGTACACACCACCCTGTC  
TCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGACCGATCAGCATCTCGTATGCCGTCT  
TCTTC

## Aislado H

ACTGCGGGTATCTATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCCTCGGTGATGATTA  
CAGACCGAACGGTCGCCTTCGCCACTGATTGTTCCCTCCAAATCTCTACGCATT  
TCACCGCTTACGCTTGAATTCCAATCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCGGTTT  
CCTGACCCTCCCCGGTTGAGCCGAGGCCACATCGGGCTTAAAGGAACCACCT  
GCGCGCACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCG  
ACTGCTGACGTGTGATGGCTTTCAACAGGCTGCCGTCAAGGTAGCGCCAGTT  
ACTACGCCTTGTTCTTTCCCCTTGCAACAGTTTTACGAACCAATCGCTTCTTCA  
CTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGTCCATTGTTGGAAGATTCCCCTA  
CTGCTGCCACCCGTAGGCCTGACGCCGGTTAGTGGTATTGGCA

## 12.6 Trabajos presentados

López-Sosa D. García-Gómez M. J. Núñez-Gaona O. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* por fermentación sólida con rastrojo de amaranto como sustrato. LVI Encuentro Internacional sobre Biotecnología en la UATx. Tlaxcala, Tlaxcala, México. 2018

López-Sosa. D. García-Gómez. M.J. Núñez-Gaona. O. Evaluación de exo y endo quitinasas de *Beauveria bassiana* producidas en fermentación sólida utilizando residuos agroindustriales. XL Encuentro Nacional de la AMIDQ. Bahías de Huatulco, Oaxaca. México. 2019.

## 12.7 Publicaciones

López-Sosa D, García-Gómez M. J., Núñez-Gaona O. 2018. Efecto del Tenebrio molitor como inductor de virulencia de *Beauveria bassiana* producida en fermentación sólida. Coloquio de Investigación Multidisciplinaria. 6:1130:1136

Gómez-Hernández F. A., López-Sosa D., Avila-Alejandre A.X., García-Gómez M. J., Núñez-Gaona O. 2018. Caracterización morfológica y molecular de una cepa aislada de hojas sanas de café. Coloquio de Investigación Multidisciplinaria. 6:1558:1594

Méndez-Arango M.F, López-Sosa D, Núñez-Gaona O., García-Gómez M. J. 2019. Evaluation of radial growth on amaranth forage from filamentous fungi isolated from coffee leaves. Mexican Journal of Biotechnology. 4(2): 47-59