

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



CBS

**“PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae* var
lepidiotum EN ATMÓSFERAS OXIDANTES”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

I.B.I. NOHEMI GARCIA ORTIZ

DIRECTOR: **Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL**

ASESORES: **Dr. SAÚL TLECUITL BERISTAIN**

Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

México D.F. a 28 de Agosto de 2012

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465.

México D.F. a 28 de Agosto de 2012

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis.

"PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* EN
ATMÓSFERAS OXIDANTES"

que presentó:

I.B.I. NOHEMI GARCIA ORTIZ

Comité Tutorial:

Director: Dr. OCTAVIO LOERA CORRAL- Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. SAÚL TLECUITL BERISTAIN-Universidad Politécnica de Tlaxcala

Asesor: Dr. ERNESTO FAVELA TORRES - Universidad Autónoma Metropolitana

Jurado:

Presidente: Dr. ERNESTO FAVELA TORRES _____

Secretario: Dra. MA. ASCENCIÓN RAMÍREZ CORONEL _____

Vocal: Dr. SAÚL TLECUITL BERISTAIN _____

Vocal: Dra. DIVANERY RODRÍGUEZ GÓMEZ _____

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana.

A CONACYT, por la beca otorgada para la realización de este trabajo. (No. De becario 248839)

Al Dr. Octavio Loera Corral por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su buena disposición para dirigir esta tesis y por su apoyo.

A los doctores Ernesto Favela Torres, Saúl Tlecuítl Beristain, Divanery Rodríguez Gómez y Ma. Ascención Ramírez Coronel por sus comentarios acertados, sus valiosas aportaciones y correcciones.

A todos mis compañeros de laboratorio W-104, por su apoyo enseñanzas y acertados comentarios para este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios, por todo.

A mi familia. A mi padre y mi madre por ser la base de mi vida y por darme lo mejor de cada uno, cada día. A mis hermanas Ruth y Rebeca, por ser mis primeras amigas y por compartir conmigo mis mejores y peores momentos.

A mis amigos, por ser además mis maestros, hermanos, confidentes y todo lo que se puede esperar de mí "otra familia". Gracias David, Alejandra, Caliope, Jazmín, Adriana y León.

A mis sobrinos Fernanda y Pablo porque verlos crecer es siempre muy divertido y asombroso a la vez.

NOHEMI

Contenido

1	MARCO TEÓRICO	1
1.1	Control biológico	1
1.1.1	Control biológico por conservación	1
1.1.2	Control biológico por introducción	1
1.1.3	Control biológico por incremento.....	1
1.2	Hongos entomopatógenos	2
1.2.1	Metarhizium anisopliae	2
1.3	Mecanismo de acción general de los hongos entomopatógenos	3
1.4	Comercialización de Hongos entomopatógenos en México	5
1.5	Producción de hongos entomopatógenos	7
1.6	Efecto del oxígeno sobre el crecimiento de hongos	10
1.7	Conservación de hongos entomopatógenos.....	12
1.8	Bioensayos con hongos entomopatógenos.....	12
2	ANTECEDENTES.....	13
3	JUSTIFICACIÓN	14
4	HIPÓTESIS.....	16
5	OBJETIVOS.....	16
5.1	Objetivo General	16
5.2	Objetivos particulares	16
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	17
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
7.1	Material biológico	18

7.2	Medio de cultivo.....	18
7.3	Cultivo del inóculo y reactivación de la cepa	18
7.4	Conservación de la cepa de <i>Metarhizium anisopliae</i> por liofilización.....	19
7.5	Cinética de producción de conidios	20
7.6	Cuantificación de la producción de conidios.....	20
7.7	Parámetros de calidad de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	20
7.7.1	Germinación (G).....	20
7.7.2	Viabilidad (V).....	21
7.7.3	Hidrofobicidad de la superficie de los conidios (H).....	21
7.7.4	Bioensayo.....	22
7.8	Análisis estadístico	24
8	RESULTADOS.....	24
8.1	Conservación de la cepa de <i>M. anisopliae</i> y prueba de calidad	24
8.2	Producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i>	26
8.2.1	Producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> a 21% de oxígeno	26
8.2.2	Cinética de producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> con diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera.....	29
8.3	Pruebas de calidad de conidios producidos a diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera ...	34
8.3.1	Pruebas de Germinación, Viabilidad e Hidrofobicidad	34
8.3.2	Prueba de calidad por parámetros de bioensayo	39
9	CONCLUSIONES	44
10	PERSPECTIVAS	45
11	BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de germinación de los conidios obtenidos a partir de una cepa liofilizada de <i>M. anisopliae</i>	25
Gráfica 2. Cinética de producción de conidios de <i>M. anisopliae</i> en atmósfera de 21% de oxígeno con recambio y sin recambio de atmósfera.....	27
Gráfica 3. Cinética de producción de conidios obtenidos a diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera.....	30
Gráfica 4. Productividad de conidios obtenidos a diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera a las 132h de cultivo.....	32
Gráfica 5. Porcentaje de germinación de los conidios obtenidos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera. [Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$)]	35
Gráfica 6. Porcentaje de viabilidad de los conidios obtenidos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera. [Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$)]	37
Gráfica 7. Porcentaje de hidrofobicidad de los conidios obtenidos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera. [Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$)].....	38
Gráfica 8. Perfiles de sobrevivencia de larvas de <i>T. molitor</i> después de la infección con conidios obtenidos a diferentes concentraciones de oxígeno en la atmósfera. [Control negativo (*); 16% (\diamond); 21% A (x); 21% R (+); 23% (O); 26% (\square); 30% (Δ). Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo propuesto por Rodríguez-Gómez et al. (2009)].....	40
Gráfica 9. Perfiles de sobrevivencia de larvas de <i>G. mellonella</i> después de la infección con conidios obtenidos a diferentes concentraciones de oxígeno en la atmósfera. [Control negativo (*); 16% (\diamond); 21% A (x); 21% R (+); 23% (O); 26% (\square); 30% (Δ). Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo propuesto por Rodríguez-Gómez et al. (2009)].....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. A) Aspecto macroscópico de <i>M. anisopliae</i> . B) Vista al microscopio 40X de conidios de <i>M. anisopliae</i> . C) Vista al microscopio 40X de conidios germinados de <i>M. anisopliae</i> . D) Cadáver de <i>Galleria mellonella</i> que muestra micelio y conidios. E) Cadáver de <i>Tenebrio molitor</i> que muestra micelio y conidios.....	3
Figura 2. Proceso infectivo de los Hongos Entomopatógenos (Tomado de Thomas y Read, 2007).....	4
Figura 3. Estequiometría de las reacciones enzimáticas que actúan como defensa antioxidante. Tomado de Aguirre et al., (2005).....	11
Figura 4. Larva de <i>Tenebrio molitor</i> (Izquierda). Larva de <i>Galleria mellonella</i> (Derecha).....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Organismos entomopatógenos comercializados en México (Tomada y actualizada de Alatorre-Rosas., 2007).....	6
Tabla 2. Composición del medio Agar Maltosa Sabouraud (AMS).....	21
Tabla 3. Pruebas de calidad de conidios de <i>M. anisopliae</i> producidos en atmósfera de 21% de oxígeno, con recambio y sin recambio de atmósfera.	29
Tabla 4. Parámetros de infectividad de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos de los distintos tratamientos hacia larvas de <i>T. molitor</i>	41
Tabla 5. Parámetros de infectividad sobre larvas de <i>T. molitor</i> obtenidas en otros estudios.....	42
Tabla 6. Parámetros de infectividad de conidios de <i>M. anisopliae</i> obtenidos de los distintos tratamientos hacia larvas de <i>G. mellonella</i>	43

RESUMEN

En la agricultura “orgánica”, los bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos se han convertido en una parte fundamental de las estrategias para el manejo integrado de plagas (MIP), una de las especies de hongos entomopatógenos con las que más se ha trabajado en todo el mundo en relación con su producción masiva y comercialización como bioinsecticida es *Metarhizium anisopliae*.

En la primera parte de este estudio se evaluó la germinación de la cepa de *Metarhizium anisopliae* que fue liofilizada para ser conservada a largo plazo, se encontró que la germinación fue de 56.98% (± 3.9) después de una semana de almacenamiento a temperatura ambiente y que el descenso en la germinación por pasar por el proceso de liofilización representó un 21.3%. Además hasta por dos meses de almacenamiento no se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, se determinó el efecto de pulsos de gas enriquecidos en oxígeno, sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *Lepidiotum*. Se encontró que este aumento de oxígeno incrementó la producción (26 y 30%) con respecto a lo producido en la atmósfera normal. Además de que se incrementó la productividad (30%) de conidios sin afectar los parámetros de calidad como son: Germinación y Viabilidad. Por el contrario se encontró que disminuir el porcentaje de oxígeno afectó los parámetros de calidad germinación, viabilidad e hidrofobicidad. Así mismo, ésta modificación de la concentración de oxígeno en la atmósfera no alteró los parámetros obtenidos a través del bioensayo hacia larvas de *T. molitor* y *G. mellonella*.

Los resultados de este trabajo describen por primera vez el efecto de diferentes concentraciones de oxígeno por arriba y por abajo de la atmósfera normal (21% de O₂) sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*, así como en la calidad de los mismos.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Control biológico

El término control biológico fue usado por primera vez por H. S. Smith en 1919, refiriéndose al uso de enemigos naturales (introducidos o manipulados) para el control de los insectos plaga. El término ha cambiado con el tiempo, pero puede definirse como el uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas, lo que incluye a virus, pero se excluyen los genes o fragmentos de genes y los metabolitos sin los organismos que los producen (Barrera, 2007).

Según Huffaker, la premisa del control biológico descansa en que, bajo ciertas circunstancias, muchas poblaciones son llevadas a bajas densidades por sus enemigos naturales, este efecto se origina de la interacción de ambas poblaciones, por lo cual es importante restaurar y/o mantener la biodiversidad en la agricultura, porque presta una gran variedad de servicios ecológicos. Uno de estos servicios es la regulación de la abundancia de organismos indeseables a través de la depredación, el parasitismo y la competencia (Barrera, 2007). En este sentido, la aplicación del control biológico por medio de entomopatógenos se considera como una estrategia válida para restaurar la biodiversidad funcional en ecosistemas agrícolas, utilizando alguna de las tres siguientes alternativas (Barrera, 2007; Glare, 2004):

1.1.1 Control biológico por conservación

Se refiere a conservar la actividad, supervivencia y reproducción de los enemigos naturales nativos con el fin de incrementar su impacto sobre las plagas, también incluye la introducción intencional de una cepa exótica.

1.1.2 Control biológico por introducción

Este tipo de control se aplica cuando no existen enemigos naturales que controlen efectivamente a una plaga, lo que se hace es introducir y establecer permanentemente nuevas especies, se usa más frecuentemente en el control de plagas exóticas, las cuales comúnmente llegan a un área nueva sin factores naturales de control, este tipo de control también es llamado control biológico clásico.

1.1.3 Control biológico por incremento

Este tipo de control se aplica cuando los enemigos naturales son biológicamente efectivos, pero el control de las plagas es ineficiente. Además, se aplica cuando ya se ha

intentado los métodos de conservación o introducción, en este caso se puede recurrir al incremento o aumento de su población a través de cría masiva y liberación inoculativa de un agente biológico.

1.2 Hongos entomopatógenos

El término entomopatógeno se usa para definir aquellos microorganismos capaces de atacar insectos, y que reduce las poblaciones de insectos plaga a niveles que no causan daño económico a los cultivos. Específicamente de los hongos entomopatógenos, se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies, entre los más importantes se encuentran: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Isaria* y *Lecanicillum* (García *et al.*, 2008).

Los hongos entomopatógenos se conocen desde hace dos milenios, cuando los Chinos identificaron la especie *Cordyceps* (Glare, 2004) sobre especímenes de gusano de seda. Agostino Bassi en 1836 presentó un tratado sobre la enfermedad del gusano de seda, cuya causa era *Beauveria bassiana*, este hecho marca el inicio de la patología de insectos, pero el desarrollo y aplicabilidad de la patología de insectos, se inicia en 1879 con Hagen, quien estudió el posible uso de los hongos para el control de insectos (García-García *et al.*, 2008).

En 1878 Metchnikoff, utilizó el hongo *Metarhizium anisopliae* para el control del escarabajo de cereales, con este hecho Metchnikoff es la primera persona que utilizó un hongo como agente de control de plagas (Glare, 2004).

1.2.1 *Metarhizium anisopliae*

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno importante que ha sido un modelo para el estudio del control biológico de insectos plaga, este hongo se utiliza comercialmente en Brasil para controlar el salivazo (*Mahanarva bipars*), que afecta a la caña de azúcar, y también se utiliza en otros países, como Colombia, Australia y E.U para controlar una variedad de plagas. El amplio rango de hospederos de insectos del género *Metarhizium* lo hace comercialmente atractivo como agente de control biológico (Dalla Pria *et al.*, 2008).

Metarhizium anisopliae se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una máxima de 32 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C. La evidencia del ataque de *M. anisopliae* sobre insectos, en condiciones naturales, ha sido descrita como "muscardina verde" en más de 200 especies de insectos,

exhibiendo diferentes grados de especificidad, la cual está influenciada por las características del patógeno y de la cutícula del hospedero. Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar los polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrimentos para su crecimiento (Padilla-Melo *et al.*, 2000).

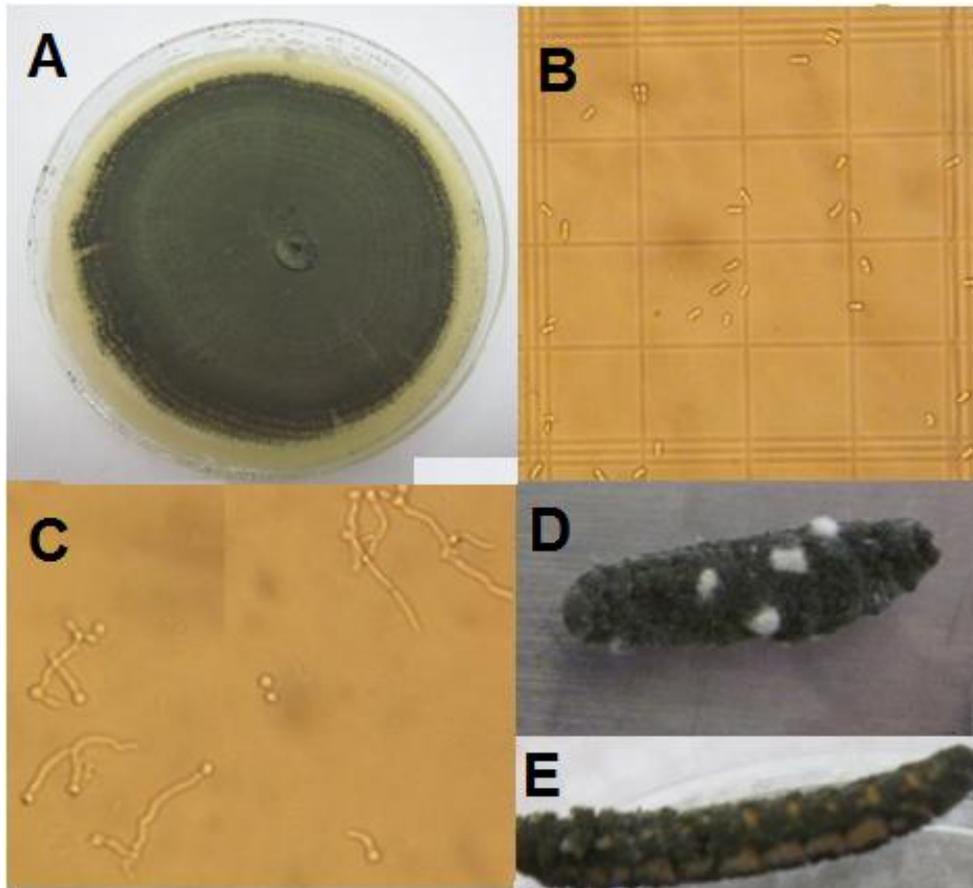


Figura 1. A) Aspecto macroscópico de *M. anisopliae*. B) Vista al microscopio 40X de conidios de *M. anisopliae*. C) Vista al microscopio 40X de conidios germinados de *M. anisopliae*. D) Cadáver de *Galleria mellonella* que muestra micelio y conidios. E) Cadáver de *Tenebrio molitor* que muestra micelio y conidios.

1.3 Mecanismo de acción general de los hongos entomopatógenos

De modo general, el mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos sobre los insectos se desarrolla en varias fases (Figura 2), que son: germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción. La unidad infectiva son las estructuras de reproducción sexual o asexual, es decir las esporas o los conidios.

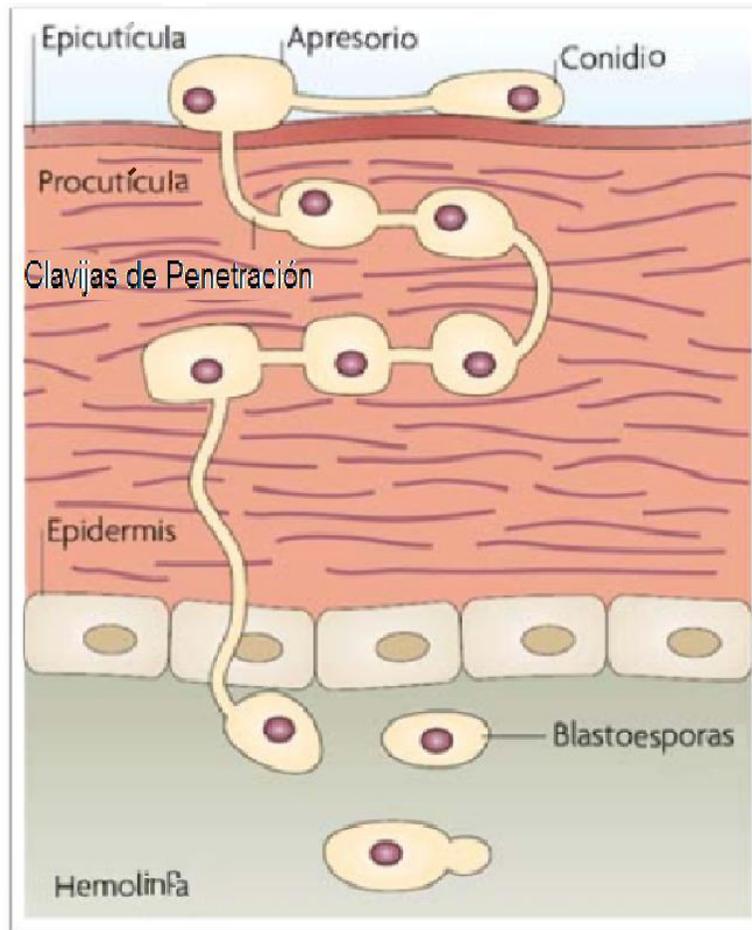


Figura 2. Proceso infeccioso de los Hongos Entomopatógenos (Tomado de Thomas y Read, 2007)

El proceso inicia cuando el conidio se adhiere a la cutícula del insecto; luego se produce un tubo germinativo y un apresorio; con éste el hongo se fija a la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) penetra al interior de las distintas capas de la cutícula del insecto. En la que participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la hifa, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula (Pucheta *et al.*, 2006)

El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido del insecto, colonizándolo completamente en forma de blastosporas en la hemolinfa, y a partir de la cual se forman pequeñas colonias y estructuras del hongo (García *et al.*, 2008). Este evento es acompañado por la liberación de metabolitos secundarios con

actividad insecticida (toxinas peptídicas) que aceleran la muerte del insecto. Al final, la muerte del insecto se debe a una combinación de factores como: la acción de toxinas del hongo, obstrucción física de la circulación de la hemolinfa, la privación de nutrientes y la invasión de órganos (Goettel e Inglis, 1997).

Al agotarse los nutrientes dentro del insecto, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo los órganos del hospedero. Finalmente, las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie iniciando la formación de conidios, con lo que se puede completar el ciclo infectivo (Pucheta *et al.*, 2006).

1.4 Comercialización de Hongos entomopatógenos en México

La industria de los bioinsecticidas incluye organismos entomopatógenos y entomófagos, además de compuestos con actividad insecticida derivados de plantas, metabolitos de actinomicetos. De forma general, los organismos entomopatógenos son aquellos que infectan al insecto y se reproducen en él hasta causarle la muerte (hongos, bacterias, protozoarios y nemátodos). En muchas ocasiones el número de organismos que infectan no es suficiente como para ocasionar la muerte del insecto, esto podría considerarse como una desventaja, pero en realidad no lo es, ya que el insecto vivo continúa dispersando al agente infectivo y provocando la infección de otros insectos. En la Tabla 1 se enlistan los organismos entomopatógenos más comercializados en México.

Tabla 1. Organismos entomopatógenos comercializados en México (Tomada y actualizada de Alatorre-Rosas., 2007)

Especie	Nombre comercial	Empresa
<i>B. bassiana</i>	BEA-SIN	Agrobionsa
<i>B. bassiana</i>	Botani-Gard 22WP	Bioworks INC
<i>B. bassiana</i>	Mycontrol	Bioworks INC
<i>V. lecanii</i>	Mycotal	Koppert México
<i>M. anisopliae</i>	Meta-Sin	Agrobionsa
<i>I.fumoso rosea</i>	PAESIN	Agrobionsa
<i>M. anisopliae</i>	FITOSAN	CESAVEG
<i>M. anisopliae</i>	Biofung	CESAVEG
Formulado con diferentes entomopatógenos	Best Best Ultra S MildOut Biobacter C Nemaxxion Biol	GreenCorp Biorganiks de México

En nuestro país existe menor interés en el empleo de productos biológicos en lugar de químicos. Esto representa una oportunidad y una alternativa, dentro del manejo integrado de plagas (MIP) en diferentes cultivos y principalmente en sistemas de cultivo, que se han denominado como “agricultura orgánica” (Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

Con respecto a hongos entomopatógenos, la producción de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium lecanii* se realiza en los estados de Colima, Guanajuato, Oaxaca y Sinaloa, para el control de plagas en cultivos de hortalizas, gramíneas y leguminosas. Agrobionsa es una empresa independiente que produce y comercializa bioinsecticidas en Sinaloa, esta empresa comercializa *Bacillus thuringiensis*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* además de otras empresas presentadas en la Tabla 1.

1.5 Producción de hongos entomopatógenos

Como se mostró en la sección anterior, la aplicación de hongos entomopatógenos sí se efectúa en México, pero hay que considerar que para la aplicación práctica de estos hongos, el nivel requerido está alrededor de 10^{12} conidios por hectárea o mayor, por lo tanto es necesario contar con un método apropiado de producción (Dorta *et al.*, 1996).

Entre los diversos grupos de microorganismos utilizados en el cultivo sólido, los hongos filamentosos son los más explotados, por su capacidad para crecer en sustratos sólidos complejos y producir una amplia gama de enzimas celulares y conidiosporas (Bhanu *et al.*, 2008)

Una de las especies de hongos entomopatógenos con las que más se ha trabajado en todo el mundo, en relación con su producción masiva y comercialización como bioplaguicida es *M. anisopliae* (Faria y Wraight, 2007). La producción de conidios en gran escala se puede realizar sobre diferentes sustratos sólidos de origen vegetal, como papa, trigo, soya y arroz (Kassa *et al.*, 2008), siendo este último el sustrato comúnmente seleccionado para la producción de conidios fúngicos, probablemente por su balance nutricional, bajo costo, disponibilidad en todo el mundo; además de presentar características físicas como: tamaño, forma e integridad estructural; aún después de ser colonizado por el hongo (Jenkins *et al.*, 1998).

Por otra parte el cultivo sólido asegura la compatibilidad de los agentes de biocontrol con las técnicas de formulación y aplicación de los conidios hidrofóbicos. Los hongos entomopatógenos, como *Metarhizium* producen naturalmente estos conidios hidrofóbicos sobre sustratos sólidos. El micelio, las blastosporas y los conidios sumergidos que se obtienen por fermentación líquida también son propágulos infecciosos, pero son hidrofílicos por lo tanto no pueden ser suspendidos en aceites, además pierden viabilidad más rápido durante el almacenamiento que los conidios (Arzumanov *et al.*, 2005; Glare, 2004).

Existen reportes que describen los esfuerzos para producir altos rendimientos de conidios de hongos entomopatógenos, como el de Nuñez-Gaona *et al.*, (2010), quienes trabajaron con *Beauveria bassiana*, en cultivo sólido, utilizaron salvado de trigo y bagazo de caña en diferentes proporciones, alcanzando un rendimiento máximo de 1.18×10^{10} conidios por

gramo de sustrato sólido inicial (con/gssi), usando salvado de trigo con 66% de humedad y actividad de agua de 1; este rendimiento disminuyó una orden de magnitud al incrementar el contenido de humedad o con la adición de bagazo de caña. Dorta *et al.*, (1996) encontraron para *M. anisopliae* un rendimiento de 2.3×10^{10} con/gssi utilizando como sustrato salvado de arroz, también se indica en ese estudio que esto representó solo el 80.4 % de la producción que teóricamente se puede obtener en este tipo de cultivos.

Sin duda, la relación carbono-nitrógeno (C/N) en el medio es uno de los parámetros más críticos para aumentar la producción de conidios, por ejemplo, Shah *et al.*, (2005) reportaron 1.1×10^7 con/cm² con la cepa V25 de *M. anisopliae* creciendo en PDA, mientras que adicionando 1% de extracto de levadura obtuvieron 2.5×10^7 con/cm², por otro lado, la germinación se mejoró de 54 a 79%. Por su parte, Mustafa y Kaur (2009) reportaron que con la cepa UM2 de *M. anisopliae* obtuvieron 1×10^9 con/cm² en una relación C/N de 75:1 mientras que con una C/N de 35:1 obtuvieron 5.1×10^8 con/cm², la fuente de carbono utilizada en ese estudio fue glucosa y la fuente de nitrógeno, peptona.

Como se mencionó anteriormente, el método común para la producción masiva involucra el cultivo en medio sólido, pero también puede utilizarse un sistema de cultivo en dos etapas (bifásico), en el que se cultiva el inóculo en medio líquido y después se agrega a un sustrato sólido para la producción masiva, en ambas técnicas el producto deseado son los conidios, por su gran virulencia y persistencia a condiciones ambientales adversas (Dorta *et al.*, 1996; Arcas *et al.*, 1999). Respecto al cultivo bifásico de *M. anisopliae*, Barajas *et al.*, (2010) obtuvieron 1×10^9 con/g utilizando arroz como sustrato, es necesario mencionar que en este tipo de cultivos se invierten 12 h en la obtención de propágulos en medio líquido y después de 12 d en medio sólido los autores obtienen la mencionada producción de conidios.

En cuanto a estudios que consideran el estrés como factor de inducción de la conidiación, se ha observado en *Metarhizium anisopliae*, que los conidios producidos bajo estrés osmótico (cloruro de potasio 0.8 M) aumentaron la mortalidad (%) de larvas de *Tenebrio molitor*, comparados con los producidos en agar papa dextrosa con extracto de levadura. Sin embargo, la mortalidad disminuyó cuando la concentración de sal se redujo a 0.6 M (Rangel *et al.*, 2008), en ese estudio se reportó que el estrés nutricional también provocó

un aumento en la mortalidad de larvas, al infectarlas con conidios que provenían de medio mínimo, también los conidios sometidos a estrés osmótico y nutricional aumentaron su germinación (%) a 6h de incubación.

Con el objetivo de obtener la mayor cantidad de conidios de hongos entomopatógenos se han aplicado pulsos de oxígeno enriquecido (26%) en el cultivo de *Metarhizium anisopliae* obteniendo que la máxima producción de conidios (4.25×10^7 conidios/cm²) después de 156 h de cultivo, fue el doble con respecto a los niveles de conidios producidos bajo una atmósfera normal (Tlecuil-Beristain *et al.*, 2010). En otra investigación enfocada en la producción de conidios, pero de *B. bassiana*, se usó arroz como sustrato para comparar el efecto de dos atmósferas, una normal (21% de O₂) y otra enriquecida con CO₂ (5%). La máxima producción de conidios por gssi se obtuvo con la atmósfera normal (1.14×10^9 con/gssi), mientras que con la presencia de CO₂, la producción de conidios disminuyó hasta 85% (1.8×10^8 con/gssi). Sin embargo, la actividad amilasa se incrementó hasta tres veces (16.58 UI/gssi) con la atmósfera que contenía CO₂ con respecto a la atmósfera normal (5.41 UI/gssi), por lo tanto, se puede diseñar un proceso con base en la modificación atmosférica dependiendo del producto deseado (conidios o enzimas) (Garza-López *et al.*, 2011).

La transferencia de oxígeno hacia un microorganismo es el fenómeno de mayor importancia sobre el cual se sostiene la actividad de los microorganismos aerobios, siendo la tasa de transferencia del oxígeno el factor limitante que determina la tasa de conversión biológica (Thibault *et al.*, 2000). Lo anterior se debe a que en el metabolismo aeróbico, el oxígeno es el aceptor final en el transporte de electrones mediante el sistema de oxidasas en las mitocondrias de los hongos (Mathews *et al.*, 2002).

Por otra parte, se ha reconocido que la exposición de la hifa al aire es un estímulo en el inicio de la conidiogénesis en hongos filamentosos (Roncal y Ugalde, 2003). La aireación cumple con cuatro principales funciones en el cultivo sólido: mantiene las condiciones aerobias, desabsorbe dióxido de carbono, regula la temperatura del sustrato, y el nivel de humedad. La atmósfera gaseosa afecta significativamente el nivel relativo de producción de biomasa y la producción de enzimas (Krishna, 2005), tal como se describe anteriormente.

Una hifa expuesta directamente al aire, desarrolla un estado hiperoxidante, caracterizado por el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), en cantidades que sobrepasan la competencia celular para neutralizarlas. El estado hiperoxidante ocurre al inicio de los tres pasos morfogenéticos, durante la conidiación de *Neurospora crassa*. Se propone que la diferenciación celular surge cuando la célula utiliza mecanismos tendientes a evitar el desbalance oxidativo (Toledo *et al.*, 1994).

1.6 Efecto del oxígeno sobre el crecimiento de hongos

Se sabe que el 21% de nuestra atmósfera es dioxígeno (O_2) y que prácticamente todo es de origen biológico. Debido a que es requerido para la respiración de los organismos aerobios, en ocasiones se le ha considerado inocuo, lo cierto es que el oxígeno presenta toxicidad debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), a las cuales se tienen que enfrentar los organismos aerobios, ya que inevitablemente una de las consecuencias del metabolismo del oxígeno es la producción de ERO, como el oxígeno singulete ($\cdot O_2$), radical superóxido ($\cdot O_2^-$), radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Hansberg, 2008).

En la célula, el oxígeno entra por difusión y es reducido casi por completo a agua (H_2O), generando energía, que junto con ciertos nutrientes se traducen en crecimiento. Mientras se mantiene un equilibrio entre la entrada de oxígeno y su reducción, el estado de crecimiento es estable, sin embargo, cuando la célula no puede reducir todo el oxígeno que entra, se genera un estado hiperoxidante, por lo tanto se puede decir que el estrés oxidativo es un estado provocado por un desequilibrio entre agentes oxidantes y la capacidad de los organismos para eliminarlos (Hansberg, 2002).

Los organismos aerobios han desarrollado numerosos factores antioxidantes para hacer frente a la producción de ERO, estos factores incluyen enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasas (CAT) y peroxidasas (POX), que los desintoxican de estas moléculas peligrosas. Las células también tienen numerosos sistemas de defensa para mantener el estado redox celular y sistemas para la reparación de proteínas, ADN y lípidos dañados por ERO, estos sistemas incluyen el glutatión y la tiorredoxina dependientes de equivalentes reductores NADPH para su función (Outten *et al.*, 2005)

Para la destoxicación de ERO, el radical anión superóxido ($\cdot O_2^-$) es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la SOD, que corresponde a la primera reacción

presentada en la Figura 3. Debido a que el H_2O_2 es tóxico a concentraciones por arriba de $1 \mu\text{M}$, las CAT descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (segunda reacción) (Hansberg, 2008). La tercera reacción corresponde a la glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima que requiere glutatión reducido (GSH) para reducir el peróxido de hidrógeno a agua (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008).

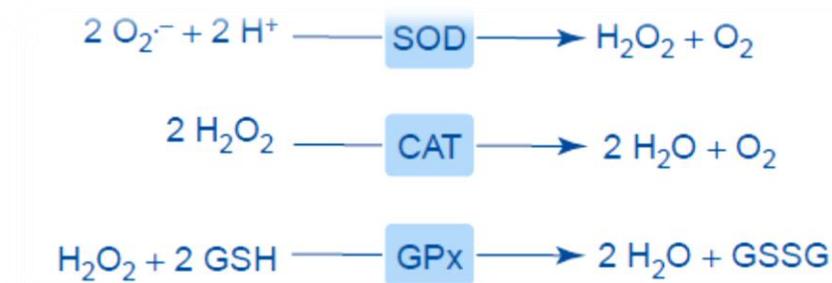


Figura 3. Estequiometría de las reacciones enzimáticas que actúan como defensa antioxidante. Tomado de Aguirre *et al.*, (2005)

En estudios realizados por Aguirre *et al.*, (2005), se probó que, en *Neurospora crassa*, las ERO son necesarias para la citodiferenciación en ciertas fases de su desarrollo celular. Al comparar una mutante de *Neurospora crassa* sin el gen de la catalasa, en condiciones de estrés (provocado con peróxido de hidrogeno), la mutante tuvo una mayor propensión que la cepa silvestre para iniciar el proceso de esporulación.

Existen estudios donde se ha probado la respuesta de diferentes hongos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera durante su crecimiento. En el estudio de Yang y Lucas (1970), se midió el crecimiento radial de diez especies de hongos filamentosos, cultivados bajo atmósferas que tuvieron un porcentaje de oxígeno desde 0% hasta 100%; nueve de las diez especies estudiadas (excepto *Aspergillus niger*) tuvieron un mayor crecimiento radial, conforme aumentaron el porcentaje de oxígeno en la atmósfera, llegando al máximo crecimiento a 30% de oxígeno, no se encontró mayor crecimiento radial cuando aumentaron el porcentaje de oxígeno desde 40 % a 100%. En el estudio realizado por Belo *et al.*, (2005) en un reactor de lote alimentado, se obtuvo una biomasa máxima (X_{max}) de *Saccharomyces cerevisiae* de 9.8 g/L bajo una atmósfera de 21% de oxígeno (0.1 MPa), mientras que al incrementar el oxígeno en la atmósfera a 100% (0.13 MPa de oxígeno puro), la biomasa máxima se incrementó a 14.4 g/L, en ese estudio también se observó un incremento en la actividad catalasa y superóxido dismutasa cuando se incremento el oxígeno a 100%.

1.7 Conservación de hongos entomopatógenos

El establecimiento de colecciones de hongos entomopatógenos por uno o varios métodos es importante para la biotecnología, porque son necesarios para asegurar la viabilidad, condiciones morfológicas y fisiológicas, así como la integridad genética de los cultivos de los hongos en el tiempo (Mier *et al.*, 2005).

Los métodos de conservación se pueden dividir en dos grupos, de acuerdo con la continuación o suspensión del metabolismo de los hongos. Los métodos que permiten metabolismo continuo del hongo incluyen el almacenamiento en agua estéril, sub-cultivos en agar, el almacenamiento en frío de 5 a 8 °C y congelador a -20 °C. Aunque el almacenamiento en agua estéril ha mostrado ser un método fácil y económico para la conservación de la mayoría de hongos, puede conducir a una pérdida en las tasas de esporulación de hongos y cambios en las características morfológicas, por lo tanto siempre debe ser complementada con otros métodos (Hernández-Rosas, 2006).

El sub-cultivo de hongos en agar es un método habitualmente utilizado para preservar los hongos debido a su sencillez, pero cuando se trata de almacenamiento de un gran número de muestras este método presenta dificultades, porque se convierte en mucho tiempo de resiembra, contaminaciones, es más probable que ocurran cambios genéticos y fisiológicos. El almacenamiento en frío y el almacenamiento en congelación han mostrado éxito en la preservación a largo plazo de los hongos entomopatógenos (López-Lastra *et al.*, 2002). Sin embargo, estos métodos pueden resultar insuficientes, debido a las variabilidades biológicas de algunos organismos, esto se debe especialmente a que los eventos que producen la atenuación pueden ser aleatorios (mutaciones) o debidos a las condiciones de cultivo, por tales motivos es necesario contar con un método que evite este tipo de cambios en la cepa (Brownbridge *et al.*, 2001).

Para suspender el metabolismo de los hongos en conservación, es posible utilizar los métodos de secado en gel de sílice, liofilización y criogénico; siendo la liofilización y la crio preservación considerados como métodos de almacenamiento que reducen la posibilidad de mutación (Oliveira *et al.*, 2010).

1.8 Bioensayos con hongos entomopatógenos

Un aspecto crucial en la investigación de actividades biológicas, es la disponibilidad de un bioensayo adecuado. Idealmente los sistemas de prueba deben ser rápidos,

reproducibles, baratos y con una alta capacidad de procesamiento de muestras (Hostettmann y Wolfender, 1997).

En este trabajo, se utilizó *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) que es una plaga de las colmenas, alimentándose de polen, lo que provoca la destrucción de los panales de las colmenas débiles o enfermas. *Galleria mellonella*, es uno de los insectos más devastadores de cera en el mundo y produce pérdidas económicamente importantes. Un problema adicional que presenta la polilla de la cera es que las poblaciones a menudo son transportados desde las zonas infestadas por las actividades humanas (Hussein *et al.*, 2012).

En este estudio también se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) que es una plaga cosmopolita de granos almacenados y cereales, por lo cual infesta graneros, silos y molinos de grano, causando daños y pérdidas económicas debido a que las larvas son muy voraces. Esta plaga es originaria de Europa, pero también se ha distribuido por la actividad humana (Ramos *et al.*, 2002)

2 ANTECEDENTES

Como se ha mencionado antes, en el caso de los hongos entomopatógenos la unidad infectiva contra los insectos plaga son las esporas o conidios, por lo que se hace necesario contar con métodos para producir la mayor cantidad de estas unidades infectivas, a la par se requiere que éstos cumplan con parámetros de calidad para que sean efectivos.

Un método para incrementar la virulencia de cepas de *Beauveria bassiana*, a las dos cepas silvestres Bb 4 y Bb 88 facilitados por el Colegio de Posgraduados, se basó en mutaciones provocadas por luz ultravioleta, seleccionando mutantes en medio con quitina y 2-desoxiglucosa, se seleccionaron las cepas mutantes que no perdieron capacidad de conidiación ni de secreción de enzimas, además con la condición de que tuvieran una velocidad de crecimiento igual o mayor que la cepa silvestre (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

A las cepas que cumplían con estas condiciones se les realizaron pruebas de virulencia sobre *Sphenarium purpurascens*; el aislado Bb 885.2 fue el más virulento, con un TL₅₀ (Tiempo Letal 50, que es el tiempo en alcanzar el 50% de muerte) de 4 días,

sustancialmente mejorado, comparado con el aislado silvestre (Bb 88) y el aislado mutante 885.5 con un TL_{50} de 6 y 8 días, respectivamente.

Un método para producir mayor cantidad de conidios, se puede lograr a partir de la variación en los sustratos donde se hace crecer a hongos entomopatógenos (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). En este contexto, el medio formulado con harina de avena con peptona de carne con una relación C/N de 9.32, incrementó hasta un 56% la producción de conidios comparado con el medio que solo contenía harina de avena (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010).

Con el mismo objetivo, se ha estudiado la influencia de exponer el cultivo de hongos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* a una atmósfera hiperoxidante (atmósfera con una concentración de oxígeno de 26%). Los resultados que reportó Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010) indican que la concentración de oxígeno influyó sobre la producción de conidios de *M. anisopliae*, lo que impactó de estos resultados es que además no se modificó la calidad de los conidios, referido a su infectividad sobre el insecto *Tenebrio molitor*. Por otro parte Miranda *et al.*, (2011), reportó que la atmósfera oxidante (26 % de oxígeno) aumentó cinco veces la cantidad de conidios (expresados como con/cm²) de *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302, pero disminuyó hasta 3.4 veces la de *Isaria fumosorosea* CNRCB1, comparado con las cepas que se cultivaron con atmósfera normal (21% de oxígeno). Por otro lado, el aislado de *Beauveria bassiana* 882.5 disminuyó, pero en hasta 81 veces la producción (conidios/ cm²) comparado con la atmósfera normal. Por último, la cepa de *Metarhizium anisopliae* aumentó su producción (conidios/ cm²) en 1.75 veces, sin embargo se desconocía si esta respuesta se logra para distintas concentraciones de oxígeno, considerando concentraciones por arriba del 26%, si la respuesta en el rendimiento es proporcional a la concentración de oxígeno o si existe una respuesta diferente en cuanto a la calidad de los conidios que se producen bajo estas condiciones.

3 JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de hongos entomopatógenos para el control de plagas de insectos ha experimentado un considerable progreso en los últimos años. El empleo de estos agentes de control biológico presenta ventajas, como son: seguridad para la salud humana y para la fauna útil, reducción de residuos de insecticidas en los alimentos e incremento de la biodiversidad del medio. Los hongos sobresalen entre los microorganismos

entomopatógenos porque infectan a los insectos a través del tegumento, acción por contacto, lo que les permite el control de varios grupos de insectos, siendo los conidios las unidades infectivas más utilizadas. Sin embargo, un empleo más eficiente y generalizado de estos agentes en el control depende en gran medida de la mejora de su velocidad de acción y virulencia, es decir en la reducción de los tiempos letales a concentraciones menores de conidios (Quesada *et al.*, 2009). En México, el desarrollo de la tecnología para la producción de estos hongos entomopatógenos se realiza con la finalidad de utilizar herramientas alternativas al uso exclusivo de insecticidas químicos. Un ejemplo reciente es el control del HLB (Huanglongbing) o dragón amarillo que es una enfermedad citrícola que afecta a los cultivos de México desde 2008, pero que hasta el 2012 no se ha podido controlar (FAO, 2012)

Por otra parte se sabe que el estrés oxidativo es uno de los factores que afecta la producción de conidios, aunque la respuesta al estrés oxidativo, que protege a los organismos de los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno, ha sido ampliamente estudiada en procariotas y eucariotas, la información sobre los hongos entomopatógenos es escasa (Shaukat *et al.*, 2011).

En este contexto, se ha observado que enriquecer la atmósfera con oxígeno (26%) a través de pulsos, aplicados desde la fase pre estacionaria del crecimiento de *Metarizium anisopliae*, ha logrado incrementar el rendimiento de los conidios respecto a la biomasa, hasta en 2.6 veces con respecto a la atmósfera normal, sin afectar el porcentaje de germinación, viabilidad e hidrofobicidad relativa (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). A pesar de que estos resultados son interesantes, no se sabe cuál es el efecto de distintas concentraciones de oxígeno sobre estos mismos parámetros.

En este trabajo, se evaluaron parámetros de producción de conidios de *Metarizium anisopliae*, cultivado en atmósfera con distintas concentraciones de oxígeno. Así también se determinó cuál es el efecto de estas concentraciones sobre parámetros de calidad de conidios de *Metarizium anisopliae*. Estos resultados serán de importancia práctica en el diseño de sistemas de producción, con reproducibilidad en los rendimientos y calidad de los lotes de conidios obtenidos.

4 HIPÓTESIS

La concentración de oxígeno en la atmósfera alterará proporcionalmente la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* sin detrimento de su calidad.

5 OBJETIVOS

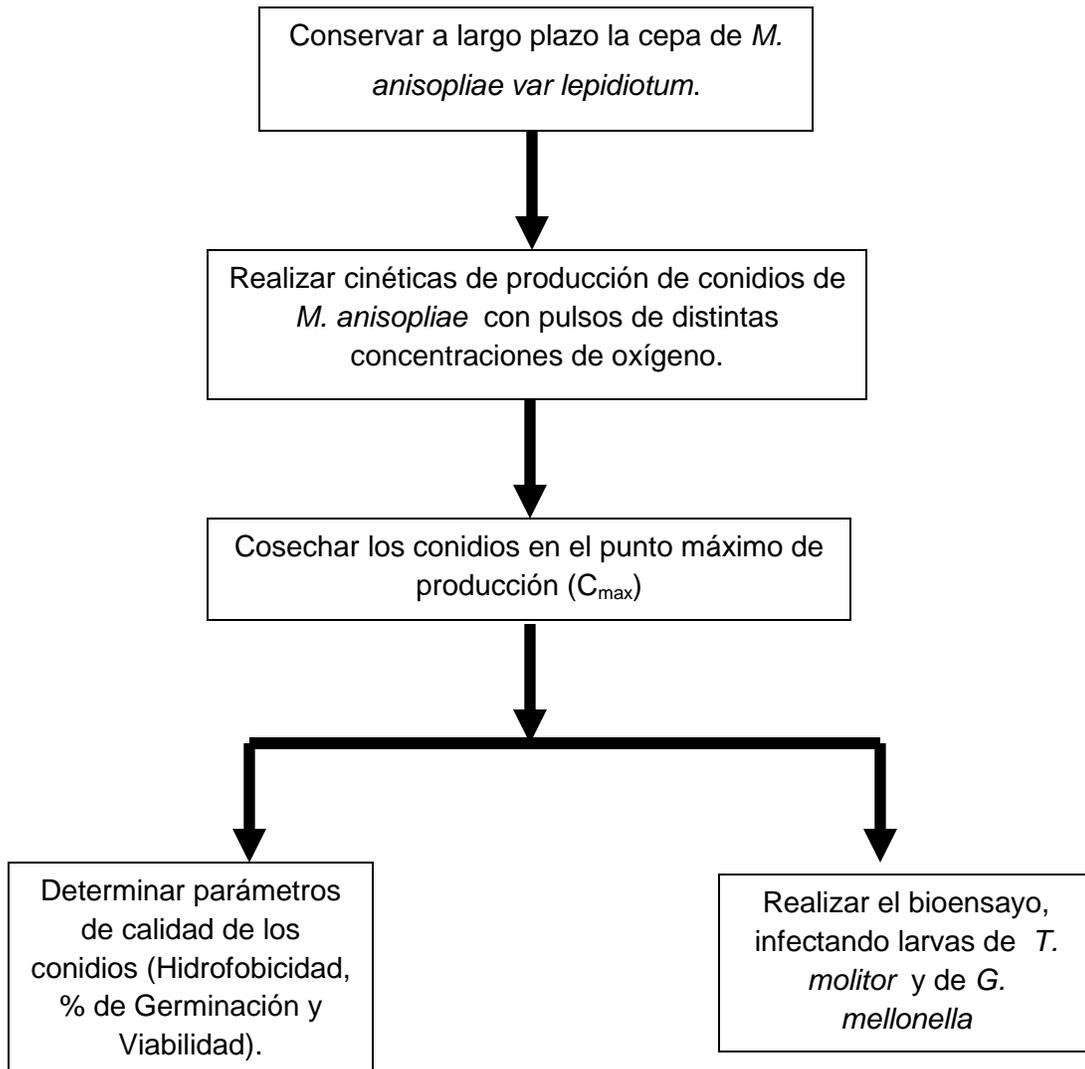
5.1 Objetivo General

Determinar el efecto de la concentración de oxígeno en la atmósfera sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, así como la calidad de éstos.

5.2 Objetivos particulares

- Evaluar la calidad de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conservados por el método de liofilización.
- Determinar el efecto de la concentración de oxígeno en la atmósfera sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*.
- Determinar el efecto de distintas concentraciones de oxígeno sobre la infectividad de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

El hongo utilizado fue el aislado de *Metarhizium anisopliae* CP-OAX que pertenece a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados en Texcoco, México. Este hongo se identificó por análisis de secuencia de los fragmentos ITS de los genes ribosomales como *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Los datos de estas secuencias se pueden consultar en la base de datos de NCBI, con número de acceso: FJ876298 (Tlecuil-Beristain *et al.*, 2010).

7.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fue el formulado por Tlecuil-Beristain *et al.*, (2010) que consistió de 33.3 g/L de harina de avena (No. 1®) con 10 g/L de peptona de carne (Bioxon) además de 15 g/L de agar bacteriológico (Bioxon), este medio de cultivo se reportó con una relación carbono-nitrógeno de 9.32.

7.3 Cultivo del inóculo y reactivación de la cepa

La cepa de *M. anisopliae*, se inoculó en un medio que contenía cutícula de *Tenebrio molitor* (adulto) y agar bacteriológico, según Barranco-Florido *et al.* (2005) con el propósito de reactivar la cepa, se cultivó a 28° C y fotoperiodo luz-oscuridad 12:12. Después de 7 días, se conservó la cepa en agua desionizada estéril (López-Lastra *et al.*, 2002), se almacenaron a 4 °C viales de vidrio con capacidad de 10 mL, que contenían 4 mL de agua desionizada, en los cuales se colocaron 4 trozos de agar (5 mm²) con el cultivo de *M. anisopliae*.

A partir de los conidios conservados en agua destilada se obtuvo el inóculo. Se adicionó 0.5 ml de Tween 80 al 0.05%, se agitó en vortex para posteriormente vaciarlos y dispersarlos sobre un matraz que contenía 20 mL de medio agar avena-peptona previamente esterilizado. La cepa, se mantuvo a 28° C y fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 durante 7 días. Los conidios obtenidos de este cultivo fueron utilizados para iniciar las cinéticas de producción de conidios, como se describe más adelante.

7.4 Conservación de la cepa de *Metarhizium anisopliae* por liofilización

La cepa de *Metarhizium anisopliae* se cultivó en botellas serológicas utilizando el medio avena-peptona a 28°C durante 7 días, posteriormente se cosecharon los conidios con 20 mL de Tween 80 al 0.05% raspando la superficie del cultivo con una espátula estéril, la suspensión se concentró pasando la suspensión obtenida a otro cultivo y así sucesivamente hasta obtener una suspensión concentrada la cual se filtró con gasa estéril y posteriormente se estandarizó a una concentración de 1×10^{10} con/mL, después de obtener esta suspensión se agregó leche descremada (Svelty®) al 10% suficiente para obtener una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^9 con/mL.

La leche descremada (Svelty®) al 10% se agregó como agente crio protector (Hernández-Rosas, 2006) que previamente fue esterilizada a 120°C por 10 min, por otro lado se esterilizaron ampollas (Wheaton ®) con capacidad para 10 ml a 120°C por 2 h; finalmente la suspensión se sometió a agitación en vórtex por 1 min para asegurar su homogeneidad.

En un ambiente estéril se agregó 1 mL de suspensión a cada ampollita, con lo que la concentración de conidios contenidos en cada ampollita quedó en 1×10^8 con/ mL, la suspensión de conidios se congeló a -50°C con una mezcla de hielo seco y acetona. Las ampollitas tapadas con algodón se colocaron en una liofilizadora (LYPH-LOCK6®) durante 6 horas a -50°C, a 10 micrones de Hg, por último, se retiraron los viales y se sellaron con mechero, estos se conservaron a temperatura ambiente (Toegel *et al.*, 2010).

Como control, se utilizó 1 mL de leche descremada que pasó el mismo procedimiento mencionado anteriormente sin la suspensión de conidios. Las ampollitas se mantuvieron al abrigo de la luz y a temperatura ambiente, después de una semana, un mes y dos meses de realizado el procedimiento, se abrió una ampollita control y otra con la cepa conservada, estas se rehidrataron con 1 mL de Tween 80 al 0.05% y se propagaron en medio avena-peptona. El cultivo se mantuvo durante 10 d. A los conidios obtenidos de esa propagación se les realizó la prueba de porcentaje de germinación, como se describe más adelante.

Antes de realizar el proceso de liofilización, se cuantificó el porcentaje de germinación que tenían los conidios, con el propósito de conocer el porcentaje de germinación de la cepa

antes de pasar por el proceso. Este fue tratado como un control de la germinación de la cepa de *M. anisopliae*.

7.5 Cinética de producción de conidios

La cepa de *Metarhizium anisopliae* fue cultivada en medio avena-peptona, en botellas serológicas de 125 ml. A las cuales se les agregó 10 ml de medio, el inóculo en todos los casos tuvo una concentración de 5.7×10^5 con/cm². Las botellas se cerraron con tapones de algodón, hasta las 60 h (en la fase pre estacionaria) (Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010). Una vez sellando las botellas con tapones de plástico, se modificó la atmósfera con ayuda de dos agujas, una que permitió la salida y otra para la entrada del gas (PRAXAIR); se introdujo el gas con un flujo de 13.8 cm³/s proveniente del tanque que contenía la concentración de oxígeno a probar (16%, 23%, 26% y 30%) durante 1.2 min. Se renovaron la atmósferas cada 24 h, además se probaron concentraciones atmosféricas de oxígeno de 21% con recambio y sin recambio (con tapones de algodón).

Los cultivos se mantuvieron a 28°C, con un fotoperiodo de luz y oscuridad 12:12. Para cada tratamiento se realizaron tres réplicas, la producción de conidios se cuantificó cada 24 h.

7.6 Cuantificación de la producción de conidios

Para cuantificar los conidios producidos para cada tratamiento, se adicionaron 20 ml de Tween 80 al 0.05% a cada una de las botellas y se agitó con agitador magnético que raspó la superficie sólida. El conteo de los conidios se realizó con cámara de Neubauer con el objetivo a 40 X del microscopio óptico (BOECO). La producción se reportó como conidios por centímetro cuadrado (con/cm²), al considerar el área sobre la cual crece el hongo.

7.7 Parámetros de calidad de conidios de *Metarhizium anisopliae*

7.7.1 Germinación (G)

A los conidios cosechados a las 156 h de cultivo se les determinó el porcentaje de germinación (**G**). Sobre un portaobjetos se colocó, en condiciones de asepsia, un cuadro (400 µL) de la solución 1.5% de agar-agua (Samuels *et al.*, 1989). En la superficie se inoculó 100 µl de una suspensión de conidios cuya concentración se estandarizó en 1×10^6 con /ml. El portaobjetos se colocó sobre un disco de papel filtro húmedo (con 3 ml

de agua esterilizada) dentro de una caja Petri y se incubaron a 28° C por 14 h (Monzón, 2001). Por último se observó al microscopio óptico (40 X) y para determinar el porcentaje de germinación se contaron al menos 100 conidios; se consideró que un conidio había germinado cuando el tubo germinativo fue mayor o igual al ancho del conidio sin germinar (Safavi *et al.*, 2007).

7.7.2 Viabilidad (V)

La viabilidad de los conidios de *M. anisopliae* se probó cultivando sobre Agar Maltosa Sabouraud (AMS) con desoxicolato de sodio (0.5 g/ L). El medio de cultivo se esterilizó previamente a 120°C por 15 min en autoclave; la composición del medio de cultivo se presenta en la Tabla 2. Posteriormente se inoculó cada caja Petri con 30 µL de una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^4 con/mL, por lo tanto se sembraron por superficie 300 conidios obtenidos de cada tratamiento, para cada tratamiento se realizaron tres réplicas. Después de 96 h a 28° C se contaron las colonias formadas y la viabilidad se reportó como unidades formadoras de colonias (UFC) (Montesinos-Matías, 2008).

Tabla 2. Composición del medio Agar Maltosa Sabouraud (AMS)

Compuesto	Concentración (g/L)
Maltosa	20
Peptona de carne	2.5
Peptona de caseína	2.5
Agar Bacteriológico	15
Extracto de levadura	0.5
Desoxicolato de sodio	0.5

7.7.3 Hidrofobicidad de la superficie de los conidios (H)

La hidrofobicidad de la superficie de los conidios (**H**) se determinó por exclusión de fases. Los conidios de *Metarhizium anisopliae* cosechados en cada tratamiento se centrifugaron a 5000 rpm por 30 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con agua destilada, nuevamente se centrifugo la suspensión y se desechó el sobrenadante, finalmente se realizó un lavado con nitrato de potasio (0.1 M) para neutralizar la carga de la superficie de los conidios. Se estandarizaron las suspensiones de conidios a una concentración final de 1×10^7 con/mL. En un tubo de ensayo se transfirieron 3 mL de la

suspensión de los conidios y se adicionó 1 mL de *n*-hexadecano (SIGMA) y se agitó por 20 s. Después de 30 min la fase acuosa fue removida con una pipeta Pasteur y se determinó la densidad óptica (OD_{ac}), también se determinó la densidad óptica a la suspensión de conidios (OD_{total}), La densidad óptica de la suspensión y de la fase acuosa fue determinada en el espectrofotómetro (Perkin-Elmer) a 660 nm y tres réplicas por tratamiento, el porcentaje de hidrofobicidad fue calculada con la ecuación:

$$H = 100 * \left(1 - \frac{OD_{ac}}{OD_{total}}\right)$$

Donde, OD_{total} es el valor de la densidad óptica de la muestra inicial (suspensión de conidios). OD_{ac} es el valor de las densidad óptica de la fase acuosa después del tratamiento. (Shah *et al.*, 2007).

7.7.4 Bioensayo

Para las pruebas de infectividad, se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* y de *Galleria mellonella* que se obtuvieron de la empresa empresa Petmmal S.A.de C.V, para la ejecución del bioensayo sólo se utilizaron larvas de *Tenebrio molitor* con un peso de 100 ± 20 mg y larvas de *Galleria mellonella* con un peso de 6 ± 0.06 mg. En la Figura 4 se muestra el aspecto de los hospederos que fueron utilizados en el bioensayo.



Figura 4. Larva de *Tenebrio molitor* (Izquierda). Larva de *Galleria mellonella* (Derecha)

Cada unidad experimental consistió de 10 larvas, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro y se utilizaron 3 réplicas por tratamiento (16%, 21% A, 21% R 23%, 26% y 30% de O_2). Las larvas de *Tenebrio molitor* fueron sumergidas durante 15 s, en 20 mL de una suspensión de conidios de *Metarhizium anisopliae* con una concentración de 1×10^8 con/mL provenientes de los cultivos a los que les fue aplicado el recambio atmosférico y los que se dejaron solo con tapón de algodón (21% A) (Goettel e Inglis, 1997).

Las larvas de *Galleria mellonella* fueron sumergidas durante 5 s en 20 mL de una suspensión de conidios de *Metarhizium anisopliae* provenientes de los cultivos a los que les fue aplicado el recambio atmosférico y los que se dejaron solo con tapón de algodón, la suspensión de conidios se estandarizó a una concentración de 5×10^7 con/mL (Fang y Bidochka *et al.*, 2006) Para los controles las larvas fueron sumergidas (15 y 5 s respectivamente) en una solución de Tween 80, al 0.05%, estéril.

Los insectos se pasaron a las cajas de Petri, durante 10 min aproximadamente, hasta que el cuerpo del insecto estuvo completamente seco, y se agregó una mezcla de salvado de trigo: avena (1:1) estéril a las unidades con larvas de *Tenebrio molitor* y alimento Wax^{MR} de la empresa Petmmal S.A.de C.V. a las unidades con larvas de *Galleria mellonella*.

Las unidades experimentales se incubaron a 28°C y fotoperiodo de luz-oscuridad 12:12, en contenedores de plástico transparente con papel filtro húmedo, el porcentaje de sobrevivencia se registró cada 24 h durante 15 d. Tras la muerte del insecto, este fue retirado de la caja de Petri en donde se encontraba, y se colocó dentro de una nueva caja Petri estéril la cual fue puesta en otro contenedor con papel filtro húmedo para promover el crecimiento del hongo y confirmar que la muerte fue ocasionada por la infección de *Metarhizium anisopliae*.

Al final de bioensayo, se estimó el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad (TL₅₀), la velocidad específica de muerte (k, d⁻¹) y el tiempo de retardo de muerte (t₀, d), a partir del ajuste de los datos al modelo de decaimiento exponencial que se muestra a continuación, graficando el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo.

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S$$

$$Y = 100 \text{ si } 0 \leq t \leq t_0$$

Donde:

Y = porcentaje de sobrevivencia en el tiempo *t*

k = tasa específica de muerte (d⁻¹)

t₀ = tiempo de retardo en el que ocurre la primera muerte (d)

S = nivel (%) de sobrevivencia asintótica.

Este modelo corresponde a una ecuación diferencial de primer orden que indica el tiempo de retardo de muerte con la condición inicial $Y \rightarrow S$ para $t \rightarrow \infty$ (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

7.8 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para el análisis del efecto de las diferentes concentraciones de oxígeno en la atmósfera, la variable analizada fue la producción de conidios (con/cm²), para los parámetros de calidad la variable analizada fueron los porcentajes de G, V y H; en lo que respecta a los parámetros de bioensayo (k, t₀, S), los mejores ajustes de los datos experimentales se obtuvieron mediante el algoritmo de regresión no lineal del programa PASW Statistics Data Editor 18.0. En general se utilizó el software PASW 18.0 versión para Windows para los análisis presentados.

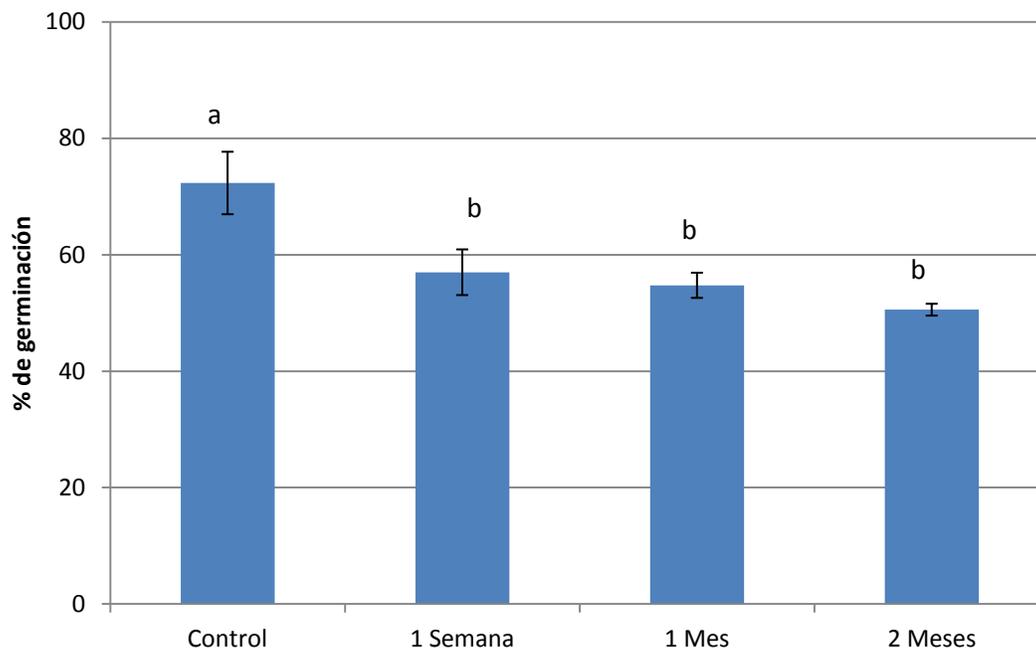
8 RESULTADOS

8.1 Conservación de la cepa de *M. anisopliae* y prueba de calidad

Después de someter a los conidios de *M. anisopliae* al proceso de liofilización, se reactivaron con 1 mL de Tween 80 al 0.05%. El porcentaje de germinación fue medido como parámetro de calidad de los conidios sometidos al proceso de liofilización. Este parámetro fue medido a una semana, un mes y dos meses de realizado el proceso. El porcentaje de germinación se midió después de una semana con el objetivo de medir la pérdida de germinación (%) que sufrió el hongo por pasar por este proceso, posteriormente se midió este mismo parámetro, para observar si el tiempo en conservación a temperatura ambiente afectó la germinación de los conidios de *M. anisopliae*.

En la Gráfica 1, se muestra el porcentaje de germinación de los conidios de *M. anisopliae* después de 10 d de cultivo en medio avena-peptona, propagados a partir de ampollitas. Después de una semana de almacenamiento, la germinación (%) fue de 57 ± 3.9 %; a un mes de almacenamiento fue de 55 ± 2.1 % y dos meses 51 ± 1.0 %, entre estos valores no se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$), por lo tanto los resultados muestran que hasta dos meses de conservación, no llevó a una pérdida significativa de la germinación, al comparar la germinación de la cepa a 1 semana de realizado el proceso.

Se encontró en el estudio realizado por Rodrigues de Faria *et al.*, (1999) que después de 24h de realizado el proceso de liofilización una cepa de *M. anisopliae* (CG053) tuvo una germinación de 44.8%, es necesario mencionar que las ampollitas en ese estudio se mantuvieron a 4°C, también hay estudios donde después de una semana de almacenamiento se encontraron porcentajes de germinación más altos (62.5%) pero también la cepa liofilizada de *M. anisopliae* fue mantenida a 6° C (Horaczek y Viernstein, 2004).



Gráfica 1. Porcentaje de germinación de los conidios obtenidos a partir de una cepa liofilizada de *M. anisopliae*

En la Gráfica 1, también se muestra la germinación que tuvo el control (porcentaje de germinación de la cepa *M. anisopliae* antes del proceso de liofilización); el descenso en la germinación solo por pasar por el proceso de liofilización representa un 21.3% considerando que la cepa en condiciones normales tuvo una germinación de 72.3%; el agente protector utilizado en este experimento fue leche descremada y se eligió ya que ha mostrado buenos resultados con otros hongos entomopatógenos (Stephan y Zimmermann, 1998), además de ser económico y de fácil acceso; la pérdida de germinación con este mismo agente protector no fue tan grande como la reportada por Toegel *et al.*, (2010), quienes reportan una pérdida germinación del 90%, aunque en ese

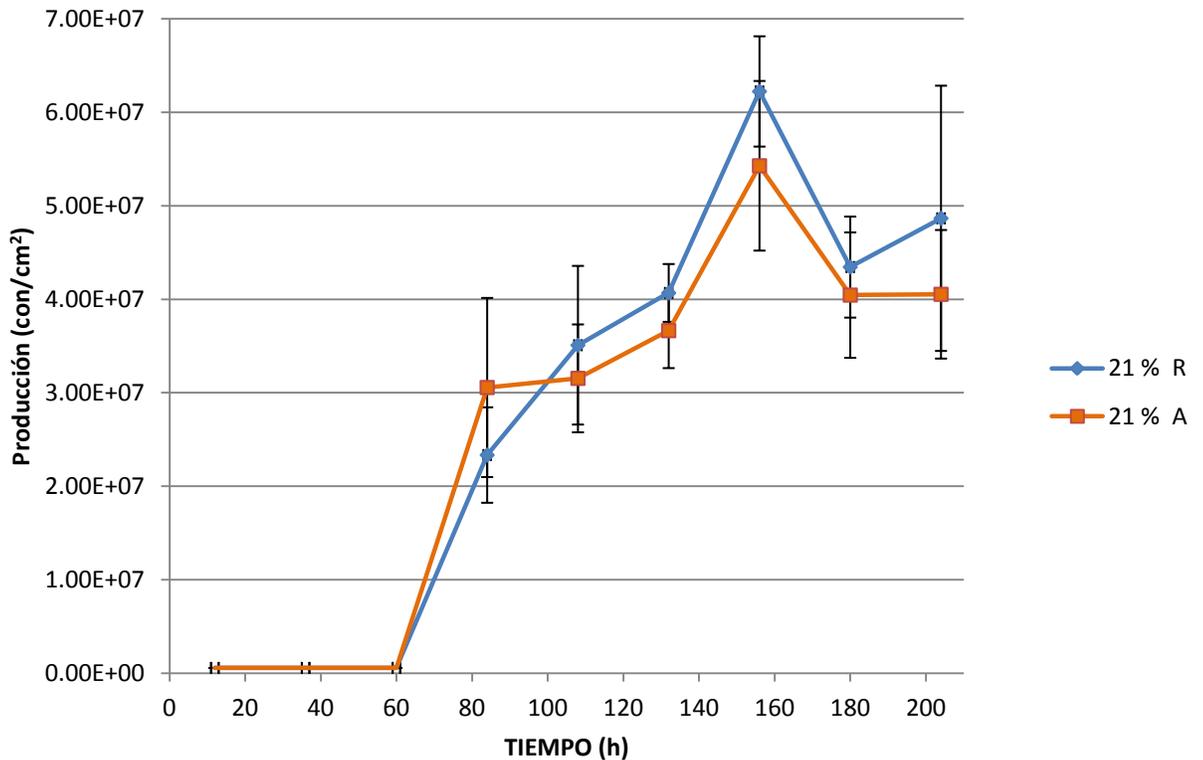
mismo estudio se muestra que existen protectores que ofrecen una menor pérdida de la germinación tales como el manitol, con el cual no se perdió la capacidad de germinación por una cepa de *Metarhizium anisopliae*.

En general el método de conservación propuesto, es apropiado para *M. anisopliae*, aunque la pérdida de germinación inmediata fue bastante grande, después del almacenamiento no se encontraron diferencias significativas hasta por dos meses de conservación. Además, es importante mencionar que aunque este método de conservación requirió de una inversión inicial importante en términos de mano de obra y equipo, a largo plazo este sistema presenta ventajas como: fue posible mantener las ampollitas a temperatura ambiente, por lo cual no fue necesario depender de almacenamiento a temperaturas bajas; asimismo. Este método de conservación permite mantener cepas incluso por años y tiene mayor posibilidad de evitar la pérdida de virulencia y mutaciones (Stephan y Zimmermann, 1998).

8.2 Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*

8.2.1 Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* a 21% de oxígeno

En la Gráfica 2, se muestran los resultados obtenidos de la cinética de producción de conidios en atmósfera normal, es decir que durante la cinética el porcentaje de oxígeno contenido en la unidad experimental fue de 21% de O₂ con la diferencia de que las unidades experimentales estuvieron tapadas de distinta forma: algunas fueron tapadas con tapones de algodón a la que se llamó 21% A, y otras que fueron selladas con septos de goma a las 60 h de cultivo y a las que se realizó intercambio de gases cada 24 h, a la que se llamó 21% R.



Gráfica 2. Cinética de producción de conidios de *M. anisopliae* en atmósfera de 21% de oxígeno con recambio y sin recambio de atmósfera.

El rendimiento de conidios en el día máximo de producción (156 h) fue de 6.2×10^7 con/cm² ($\pm 0.59 \times 10^7$) con el tratamiento de recambio de atmósfera cada 24 h, mientras que con el tratamiento sin recambio se obtuvo un rendimiento de 5.4×10^7 con/cm² ($\pm 0.9 \times 10^7$), entre estas producciones no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) al realizar una prueba de “t” de student. En el estudio realizado por Tlecuitl- Beristain *et al.*, (2010) se obtuvieron 2.08×10^7 con/cm², también en medio avena con peptona y sin recambio, siendo esta producción 2.5 veces menor que la reportada en el presente estudio, sin embargo se encuentran en el mismo orden de magnitud.

Un factor que pudo haber influido en los resultados es que, cuando se expusieron las botellas al ambiente, es decir cuando se sacan de la incubadora (28 °C) y se realiza el recambio de atmósfera, éstas no se encuentran siempre a la misma temperatura, ya que pudo cambiar en cada época en la que se realizaron los distintos estudios, Esto afecta la conidiación de hongos entomopatógenos y son tan importantes que se ajustan hasta

alcanzar un rendimiento máximo de conidios, por otro lado la humedad relativa, el sustrato (marca de avena), el fotoperiodo utilizado, se han reconocido como factores que afectan la producción de conidios (Cherry *et al.*, 1999).

En el estudio realizado por Tlecuil-Beristain *et al.*, (2010) se cuantificó el CO₂ en unidades experimentales tapadas con septos de goma (21% R). A estas unidades se aplicaron recambios atmosféricos cada 24 h con aire comprimido estéril, y se encontró que en este tipo de unidades se acumuló hasta un 15% de CO₂, lo que sugiere que no hay difusión de gases en las unidades experimentales, mientras que en las unidades tapadas con tapones de algodón (21% A), no hubo acumulación de CO₂, lo que implica que los tapones de algodón permitieron la difusión del CO₂ generado por el metabolismo de *M. anisopliae*.

En este estudio, el experimento de recambiar la atmósfera (21% R) y dejar las unidades con tapón de algodón (21% A) fue realizado con el objetivo de determinar si la acumulación de CO₂ durante 24 h antes del recambio influyó sobre un aumento o disminución en la producción de conidios de *M. anisopliae*.

El hecho de no haber encontrado diferencia significativa en ninguno de los puntos de la cinética realizada a 21% de oxígeno (Gráfica 2), indica que el CO₂ acumulado durante 24 h dentro de la unidad experimental no incrementó o redujo la producción de conidios de *M. anisopliae*, y que solo por intercambiar la atmósfera donde se cultivó al hongo no provocó algún cambio en la conidiación.

Estos resultados también indican que *Metarhizium anisopliae* CP-OAX toleró bien la acumulación de hasta el 15% de CO₂ (Tlecuil - Beristain *et al.*, 2010) dentro de la unidad experimental. Además como se muestra en la Tabla 3 no se afectó la calidad de los conidios, ya que con los resultados de la pruebas de calidad se realizaron pruebas de “t” de student con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, y no se observó diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos empleados.

Tabla 3. Pruebas de calidad de conidios de *M. anisopliae* producidos en atmósfera de 21% de oxígeno, con recambio y sin recambio de atmósfera.

Tratamiento	Germinación (%)	Viabilidad (%)
21%con recambio	75.5 ± 3.2	71.6 ± 1.5
21% sin recambio	76.6 ± 8.3	75.1 ± 2.3

A diferencia de *M. anisopliae*, el cultivo en medio sólido de *Beauveria bassiana* utilizando arroz como sustrato y dos composiciones atmosféricas; se encontró que con una atmósfera normal (aire, 21% de O₂) se obtuvieron 1.14x10⁹ conidios/gssi, mientras que con una atmósfera de 21% de oxígeno enriquecida con 5 % de CO₂, la producción de conidios disminuyó hasta 85% (1.8x10⁸ conidios/gssi) (Garza-López *et al.*, 2011), ese trabajo coincide con otros como el de Desgranges y Durand (1990), quienes reportaron que el incremento en el porcentaje de CO₂ implicó un descenso en la conidiación, incluso con un valor de 2 % de CO₂, la conidiación de *Trichoderma viride* prácticamente se inhibió.

Aunque existen trabajos que reportan que el CO₂ sí tiene un efecto positivo para el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* con una concentración de este gas desde 5 a 10 % (Han y Nout, 2000; Soccol *et al.*, 1994); Desgranges y Durand (1990) también reportaron que cepas de *Aspergillus* mostraron diferente sensibilidad, con *Aspergillus niger* S5 la conidiación se incrementó aproximadamente 17 % en presencia de 2 % de CO₂.

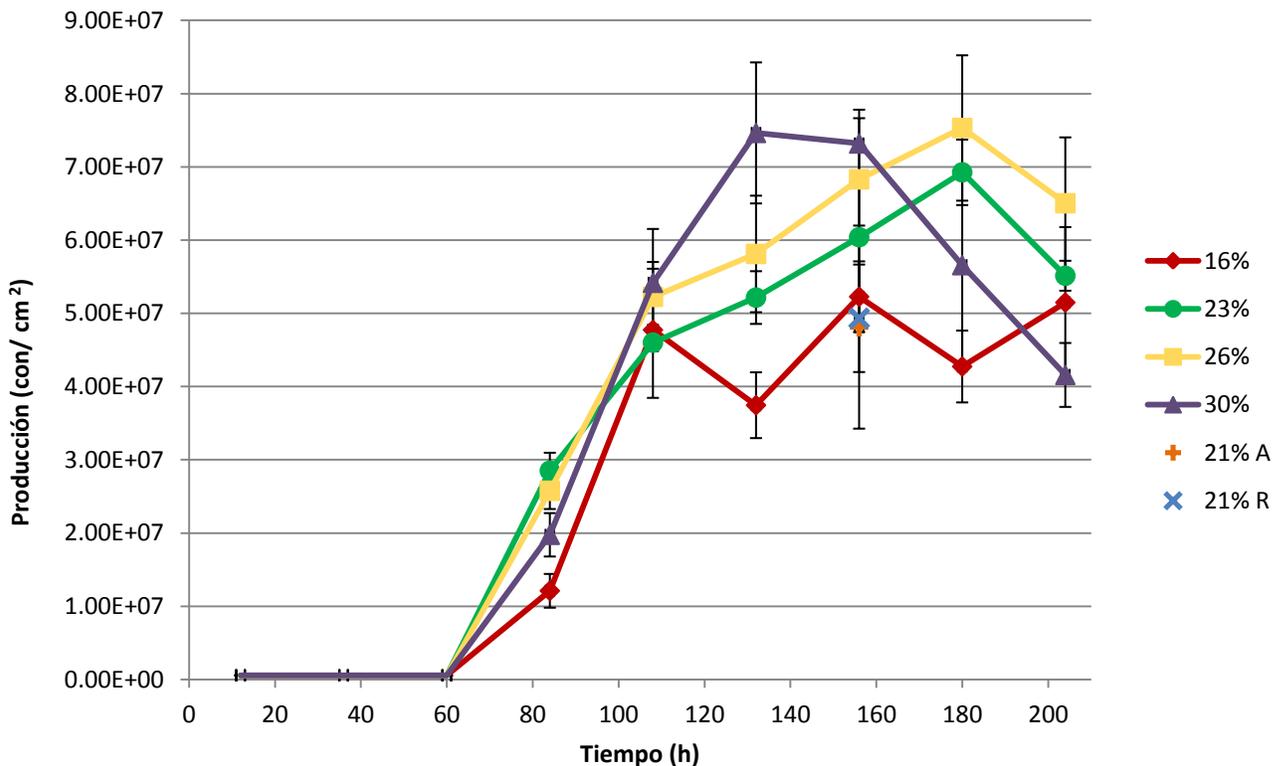
Lo que queda claro es que el grado de sensibilidad cambia en cada organismo, favoreciendo o deteriorando la conidiación. Además, los hongos filamentosos toleran diferentes concentraciones de CO₂ en la atmósfera.

8.2.2 Cinética de producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* con diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera

Como ya se había visto en otro estudio (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010), aumentar el porcentaje de oxígeno a 26 %, incrementó la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* hasta en 2 veces a las 156 h de cultivo respecto a la atmósfera normal, que contiene 21% de oxígeno.

Con el objetivo de determinar el efecto de la concentración de oxígeno en la atmósfera del cultivo de *Metarhizium anisopliae* se realizaron cinéticas de producción de conidios con recambio atmosférico a través de pulsos de distintas concentraciones: 16%, 21%, 23%, 26% y 30% de oxígeno, teniendo siempre como testigo de una producción normal a 21% de oxígeno o atmósfera normal.

El resultado de la producción de conidios debido a la modificación en la atmósfera se muestra en la Gráfica 3, en estas cinéticas de producción de conidios se puede observar que la cantidad de oxígeno en la atmósfera sí afectó la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*, ya sea de una manera positiva (incremento en la producción) o negativa, disminuyendo tal parámetro.



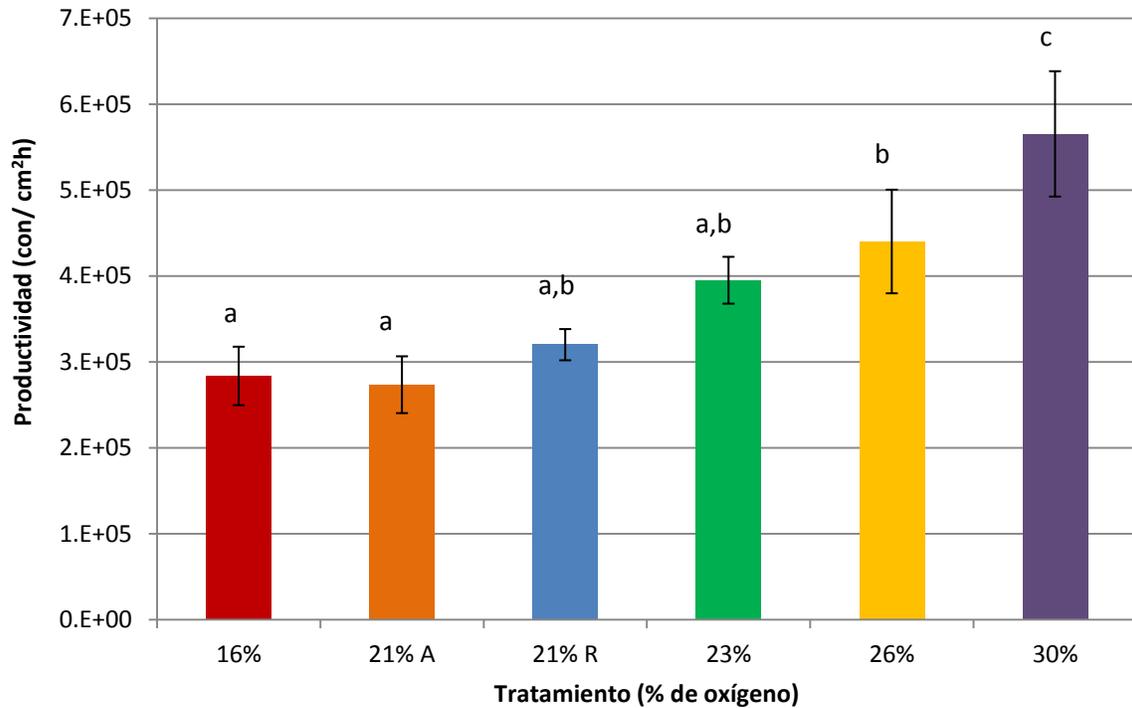
Gráfica 3. Cinética de producción de conidios obtenidos a diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera.

Se observó que aumentar el porcentaje de oxígeno a 26 %, se incrementó la cantidad de conidios. En estas cinéticas de producción se observó que el aumento en la cantidad de conidios tuvo un límite cuando se añadió más oxígeno a la atmósfera (> 21%), es decir hay un máximo de conidios por centímetro cuadrado; sin embargo fue posible mejorar la productividad al reducir el tiempo en que se obtuvieron los conidios. Para producir 7.8 X

10^7 con/ cm² ($\pm 1.2 \times 10^6$) modificando la atmósfera con pulsos de oxígeno a 30% se requirieron 132 h, mientras que se produjeron 7.5×10^7 ($\pm 9.9 \times 10^6$) con 26 % de O₂ en un mayor tiempo (180 h).

Se alcanzaron niveles de producción de conidios con pulsos de 30% de oxígeno a las 132h, similares a aquellas que se consiguieron con 26% a las 180 h, los resultados se presentan en la Gráfica 4, en la que se puede observar que la productividad (con/cm²h) de conidios se incrementa en las unidades tratadas con concentraciones de oxígeno por arriba del normal (21%).

Estos rendimientos son comparables con otros estudios si se considera el tiempo de producción de conidios, siendo la productividad obtenida en atmósfera normal (21% O₂) de 2.7×10^5 con/cm²h, con pulsos de 26% de oxígeno de 4.4×10^5 con/cm²h, y con pulsos de 30% de oxígeno fue de 5.6×10^5 con/cm²h. En el estudio realizado por Kamp y Bidochka, (2002) se produjeron los conidios de *Metarhizium anisopliae* sobre PDA de los aislados 2575, 54 A-1b, MAA1-2iii y HAA2-2b, la productividad para cada aislado fue de: 4.57×10^5 , 1.62×10^5 , 1.01×10^5 y 0.68×10^5 con/cm²h respectivamente. En los resultados obtenidos por Tlecuil- Beristain *et al.*, (2010) se obtuvieron valores similares, también en medio avena con peptona siendo 1.33×10^5 con con/cm²h en la atmósfera con 21% sin recambio y de 2.7×10^5 con/cm²h en atmósfera con pulsos de 26% de oxígeno, aunque la productividad fue más baja que en el presente estudio (posiblemente por las razones antes expuestas) el efecto que tiene enriquecer la atmósfera con oxígeno se observó por otros autores (Garza-López, 2008; Miranda *et al.*, 2011)



Gráfica 4. Productividad de conidios obtenidos a diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera a las 132h de cultivo

Como se mencionó anteriormente, se requirió de menor tiempo para formar cierta cantidad de conidios con 30% de oxígeno respecto a los de conidios obtenidos con 16 y 21% de oxígeno, esto podría relacionarse con el aumento de oxígeno que ingresa al micelio de *Metarhizium anisopliae* en un punto del crecimiento (60 h), y por lo tanto podría provocar un aumento en especies reactivas de oxígeno (ERO), ya que está reportado que el estrés oxidativo desencadena procesos de diferenciación celular en los hongos (Belozerskaya y Gessler, 2006 ; Aguirre *et al.*, 2005; Georgiou *et al.*, 2006; Hansberg *et al.*, 1993). Con base en esta información, se explicaría por qué los tratamientos con la atmósfera enriquecida con O₂, 26 % y 30% incrementaron la producción de conidios o requirieron menor tiempo para conidiar, respectivamente. Comparado con los conidios obtenidos con pulsos que contenían menor porcentaje de oxígeno.

La diferenciación celular como una respuesta al estrés oxidativo, está relacionada con la detección de glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y proteínas oxidadas, así como la oxidación del NADPH y glutatión durante la diferenciación de *Neurospora crassa*; de esta forma, el crecimiento y el estado diferenciado es una condición en la cual se genera un desbalance entre la generación de ERO y su eliminación por medio de

antioxidantes y enzimas (Aguirre *et al.*, 2005). Lo anterior concuerda con la teoría de la diferenciación de la célula eucarionte, que postula que este fenómeno se inicia por un estado hiperoxidante (estado de estrés oxidativo), el cual induce a las células a restringir la entrada de oxígeno molecular y así evitar la acumulación de ERO (Georgiou *et al.*, 2006).

También se encontró que un requisito físico para la esporulación en varios hongos es la exposición a una interfase aire-agua, por ejemplo *N. crassa* y *A. nidulans* no esporularon en medio líquido y sí cuando crecieron en la superficie del substrato. Se desconoce cómo estos hongos perciben estos factores, pero parece ser que el estado redox y la concentración de especies reactivas de oxígeno en la célula cambia con la exposición al oxígeno (Fischer y Kües, 2006).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que cuando se expone a *Metarhizium anisopliae* a una elevada concentración de oxígeno, éste responde acelerando la diferenciación celular hacia producción de conidios, para así poder regular la entrada de oxígeno, porque se propone que los estados diferenciados son impermeables al oxígeno (Georgiou *et al.*, 2006).

De acuerdo a los resultados presentados en la Gráfica 3 también es posible decir que, en el presente estudio se encontró que el aumento significativo en la conidiación de *M. anisopliae* se obtuvo con pulsos de 23% de oxígeno respecto a 21% A, pero no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con el tratamiento de 26% de oxígeno a las 156 h de cultivo, esto complementando el estudio realizado por Tlecuil-Beristain *et al.*, (2010) donde se evaluó la producción de conidios con pulsos de 26% de oxígeno solamente.

En este estudio, la producción de conidios fue considerada como la variable respuesta del efecto de los tratamientos aplicados con pulsos de diferentes porcentajes de oxígeno, por lo tanto un objetivo no era la cuantificación de biomasa, pero hay estudios donde se encontró que al disminuir el porcentaje de oxígeno en la atmósfera, se observó un efecto adverso en el crecimiento, mientras que al aumentar este porcentaje se observó un efecto positivo (Yang y Lucas, 1970). En el estudio referido, se probaron distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera, desde 0 a 100%, y se midió el crecimiento radial (mm) en un

sólo punto del crecimiento (7 días) de diez diferentes hongos filamentosos; todas las especies excepto *A. niger* tuvieron un mayor crecimiento radial, conforme aumentó el porcentaje de oxígeno en la atmósfera, llegando al máximo crecimiento a 30% de oxígeno. También es conveniente mencionar que por encima del 40% de oxígeno el crecimiento radial de los hongos no mostró un aumento significativo y por debajo del 30% de oxígeno todos los hongos, a excepción de *A. niger* (en 20% de O₂), mostraron una disminución significativa en el crecimiento con cada disminución de la concentración de O₂ y ninguno creció en la ausencia de oxígeno.

En términos de producción, Shah *et al.*, (2005) reportaron que con la cepa V25 de *M. anisopliae* creciendo en PDA se obtuvo 1.1 X10⁷ con/cm², cuando se adicionó 1% de extracto de levadura se obtuvo 2.5 X 10⁷ con/cm² lo cual representa un aumento de 2.2 veces. En el estudio realizado por Bhanu *et al.*, (2008) al trabajar con una cepa de *M. anisopliae* por medio del diseño estadístico de superficie de respuesta, creciendo en cultivo sólido sobre arroz, humedad de 22.34 %, pH 7 y adicionando 1.5 g/L de extracto de levadura, se alcanzó el óptimo de rendimiento de conidios 5.24 X10¹⁰ con/g, el aumento representó 1.7 veces. En el presente estudio se pudo alcanzar ese aumento con aumentar el porcentaje de oxígeno en la atmósfera (30%).

8.3 Pruebas de calidad de conidios producidos a diferentes porcentajes de oxígeno en la atmósfera

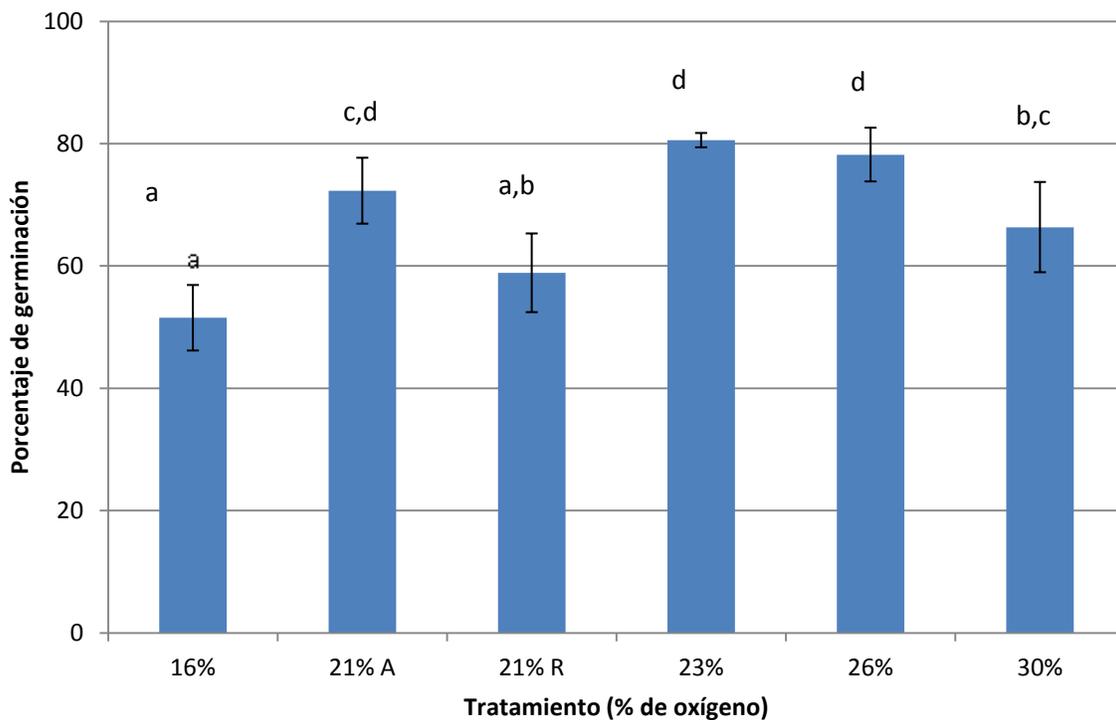
8.3.1 Pruebas de Germinación, Viabilidad e Hidrofobicidad

Como se mostró en la sección anterior, los rendimientos y la producción de conidios se incrementaron enriqueciendo el porcentaje de oxígeno en la atmósfera (>21%), aunque tales aumentos fueron significativos, no aseguraban que los conidios obtenidos fueran de buena calidad, ya que en general las condiciones para una máxima productividad no son las mejores para obtener conidios de buena calidad para la aplicación en campo (Tarocco *et al.*, 2005).

Es importante corroborar la calidad de los conidios obtenidos de los distintos tratamientos, ya que un problema grave en México es que solo el 37.5% de las muestras analizadas cumplen con más de 80% de viabilidad y el 26.2% de las muestras presenta menos del 10% de germinación (Berlanga-Padilla, 2006).

En la Gráfica 5,6 y 7 se muestran los resultados de las pruebas de germinación, viabilidad e hidrofobicidad realizadas a los conidios obtenidos bajo las condiciones de cultivo mencionadas previamente; las pruebas se realizaron a las 156 h de cultivo, estas pruebas se realizaron debido a que tales parámetros están relacionadas con la buena calidad de un lote de conidios si estos parámetros cumplen con valores de viabilidad y germinación superiores al 80% (Berlanga-Padilla, 2006).

Estas tres pruebas se realizaron con el objetivo de conocer la calidad de los conidios que se produjeron a distintas atmósferas y si la modificación del porcentaje de oxígeno por medio de pulsos en la atmósfera afectó alguno de estos parámetros.



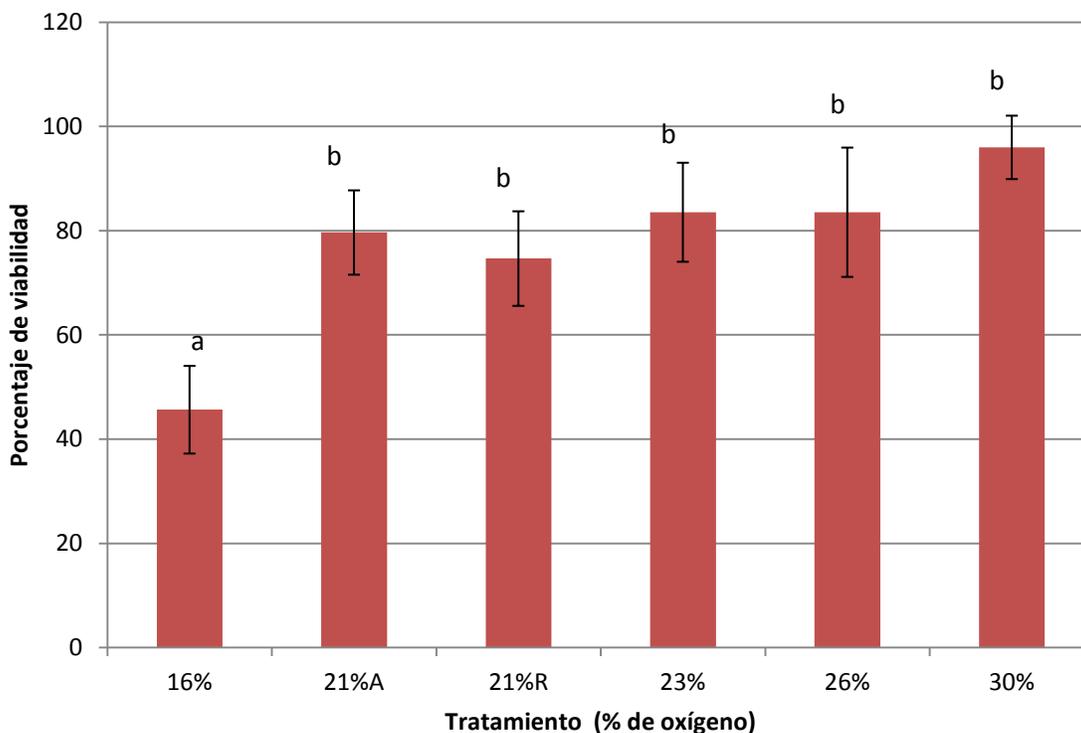
Gráfica 5. Porcentaje de germinación de los conidios obtenidos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera. [Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$)]

En la Gráfica 5, se muestran los resultados de la prueba de germinación realizada a los conidios obtenidos en los diferentes tratamientos. La germinación (%) fue entre 51 y 81%, donde los conidios provenientes de tratamiento 16% de oxígeno tuvieron el menor valor

(51%), este porcentaje aumenta proporcionalmente con la concentración de oxígeno, excepto para la atmósfera con 30%.

Comparando los resultados con otros autores, se han estudiado diferentes cepas de *M. anisopliae* (V275 y V245) en medios de cultivo con diferentes relaciones carbono-nitrógeno, estos porcentajes de germinación van desde 53 a 89% con una relación C/N de 35. Si bien el rendimiento de producción de conidios fue alto en ese estudio, el porcentaje de germinación fue bajo, alrededor del 44 (V275) y 47 % (V245) (Shah *et al.*, 2005), es decir, la germinación varía según la cepa que se esté utilizando, y el medio de cultivo aunque en este estudio también disminuyó el porcentaje de germinación cuando la productividad fue mayor. En el presente estudio solo los conidios obtenidos de los tratamientos con pulsos de 23 y 26% tuvieron una germinación cercana al 80% como lo recomienda Berlanga-Padilla, (2006).

En la Gráfica 6 se muestra los resultados de viabilidad (%) que presentaron los conidios de cada tratamiento, es importante señalar que la condición que más afecta la viabilidad de conidios fue un bajo porcentaje de oxígeno en los pulsos aplicados (16%), ya que este tratamiento los conidios obtenidos tuvieron una viabilidad de 45.6 %, mientras que el resto de los tratamiento se alcanzaron valores de hasta el 80%. Estos resultados muestran que aumentar el oxígeno en la atmósfera por arriba de la normal (21%) no afecta la viabilidad de los conidios de *M. anisopliae*.

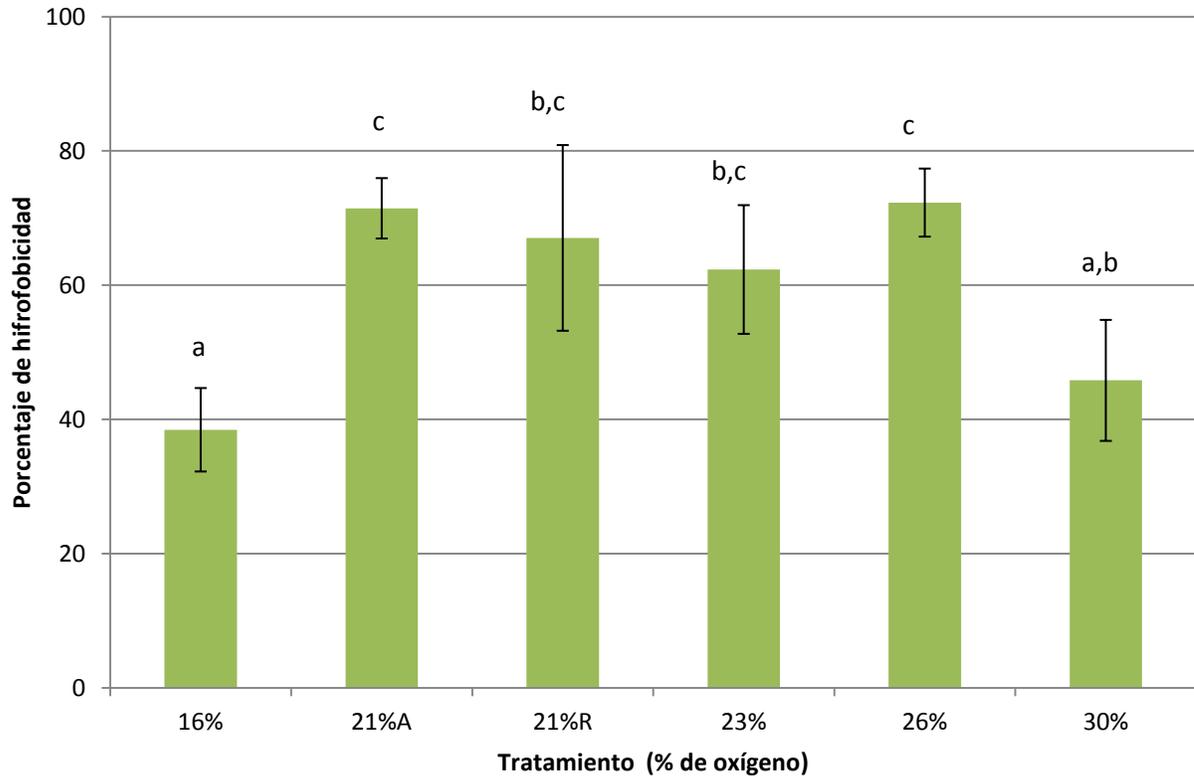


Gráfica 6. Porcentaje de viabilidad de los conidios obtenidos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera. [Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$)]

En la Gráfica 5 se mostró que la germinación (%) de los conidios producidos con pulsos de 30 % de oxígeno fue más bajo que en los tratamientos con pulsos de 23% y 26% de oxígeno, esto se puede deber a que a las 14 h (cuando se midió este parámetro) no todos los conidios viables estuvieran germinando, es decir los conidios producidos con pulsos de 30% de oxígeno germinaron en un tiempo más prolongado, esto se puede decir ya que en el parámetro viabilidad (%) que se midió a las 96 h, no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos desde 21% de oxígeno. Las pruebas de germinación y viabilidad en ocasiones se toman como equivalentes, sin embargo, los resultados de este estudio sugieren que son más bien complementarias, ya que el hecho de que un conidio no esté germinado al tiempo que se mide el parámetro no quiere decir que sea viable y viceversa; de igual forma el hecho de que un conidio germine no es garantía de que sea viable.

Los conidios de *M. anisopliae* obtenidos en condiciones de atmósfera normal presentaron valores de 85% de viabilidad y 90% de germinación en un cultivo utilizando arroz como sustrato (Ángel-Cuapio, 2011); Tlecuítl-Beristain *et al.*, (2010) reportaron 75% de

viabilidad cuando la cepa de *Metarhizium anisopliae* fue cultivado en medio Avena-Peptona y atmósfera normal, es importante mencionar que los conidios obtenidos con pulsos de 26% de oxígeno tuvieron el mismo valor de viabilidad en ese estudio.



Gráfica 7. Porcentaje de hidrofobicidad de los conidios obtenidos a distintos porcentajes de oxígeno en la atmósfera. [Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($p < 0.05$)]

En la Gráfica 7 se muestran los porcentajes de hidrofobicidad que de los conidios obtenidos de los distintos tratamientos, fueron desde $38.4 \pm 6.2\%$ a $72.3 \pm 5\%$, siendo de nuevo los conidios obtenidos a 16% los que presentaron el valor más bajo (38%), pero no son significativamente diferente la hidrofobicidad de los conidios obtenido a 30% de oxígeno que tuvo un valor de 46%. El resto de los resultados de hidrofobicidad fueron similares con lo reportado por Shah *et al.*, (2007) para cepas de *M. anisopliae* (V275 y V245) en donde, se reportaron valores de hidrofobicidad que van desde 77.9 hasta 92.8 % (V245) y de 86.22-93.9% (V275), utilizando el mismo método para medir este parámetro, esta variabilidad se atribuyó al número de subcultivos de la cepa en medios artificiales. Tlecuil-Beristain *et al.* (2010) reportó valores de hidrofobicidad alrededor de 77% tanto para conidios obtenidos en un cultivo con atmósfera normal (21%) como para

conidios obtenidos con pulsos de 26% de oxígeno, por su parte Ángel-Cuapio, (2011) encontró que los conidios de *M. anisopliae* tuvieron un 82% de hidrofobicidad creciendo sobre arroz y en una atmósfera normal.

8.3.2 Prueba de calidad por parámetros de bioensayo

Algunos autores han encontrado una correlación entre la tasa de germinación y la infectividad (Shah *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2008). Sin embargo, para los agentes de biocontrol se necesita no solo que germinen sino también que infecten y degraden las estructuras de resistencia del hospedero (Jones *et al.*, 2004). Al respecto, se realizaron pruebas de calidad de los conidios obtenidos con los distintos tratamientos, pero esta vez con parámetros de infectividad sobre dos hospederos, con el objetivo de determinar si los parámetros obtenidos en el bioensayo se afectaron debido a la modificación con pulsos en la atmósfera del cultivo de *M. anisopliae*.

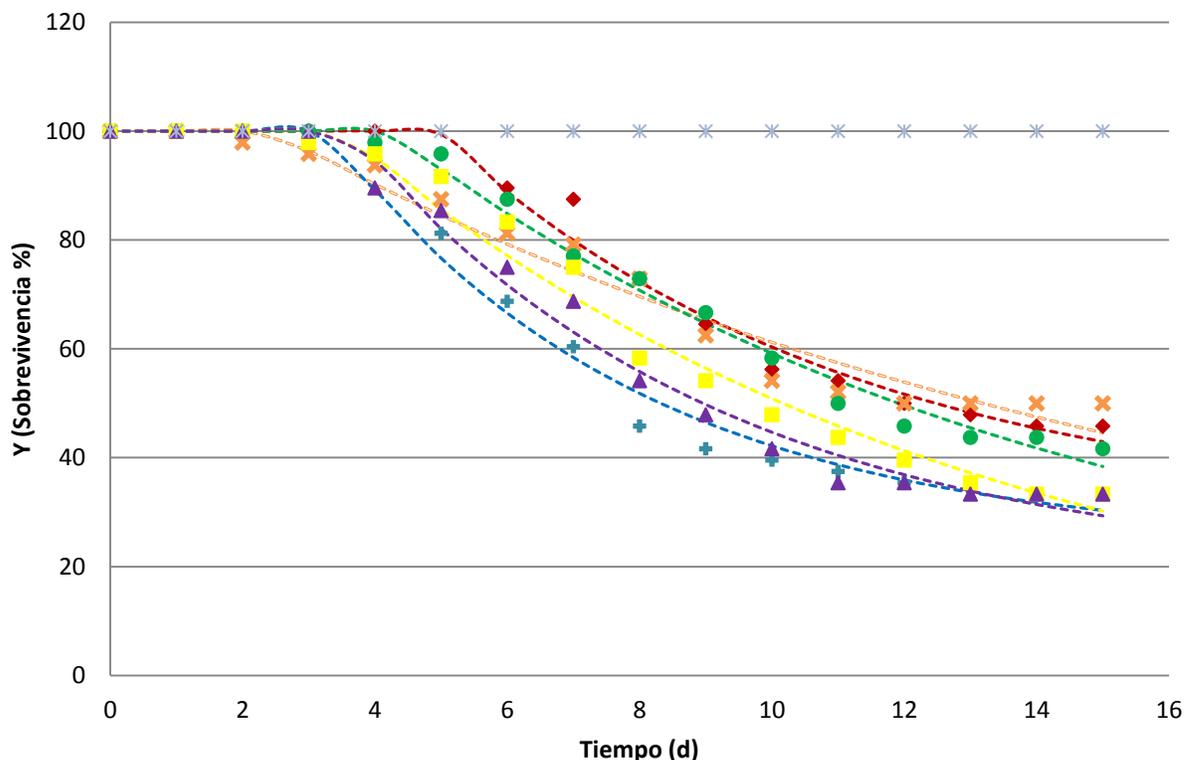
A partir del ajuste de los datos experimentales al modelo de decaimiento exponencial propuesto por Rodríguez-Gómez *et al.*, (2009), que se muestra a continuación, se obtuvieron parámetros de infectividad graficando el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo.

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S$$

$$Y = 100 \text{ si } 0 \leq t \leq t_0$$

Se obtuvieron parámetros de infectividad: velocidad específica de muerte (k , d^{-1}), el tiempo de retardo de muerte (t_0 , d), y nivel de sobrevivencia asintótica (S , %). También se estimó el tiempo en el que se alcanza el 50% de mortalidad (TL_{50}), al igualar a 50 el porcentaje de sobrevivencia al tiempo t (Y).

Los perfiles de sobrevivencia de larvas de *T. molitor* y *G. mellonella* se muestran en la Gráfica 8 y 9, respectivamente. No se observó mortalidad del control y se observó una importante diferencia entre los dos hospederos ya que con *T. molitor* se alcanzaron porcentajes de sobrevivencia más bajos que para *G. mellonella*. Las diferencias en los parámetros obtenidos en diferentes los hospederos puede deberse a que *M. anisopliae* presenta una especificidad mayor para coleópteros (*T. molitor*) que para lepidópteros (*G. mellonella*) (Zimmermann, 1993).



Gráfica 8. Perfiles de sobrevivencia de larvas de *T. molitor* después de la infección con conidios obtenidos a diferentes concentraciones de oxígeno en la atmósfera. [Control negativo (*); 16% (◇); 21% A (x); 21% R (+); 23% (○); 26% (□); 30% (△). Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo propuesto por Rodríguez- Gómez *et al.* (2009)]

En el bioensayo realizado sobre larvas de *Tenebrio molitor* se encontraron valores de TL_{50} que van de 8.7 a 17 d, k de 0.14 a 0.27 d^{-1} , t_0 de 0.04 a 5.04 d y S de 8.2 a 36.65%, pero no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos al realizar la prueba de Tukey. En el estudio realizado por Safavi *et al.*, (2007) con el objetivo de comparar la virulencia de una cepa de *M. anisopliae* sobre larvas de *Tenebrio molitor*, los autores reportaron que al variar la relación C/N del medio de cultivo se obtienen TL_{50} que van de 2.68 a 4.14 d, también es posible encontrar TL_{50} que van desde 3.7 a 5.57 d según la cepa de *M. anisopliae* que se sometió a esta prueba y al número de subcultivos en medios artificiales (Shah *et al.*, 2005). Estas diferencias tan grandes entre los valores reportados en la literatura y los TL_{50} encontrados en este trabajo, pueden deberse a que en el estudio citado, los insectos que se infectaron se mantuvieron sin alimento, y el tiempo de infección fue mayor (30s) que en presente trabajo (15 s). Además de que las diferencias entre los parámetros de infectividad entre diversos insectos es inherente a la cepa utilizada (Shah *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2007).

Tabla 4. Parámetros de infectividad de conidios de *M. anisopliae* obtenidos de los distintos tratamientos hacia larvas de *T. molitor*.

Tratamiento (% de O ₂)	S (%)	k (d ⁻¹)	t ₀ (d)	TL ₅₀ (d)
16%	36.65 ± 24.9 a	0.229 ± 0.08 a	5.04 ± 1.4 a	N.A.
21A	29.13 ± 28.9 a	0.140 ± 0.07 a	3.04 ± 1.5 a	17.3 ± 13.97 a
21R	25.69 ± 14.8 a	0.272 ± 0.09 a	3.69 ± 0.7 a	9.1 ± 2.21 a
23%	15.94 ± 17.4 a	0.143 ± 0.07 a	4.58 ± 0.8 a	12.3 ± 2.94 a
26%	15.31 ± 17.9 a	0.241 ± 0.20 a	4.23 ± 1.1 a	9.9 ± 2.05 a
30%	8.20 ± 7.8 a	0.187 ± 0.08 a	3.61 ± 1.1 a	8.7 ± 2.77 a

N.A : no alcanzado

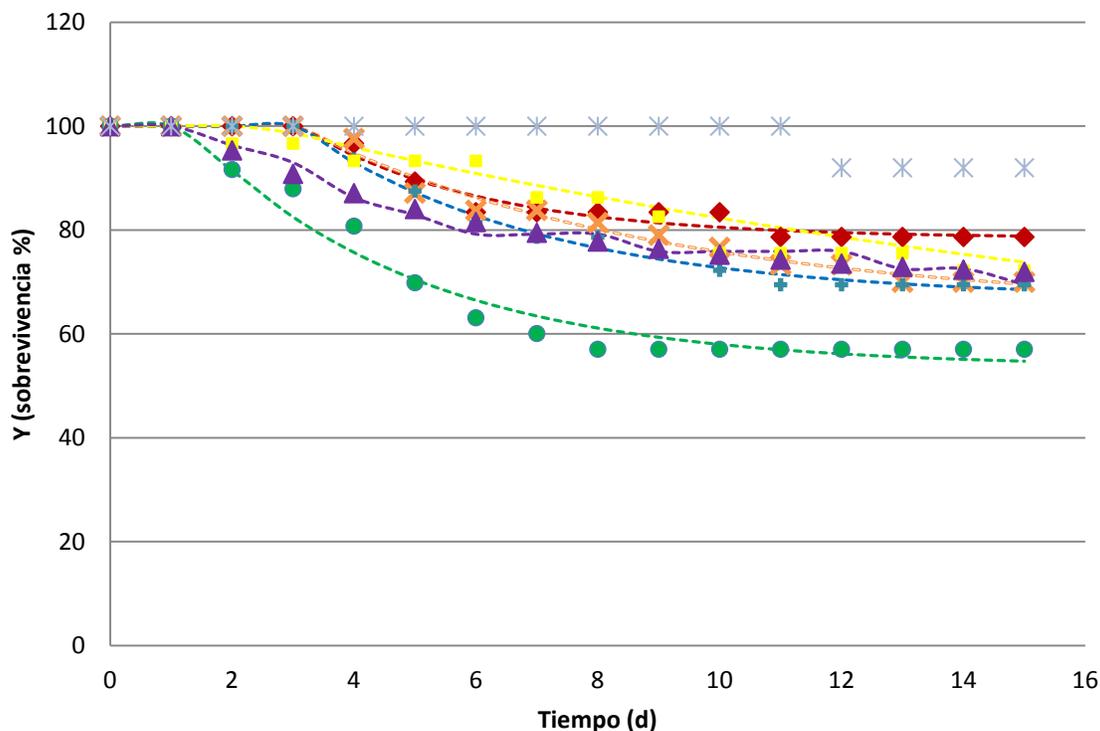
Aplicando el mismo modelo de ajuste para los datos experimentales Rodríguez- Gómez *et al.*, (2009) encontró para una cepa de *Beauveria bassiana*, cultivada en medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), los siguientes parámetros de infectividad para larvas de *Tenebrio molitor*, TL₅₀= 6.1 d, k= 0.9 d⁻¹, t₀=4.7 d y S = 16%, los parámetros k y t₀ son similares a los encontrados en el presente trabajo (Tabla 4). Los resultados encontrados con larvas de *T. molitor* no son similares de los resultados reportados por Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010) en donde no se alcanzó un TL₅₀ y el parámetro S es más grande que los encontrados en este estudio, pero de nuevo coincidieron los parámetros k y t₀ (Tabla 5). La diferencia en los parámetros TL₅₀ y S, en el caso del estudio de Rodríguez-Gómez *et al.*, (2009) pudo deberse a que se trata de otro hongo entomopatógeno y a las condiciones de la larva, tales como su edad y resistencia del sistema inmune (Jaramillo y Borgemeister, 2006). En el caso del estudio de Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010) las diferencias pudieron ser debidas al estado de las larvas.

Tabla 5. Parámetros de infectividad sobre larvas de *T. molitor* obtenidas en otros estudios

Estudio	Cepa	S (%)	k (d ⁻¹)	t ₀ (d)	TL ₅₀ (d)
Rodríguez- Gómez <i>et al.</i> , (2009)	<i>B. bassiana</i>	16	0.9	4.7	6.1
Tlecuítl-Beristain <i>et al.</i> , (2010)	<i>M. anisopliae</i> 21% O ₂	72.5	0.54	4.97	N.A.
Tlecuítl-Beristain <i>et al.</i> , (2010)	<i>M. anisopliae</i> 26% O ₂	72.23	0.52	4.97	N.A.

NA: no alcanzado

Por otro lado, cuando se realizaron los bioensayos con *G. mellonella* se encontraron los perfiles de la Gráfica 9, al ajustarlos con el modelo de decaimiento exponencial, se encontró que el TL₅₀ no se alcanzó en ningún tratamiento. En el estudio realizado por Wang *et al.*, (2008) con otro lepidóptero, quienes encontraron valores de TL₅₀ en larvas de *Manduca sexta* infectadas con *M. anisopliae* de aproximadamente 5 d y un t₀ de 3 d; con respecto al t₀, el valor encontrado por este autor es similar de los que se encontraron en el presente estudio y que se presentan en la Tabla 6, es necesario señalar que en el estudio referido no se menciona si las larvas se mantuvieron con alimento.



Gráfica 9. Perfiles de supervivencia de larvas de *G. mellonella* después de la infección con conidios obtenidos a diferentes concentraciones de oxígeno en la atmósfera. [Control negativo (*); 16% (◇); 21% A (×); 21% R (+); 23% (○); 26% (□); 30% (△). Las líneas punteadas representan el ajuste al modelo propuesto por Rodríguez- Gómez *et al.* (2009)]

Respecto al resto de los parámetros S , k y t_0 , presentados en las Tabla 6, después de realizar la prueba de Kruskal-Wallis, no se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los parámetros de bioensayo para las larvas de *G. mellonella* infectadas con *M. anisopliae*.

Tabla 6. Parámetros de infectividad de conidios de *M. anisopliae* obtenidos de los distintos tratamientos hacia larvas de *G. mellonella*.

Tratamiento (% de O ₂)	S (%)		k (d ⁻¹)		t ₀ (d)		TL ₅₀ (d)
16%	69.47 ±	22.2 a	0.545 ±	0.45 a	3.18 ±	0.7 a	NA
21A	38.17 ±	12.2 a	0.112 ±	0.14 a	2.46 ±	1.0 a	NA
21R	67.53 ±	10.1 a	0.275 ±	0.08 a	3.15 ±	0.7 a	NA
23%	55.19 ±	8.7 a	0.416 ±	0.08 a	2.09 ±	1.0 a	NA
26%	61.92 ±	1.79 a	0.153 ±	0.1 a	3.47 ±	3.2 a	NA
30%	63.81 ±	26.8 a	0.889 ±	0.19 a	1.79 ±	1.0 a	NA

NA: no alcanzado

Además se podría esperar que con los conidios obtenidos con pulsos de 16% de oxígeno se obtuvieran parámetros de infectividad (S , k y t_0) afectados negativamente, ya que su porcentaje de germinación, viabilidad e hidrofobicidad fueron los más afectados, el hecho es que no sucedió así, posiblemente debido a que existen otros factores además de los que se midieron en el presente estudio que intervinieron en la infección tales como la producción de proteasas, quitinasas y lipasas, necesarias para la penetración la cutícula de insecto (St. Leger, 1995).

El hecho de que no haber encontrado diferencias significativas entre los parámetros de bioensayo de *T. molitor*, debido al cambio en el porcentaje de oxígeno en la atmósfera, es interesante, ya que esto sugiere que el oxígeno no está alterando algún factor que sea estrictamente requerido durante la infección del hongo hacia la larva, pero sí en los rendimientos y productividad de conidios. Por otro lado en *G. mellonella* el parámetro que se vio afectado fue el TL_{50} , pero debido a que no se obtuvo en ningún tratamiento, ni con atmósfera normal, muestra que no hay un efecto negativo debido al porcentaje de oxígeno con el que se cultivó a *M. anisopliae*.

9 CONCLUSIONES

1. El proceso de liofilización redujo la germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae*, pero aumentó el tiempo en que se pudieron mantener en almacenamiento a temperatura ambiente.
2. Los pulsos con atmósfera normal, por sí mismos, no afectaron la calidad ni la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*.
3. La concentración de oxígeno en la atmósfera por arriba de la normal (21%) aumentó la producción de conidios, sin afectar su viabilidad e infectividad.
4. El aumento en el porcentaje de oxígeno durante el cultivo *M. anisopliae* no alteró los parámetros de infectividad hacia larvas de *T. molitor* y *G. mellonella*, por lo que se puede tomar como parámetro de diseño en sistemas de producción.

10 PERSPECTIVAS

El presente estudio contribuye al entendimiento del efecto de las concentraciones de oxígeno por arriba y por abajo de la normal (21%), sin embargo, es necesario realizar experimentos que expliquen los resultados obtenidos en el presente trabajo, tales como:

- Medir el CO₂ producido durante el crecimiento de *M. anisopliae* y verificar que éste no se incremente, más que lo reportado (15%), de modo que pudiera influir en la reducción de tiempo en el que se obtienen los conidios (30% de O₂).
- Medir la producción de biomasa con el fin de averiguar si se está produciendo más micelio y conidios o si sólo el micelio que existe a las 60 h de cultivo se hace competente para producir el efecto aquí mostrado.
- Seguimiento de la calidad de la cepa de *M. anisopliae* liofilizada, por un periodo de tiempo más prolongado.
- Incrementar el porcentaje de oxígeno en la atmosfera para averiguar si se provoca la disminución de algún parámetro de calidad de *M. anisopliae*.
- Medir sistemas de respuesta a un posible estrés oxidativo.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., y Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*, 13(3), 111-118.
- Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos. En: Teoría y aplicación del control biológico. L. A. Arredondo-Bernal, y H. C. Rodríguez-del-Bosque. México: Sociedad Mexicana de Control Biológico. (Capítulo 9. 127-143).
- Angel-Cuapio, R. A. 2011. Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. México: Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.
- Arcas, J. A., Díaz, B. M., y Lecuona, R. E. (1999). Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugar cane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology*, 67, 151-158.
- Arzumanov, T., Jenkins, N., y Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*, 40, 1037-1042.
- Barranco-Flrido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. y Saucedo-Castañeda. G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecani* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 920-915.
- Barajas, C.G., del Pozo, E.M., García, I., y Méndez, A. (2010). Obtención de conidios del aislamiento ma-002 de *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorokin mediante una alternativa de cultivo bifásico. *Revista de Protección Vegetal*, 25(3), 174-180.
- Barrera, J. F. (2007). Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: Teoría y aplicación del control biológico. L. A. Arredondo-Bernal, y H. C. Rodríguez-del-Bosque. México: Sociedad Mexicana de Control Biológico (Capítulo 1. 2-13).
- Belo, I., Pinheiro, R., y Mota, M. (2005). Morphological and physiological changes en *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. *Journal of Biotechnology*, 115, 397-404.
- Belozerskaya, T. A., y Gessler, N. N. (2006). Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*, 75(4), 427-431.
- Berlanga-Padilla, A. M. (2006). Calidad de hongos entomopatógenos. En Taller: Hongos entomopatógenos: Control de calidad. Manzanillo Colima: Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C. 42-48

Bhanu-Prakasha, G. V. D., Padmaja, V., Siva Kiran, R. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 99, 1530-1537.

Brownbridge, M., Costa, S., y Jaronski, S. T. (2001). Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77, 280-283.

Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O. N., y Pedraza-Chaverri, J. (2008). Glutación peroxidasa: una familia de enzimas. En: Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. M. Konigsberg Frainstein. México: Manual Moderno Capítulo 13. 201-217

Dalla Pria, J. W., Teixeira, L. P., Messias, C. L., Azevedo, J. L., y Magalhães Lacava, P. (2008). Bioassay assessment of *Metarhizium anisopliae* (metchnikoff) sorokin (deuteromycota: hyphomycetes) against *Oncometopia facialis* (signoret) (hemiptera: cicadellidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 128-132.

Desgranges, C., y Durand, A. (1990). Effect of pCO₂ on growth, conidiation, and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 546-551.

Dorta, B., Ertola R., J., Arcas, J., A. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 434-439.

Fang, W., y Bidochka, M. J. (2006). Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research*, 110, 1165-1171

FAO. México trata de combatir la enfermedad que afecta a los cítricos [en línea] (2012). Disponible en la Web:
http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef%5Buid%5D=120412

Faria, M., y Wraight, S. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43, 237-256.

Fischer, R., y Kües, U. (2006). Asexual sporulation in mycelial fungi. En: The Mycota I Growth, differentiation and sexuality. R. Fischer, y U. Kües (Edits.). Verlag Berlin Heidelberg: Springer. 263-292

García-García, M. A., Cappello-García, S., Leshner-Gordillo, J. M., y Molina Martínez, R. F. (2008). Hongos Entomopatógenos como una alternativa en el control biológico. *KUXULKAB*, 25-28.

Garza-López, P. M. (2008). Cambios fisiológicos de *Beauveria bassiana* (bals) Vuill. como respuesta a la composición atmosférica. México: Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Garza-López, P., Konigsberg, M., Saucedo-Castañeda, G., y Loera, O. (2010). Perfiles diferenciales de *Beauveria Bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en respuesta al CO₂: producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*, 45(7), 761-770.

Georgiou, C. D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., y Zervoudakis, G. (2006). Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6), 691-712.

Glare, T. (2004). Biotechnological potencial entomopathogenic Fungi. En: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Enviromental Applications*. D. K. Marcel. New York, USA: Dekker Inc. Capítulo7. 79-90

Goettel, M. e Inglis, D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. En: *Manual of Techniques in Insect Pathology*. L. Lacey (Ed.). California, USA: Academic Press, INC. 213-249

Han, B. Z., y Nout, R. (2000). Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempe fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 853-858.

Hansberg, T. W. (2008). El dióxígeno y sus especies reactivas. En: *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas* M. Konigsberg Frainstein. México: Manual Moderno. Capítulo 2. 25-46

Hansberg, W., De Groot, H., y Sies, H. (1993). Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa* . *Free Radical Biology and Medicine*, 14, 287-293.

Hansberg T. W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*, 19-54.

Hernández-Rosas, F. (2006). Métodos de preservación. En: *Taller: Hongos entomopatógenos: Control de calidad*. Hernández-Rosas, F. y Alatorre Rosas. Manzanillo Colima : Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C. 30-36.

Horaczek, A., y Viernstein, H. (2004). Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 31(1), 65-71 .

Hostettmann K., Wolfender J.K. (1997) The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science*, 51, 471-482.

Hussein K.A., Mohamed A. A., Ahmed Y. A., Saad S. E., y Jin Ho J. (2012) Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Galleria mellonella*. *Phytoparasitica*, 40(2), 117-126.

Ibrahim, L., Butt, T., y Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106(6), 705-715.

Jaramillo, J., y Borgemeister, C. (2006). Colombian strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Paecilomyces* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 91, 57-60.

Jenkins, N. E., Heviefio, G., Langewald, J., Cherry, A., y Lomer, C. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*, 19(1), 21N-31N.

Jones, E., E., Weber, F., J., Oostra, J., Rinzema, A., Meada, A., Whipps, J. M. (2004). Conidial quality of the biocontrol agent *Coniothyrium minitans* produced by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Enzyme and Microbial Technology* 34, 196-207

Kamp, A., y Bidochka, M. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercial available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 74-77.

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B., Skinner, M., Gouli, V., y Gouli, S. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 112(4), 583-591.

Krishna, C. (2005). Solid-state fermentation systems, an overview. *Critical Review in Biotechnology*, 25, 1-30.

López-Lastra, C., Hajek, A. E., y Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 80, 1126-1130.

Mathews, K. C., Van Holden, E. K., y Ahern, G. K. (2002). *Bioquímica*. México: Addison Wesley. 583-618

Mier, T., Ayala-Zermeño, M. A., Toriello, C., Navarro-Barranco, y Hortensia. (2005). *Conservación de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas agrícolas*. México: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Miranda, F., Alatorre, R., Saucedo, G., y Loera, O. (2011). Influencia del incremento de oxígeno en la producción y termotolerancia de conidios de hongos entomopatógenos. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Queretaro: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

Montesinos-Matías, R. (2008). *Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de Beauveria bassiana*. México: Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) (63), 95-103.

Mustafa, U., y Kaur, G. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources and ratio on the germination, growth and sporulation characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* isolates. *African Journal of Agricultural Research* , 3(10), 922-930.

Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., y Loera, O. (2010). Effect moisture content and inoculum level over growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 771-777.

Oliveira, I., Pereira, J. A., Bento, A., y Baptista, P. (2010). Viability of *Beauveria bassiana* isolates after storage under several preservation methods. *Annals of Microbiology*, 61(29),339-344.

Outten, E. C., Falk, R. L., y Culotta, V. C. (2005). Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 388, 93-101.

Padilla-Melo, G. N., Bernal-Urbe, M. G., Vélez-Arango, P. E., y Montoya-Restrepo, C. (2000). Caracterización patogénica y morfológica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *Cenicafé*, 28-40.

Pucheta Díaz, M., Flores Macias, A., Rodríguez Navarro, S., De la Torre, M. (2006). Mecanismos de acción de los Hongos Entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860

Quesada-Moraga, E., Ortiz-Urquiza, A., Garrido-Jurado, I., Muñoz-Ledesma, F., García-Fernández, P., y SantiagoÁlvarez, C. (2009). Los hongos entomopatógenos y sus proteínas insecticidas en el control de plagas de insectos. III Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular y Biotecnología., (págs. 15-19). Córdoba.

Ramos-Elorduy J., Avila_González E., Rocha- Hernández A., Pino J.M. (2002) Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for boiler chickens. *Journal of Economic Entomology*, 95 (1), 214-220

Rangel, D.E.N., Alston, D.G, y Roberts D.W. (2008). Effects of physical and nutritional stress conditions during mycelial growth on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*, 112, 1355-1361.

Robledo-Monterrubio, M., Alatorre-Rosas, R., Viniegra- González, G., y Loera, O. (2009). Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal Invertebrate Pathology*, 110 (3) 222-227.

Rodrigues de Faria, M., Martins, I., Mello, R., y Tigano, M. S. (1999). Entomopathogenic fungal (Hyphomycetes) collection: Assessment of conidial viability. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 1497-1503 .

- Rodríguez- Gómez, D., Saucedo-Castañeda, G., Loera, O., y Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (3), 513-518
- Roncal, T., y Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, 154, 539-546.
- Safavi, S., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasouljan, G., Bandani, A. R., y Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116-23.
- Samuels, K. D., y Llewellyn, M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal Invertebrate Pathology*, 53 (1)25-31.
- Shah, A. F., Allen, N., Wright, J. C., y Butt, M. T. (2007). Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 276 (1), 60-66.
- Shah, F., Wang, C., y TM, B. (2005). Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251(2), 251, 259-266.
- Shaukat, A., Zhen, H., y Shunxiang, R. (2011). Stress response of entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* to copper. *Biological Trace Element Research*, 143 (1), 600
- Socol, C. R., Raimbult, M., y Pinheiro, L. I. (1994). Effect of CO₂ concentration on the micelium growth of *Rhizopus* species. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 37(1), 203-210.
- St Leger, R. J. (1995). The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Canadian Journal of Botany*, (Supp. 1): S1119-11125.
- Stephan, D., y Zimmermann, G. (1998). Development of a spray-drying technique for submerged spores of entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 8(1), 3-11.
- Tamez-Guerra, P., Galán-Wong, L. J., Medrano-Roldán, H., García-Gutiérrez, C., Rodríguez-Padilla, C., Gómez-Flores, R. A., y Tamez-Guerra, R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 143-152.
- Tarocco, F., Lecuona, R. E., Couto, A. S., y Arcas, J. A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 481-488.

- Thibault, J., Pouliot, K., Agosin, E. y Pérez-Correa, R. (2000). Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and KLa in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 36, 9-18.
- Thomas, M., y Read, A. (2007). Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 377-382.
- Tlecuitl-Beristain, S., Viniestra-González, G., Díaz-Godínez, G., y Loera, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*. 169(5): 387-394
- Toegel, S., Salazar-Behzadi, S., Horaczek-Clausen, A., y Viernstein, H. (2010). Preservation of aerial conidia and biomasses from entomopathogenic fungi *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae* during lyophilization. *Journal of Invertebrate Pathology*, 105 (1), 16-23.
- Toledo I, Aguirre J y Hansberg W (1994). Enzyme inactivation related to a hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. *Microbiology* 140,2391-2397
- Wang, C., Duan, Z., y St Leger, R. J. (2008). MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect hemolymph. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 302-309.
- Yang, H., y Lucas, G. (1970). Effects of N₂-O₂ and CO₂-O₂ tensions on growth of fungi isolated from damaged flue-cured tobacco. *Applied Microbiology*, 19, 271-277.
- Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37, 375-379.