

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**UNIDAD IZTAPALAPA
CBS**

**“CAMBIOS FISIOLÓGICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.)
VUILL. COMO RESPUESTA A LA COMPOSICIÓN
ATMOSFÉRICA”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

I.B. I. Paul Misael Garza López

DIRECTOR: DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

México, D. F.

Diciembre de 2008

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Postgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con No. de Registro 0471-O.

México, D. F., a 16 de diciembre de 2008

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

**CAMBIOS FISIOLÓGICOS DE *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. COMO
RESPUESTA A LA COMPOSICIÓN ATMOSFÉRICA**

que presentó:

I.B.I. Paul Misael Garza López

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral **Universidad Autónoma Metropolitana**

Asesor: Dra. Mina Konigsberg Fainstein **Universidad Autónoma Metropolitana**

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda **Universidad Autónoma Metropolitana**

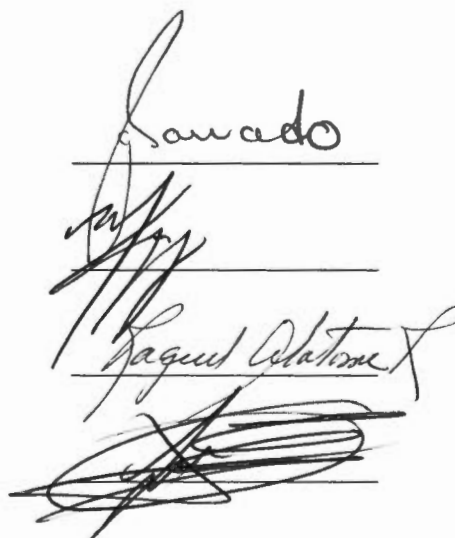
Jurado:

Presidente: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario: Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Vocal: Dra. Raquel Alatorre Rosas

Vocal: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz



The image shows four handwritten signatures, each on a horizontal line. From top to bottom, the signatures are: 1. Gerardo Saucedo (clearly legible), 2. Mina Konigsberg Fainstein (stylized), 3. Raquel Alatorre Rosas (stylized), and 4. Luis Enrique Gómez Quiroz (very stylized and dense).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana. Al CONACyT por la beca otorgada (No. de Registro: 203464).

Al Dr. Octavio Loera Corral por su disposición para dirigir esta tesis, quien me dio el estímulo y el apoyo incondicional para realizar el presente trabajo.

A mis asesores, Dra. Mina Konigsberg Fainstein y Dr. Gerardo Saucedo Castañeda por sus valiosos consejos, sugerencias y correcciones. Igualmente a la Dra. Raquel Alatorre Rosas y al Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por sus aportaciones y recomendaciones.

A mis compañeros del laboratorio W-104 Roberto, Armando, Eric, Saúl y Divanery por su amistad y apoyo para la realización de este proyecto de tesis.

A mis padres, Yolanda y Raúl por darme la vida, por guiarme certeramente a lo largo de mi vida, por creer en mí, por su amor y por todo el apoyo que me han dado. Asimismo a toda mi familia por apoyarme siempre.

A mis amigos Jesús, Ismael, Mónica, Karina, Jorge y Héctor por todos los años de convivencia y alegrías otorgadas.

A todas las personas que han sido parte importante en mi vida y que han creído en mí.

A todos, muchas gracias.

“No estudio para saber más, sino para ignorar menos”

Sor Juana Inés de la Cruz

RESUMEN

Los bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos (HE) como *Beauveria bassiana* han sido objeto de investigación ya que poseen gran importancia en el Manejo Integral de Plagas (MIP).

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes humedades iniciales del sustrato (40%, 50%, 60%), así como la adición de una solución de extracto de levadura (0.5 g/L) para producir conidios sobre arroz. Una vez determinados los parámetros óptimos de cultivo, se determinó el efecto de la composición atmosférica sobre producción de conidios, pH, proteína soluble y actividad amilasa, esta enzima necesaria para la degradación del almidón que es el componente principal del arroz utilizado como sustrato. Asimismo se evaluaron parámetros de calidad de los conidios, a través de un ajuste a un modelo exponencial, sobre adultos de *Tenebrio molitor*, tales como: tiempo letal 50 (TL₅₀), velocidad específica de mortalidad (k), tiempo de retardo de inicio de muerte (t₀), porcentaje de sobrevivencia (S), hidrofobicidad y porcentaje de germinación.

Se demostró que con humedad inicial de 40% en presencia de extracto de levadura se obtuvieron casi 30 veces más conidios respecto a las humedades de 50% y 60%, con y sin adición de extracto de levadura. Por otra parte, con atmósfera normal (AN) se obtuvieron los valores menores de TL₅₀, t₀ y S. Con la atmósfera 26-0 (26% O₂, 0% CO₂) se produjeron 48% más conidios con respecto al tratamiento AN. Asimismo, el tratamiento 16-5 (16% O₂, 5% CO₂) aumentó 2.5 veces la actividad amilasa respecto a la atmósfera AN; sin embargo, las dos condiciones atmosféricas anteriores tuvieron efecto negativo en algunos de los parámetros de calidad, ya que produjeron menos del 50% de mortalidad en los insectos infectados y el valor de t₀ se incrementó casi al doble; por su parte el porcentaje de germinación e hidrofobicidad disminuyeron al menos 24% y 25%, respectivamente, todos comparados con el tratamiento AN. Lo anterior se corroboró mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey ($P < 0.05$).

Los resultados de este trabajo describen el efecto de diferentes composiciones atmosféricas sobre la producción de conidios, así como en la calidad de los mismos, lo cual es no se había realizado para el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

INDICE GENERAL

Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	v
1. Introducción	1
1.1 Control Biológico	1
1.2 Hongos Entomopatógenos	3
1.3 Ciclo Infeccioso de los Hongos Entomopatógenos	5
1.4 Producción de Hongos Entomopatógenos	7
1.5 Morfología y Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	11
1.6 Efecto del Oxígeno sobre el Crecimiento de Hongos Entomopatógenos	13
2. Antecedentes	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos	18
5.1 Objetivo General	18
5.2 Objetivos Particulares	18
6. Materiales y Métodos	19
6.1 Evaluación del Efecto de la Composición de la Atmósfera	19
6.1.1 Microorganismo	
6.1.2 Inóculo	19
6.1.3 Cultivo en Medio Sólido	20

6.1.3.1 Composiciones Atmosféricas	20
6.1.4 Determinación de Parámetros de Rendimiento	21
6.1.4.1 Producción de Conidios	21
6.1.4.2 Determinación de pH	21
6.1.4.3 Determinación de Proteína Soluble	22
6.1.4.4 Determinación de Actividad Amilasa	22
6.1.5 Determinación de Parámetros de Calidad	23
6.1.5.1 Hidrofobicidad	23
6.1.5.2 Porcentaje de Germinación	24
6.1.5.3 Cría de <i>Tenebrio molitor</i>	24
6.1.5.4 Bioensayo	25
6.2 Análisis Estadístico	27
7. Resultados y Discusiones	28
7.1 Efecto del contenido de humedad inicial del sustrato en la producción de conidios	28
7.2 Perfiles de Producción de Conidios	29
7.3 Perfiles de pH	33
7.4 Perfiles de Proteína Soluble	34
7.5 Perfiles de Actividad Amilasa	36
7.6 Hidrofobicidad y Germinación	37
7.7 Bioensayo	39
8. Conclusiones	45
9. Perspectivas	45
10. Referencias	46

11. Anexos	57
11.1 Curva Estándar para la Determinación de Proteína Soluble por el Método de Bradford	57
11.2. Curva Estándar para la Determinación de Actividad Amilasa por el Método de DNS	58

Índice de Tablas

Tabla 1.1 Hongos entomopatógenos más comercializados (Candas y Bulla, 2003; Glare, 2004)	4
Tabla 1.2 Composición química del arroz	9
Tabla 1.3 Formulados comerciales de hongos entomopatógenos distribuidos en México (Tamez-Guerra <i>et al.</i> , 2001).	10
Tabla 1.4 Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> (Catalogue of Life, 2008)	13
Tabla 7.1 Parámetros de calidad de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tuckey ($P < 0.05$)	41
Tabla 7.2. Resumen de parámetros fisiológicos de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey-Kramer ($P < 0.05$)	44
Tabla 7.3 Resumen de parámetros importantes de calidad de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey-Kramer ($P < 0.05$)	44

Índice de Figuras

Figura 1.1 Estructura y composición de la cutícula de insectos y proceso infectivo de los hongos entomopatógenos (Modificado de Hajek y St Leger, 1994)	6
Figura 1.2 Representación esquemática de <i>Beauveria bassiana</i> : a) Conidióforo, b) Fiálides, c) Conidios (Tomado de Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999)	11
Figura 6.1 Propagación del aislado Bb 885.2	20
Figura 6.2 Estadios de <i>Tenebrio molitor</i> . a) Larva, b) Pupa, c) Adulto	25
Figura 7.1 Concentración de conidios por gramo de sustrato sólido inicial medido a los 8 días de cultivo con distinta humedad inicial, con extracto de levadura y sin extracto de levadura (0.5 g/L) a atmósfera normal (AN). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tuckey ($P < 0.05$).	28
Figura 7.2 Cinética de producción de conidios del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas.	31
Figura 7.3 Cinética de pH del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas.	33
Figura 7.4 Cinética de proteína soluble presente en el extracto del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas	35

Figura 7.5 Cinética de rendimiento de actividad amilasa del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas	36
Figura 7.6 Porcentaje de hidrofobicidad y germinación de los conidios obtenidos a los 8 días de cultivo bajo diferentes composiciones atmosféricas	39
Figura 7.7 Perfiles de sobrevivencia de adultos de <i>Tenebrio molitor</i> infectados con conidios del aislado Bb 885.2 obtenidos a distintas composiciones atmosféricas	41
Figura 11.1 Curva estándar de BSA para la medición de proteína soluble por el método de Bradford	58
Figura 11.2 Curva estándar de glucosa para la medición de actividad amilasa por el método de DNS	59

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Control Biológico.

El control microbiano se define como la utilización de organismos vivos (bacterias, hongos, nemátodos o virus) o de sus productos, para controlar la población de insectos nocivos. Tiene gran importancia económica en agricultura ya que permite controlar muchas plagas de insectos (Greathead y Waage, 1983; Summy y French, 1988).

Existen alrededor de 2000 especies de microorganismos entomopatógenos, entre los que se encuentran 750 especies de hongos, 100 especies de bacterias, 300 especies de protozoos y 1000 virus. La mayoría de estas especies son específicas, por lo que atacan únicamente insectos y no son nocivas para organismos como aves, mamíferos o plantas; sin embargo, aún no se realizan estudios detallados sobre la posible toxicidad de algunos microorganismos o de sus productos (Candas y Bulla, 2003). Los microorganismos entomopatógenos están siendo utilizados en diferentes países como alternativa viable para el control de insectos que afectan cultivos de relevancia económica. Estos países generalmente tienen un programa de manejo de plagas (Casida y Quistad, 1998).

Los bioinsecticidas han sido objeto de investigación y desarrollo ya que ha crecido el interés hacia éstos debido a que poseen gran importancia en los conceptos modernos de agricultura sustentable, así como el Manejo Integral de Plagas (MIP), (van des Boshch *et al.*, 1982). Una razón importante de lo anterior es que el público adquiere más conciencia de preservar el ambiente y la salud; además se evita que los insectos desarrollen resistencia a los plaguicidas convencionales, se evitan riesgos para la salud y el ambiente. Los bioinsecticidas se consideraron poco prometedores ya que presentan un espectro de acción reducido, su producción implicaba altos costos y constituía un problema en cuanto a su formulación y

actividad, además de que los productos tenían vida de anaquel muy corta o el rendimiento del producto era muy bajo (Alatorre-Rosas, 2006).

Una de las dificultades actuales que tiene el desarrollo de bioinsecticidas es la expectativa que se tiene de estos productos, ya que se considera que al sustituir un insecticida organosintético por un bioinsecticida, éste debe tener la misma función y aplicación. Sin embargo, esto no se cumple ya que los bioinsecticidas están formulados con organismos vivos y cada uno tiene propiedades que determinan la producción, formulación y uso potencial (Alatorre-Rosas, 2006; Barrera, 2007).

Actualmente se utilizan dos estrategias de MIP:

- a) Utilizar los bioinsecticidas como productos que reemplazarán a los insecticidas químicos.
- b) Utilizar los bioinsecticidas elaborados con entomopatógenos endémicos de una zona como parte de una estrategia ecológica de aumento de control natural de plagas en esa misma zona.

En México existen diferentes entidades agrícolas que están interesadas en la implementación de alternativas al manejo de insecticidas convencionales como el uso de bioinsecticidas, de igual manera existen numerosos laboratorios que han tratado de producir estos bioinsecticidas, pero han tenido problemas en el escalamiento y producción masiva de los microorganismos, en el control de calidad y en la verificación de la efectividad (Alatorre-Rosas, 2006).

En los últimos años se han utilizado exitosamente bioinsecticidas en los estados de Jalisco, Tamaulipas, Sinaloa, Guanajuato, Veracruz, Chiapas y Oaxaca para el control de diversas plagas tales como las mosquitas blancas *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999b), las especies de chapulines *Sphenarium purpurascens* y *Melanoplus differentialis*

(Tamayo-Mejía, 2006), la broca del café *Hypothenemus hampei* (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999c) y la mosca pinta *Aeneolamia* spp. (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999a).

Por otro lado, en 2004 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el reglamento para obtener una certificación para el manejo, producción y comercialización de plaguicidas, incluyendo los bioinsecticidas, sin embargo es muy costoso obtener el registro de cepas microbianas. Posteriormente en el 2005 y 2008 se publicaron la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y el Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados respectivamente en los cuales se regula la liberación de este tipo de organismos, lo que dificulta aún más el desarrollo de los bioinsecticidas.

1.2 Hongos Entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos (HE) son microorganismos heterótrofos generalmente no móviles. Algunos HE atacan a determinadas especies de insectos, sin embargo hay especies de hongos de amplio espectro (Tabla 1.1). Las diferencias en la virulencia entre las distintas cepas de los hongos entomopatógenos se deben a muchos factores tales como la capacidad de adherencia de los conidios a la cutícula, la capacidad de secreción de enzimas hidrolíticas, etc. Ello determina la penetración al insecto, y las cantidades mínimas de propágulos para diezmar a los insectos. La cutícula de los insectos está formada por diversos tipos de moléculas, dentro de las que destacan proteínas (50-60%), quitina (30%) y lípidos (5-10%). La quitina tiene gran relevancia ya que es un componente estructural de los exoesqueletos de artrópodos y de la pared celular de los hongos, además de que es el polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Bidochka y Khachatourians, 1992; Zhai, 1997).

Tabla 1.1. Hongos entomopatógenos más comercializados.
(Candas y Bulla, 2003; Glare, 2004)

Microorganismo	Hospedero
<i>Beauveria sp.</i>	Coleópteros, lepidópteros, orthópteros
<i>Lecanicillium sp.</i>	Moscas blancas, tisanópteros y áfidos
<i>Metarhizium sp.</i>	Homópteros, orthópteros, coleópteros
<i>Paecilomyces sp.</i>	Lepidópteros, coleópteros y orthópteros

La utilización de hongos entomopatógenos como bioinsecticidas tiene varias ventajas, entre las que destacan que no son nocivos para el hombre ni para el medio ambiente; no deterioran la fauna benéfica, permiten establecer programas de manejo integrado, son factibles de usar en la agricultura orgánica, no tiene efectos tóxicos por acumulación en aplicaciones sucesivas y no tienen un límite máximo de residuos (Monzón, 2001).

Actualmente *Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más utilizados en México en el área agrícola para el control de plagas y es causante de la enfermedad llamada muscardina blanca (De la Rosa *et al.*, 1997, 2000; Elizalde-Blancas, 2006; Steinhaus, 1949). Éste hongo infecta a más de 700 especies de insectos (Goettel e Inglis, 1997), tales como picudo del algodón, picudo del banano, barrenador del tallo de maíz, gusano de la harina, chinche verde, mosca de la fruta y broca del café (Alves *et al.*, 2002; De la Rosa *et al.*, 2002; Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999a, 1999b, 1999c). Los distintos aislamientos de *Beauveria bassiana* forman parte de la microbiota de los suelos en muchas regiones del mundo, por lo que es muy común obtener nuevos aislamientos. Es frecuente que los insectos de suelo toleren de manera natural a éstos entomopatógenos sin embargo, la mayoría de los insectos que se desarrollan y se alimentan del follaje de las plantas no presentan dicha tolerancia (Zhai, 1997).

En nuestro país se han realizado estudios que muestran la conveniencia de aislar cepas de *Beauveria bassiana* adaptadas a las condiciones de cada región (De la Rosa *et al.*, 1997, 2000), igualmente se han reportado las comparaciones de virulencia contra insectos que afectan cultivos en México (De la Rosa *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2002).

1.3 Ciclo Infectivo de los Hongos Entomopatógenos.

El ciclo infectivo de los HE se divide en una serie de eventos físicos y bioquímicos que determinan el éxito de la infección. La infección se puede dar a través de las partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos de los hospederos, ya que en estos sitios es donde se encuentran condiciones de humedad alta que promueve la germinación de las unidades infectivas permitiendo la penetración de las hifas (Alatorre-Rosas, 2007; Roy *et al.*, 2006).

El evento inicial es la unión de los conidios a la cutícula de los insectos mediante interacciones hidrofóbicas no específicas (Wösten, 2001). Es importante mencionar que la hidrofobicidad le confiere a los conidios resistencia contra la deshidratación y facilita su dispersión (Boucias *et al.*, 1988). La hidrofobicidad de los conidios se atribuye a la presencia de proteínas tipo hidrofobinas en su superficie (Boucias y Pendland, 1998; Jeffs *et al.*, 1999).

Una vez establecida la unión de los conidios (bajo condiciones de humedad, temperatura y nutrición específicas) comienzan a producir tubos germinativos los cuales se deslizan sobre la cutícula con la finalidad de localizar sitios receptores donde la hifa pueda penetrar al insecto (Fig 1.1). Asimismo, se forman apresorios que sirven de anclaje y además ejercen presión física sobre el exoesqueleto (Alatorre-Rosas, 2007; Riquelme *et al.*, 1998; Wessel, 1999). Paralelamente, los HE producen enzimas que hidrolizan la cutícula, principalmente proteasas del tipo subtilisina (Pr1 A y B), serin-proteasas (Pr2 y Pr3), cistein-proteasas (Pr4),

carboxipeptidasas (MeCPA), metaloproteasas y dipeptidilpeptidasa entre otros (Clarkson y Charnley, 1996; Hegedus y Khachatourians, 1995; Joshi *et al.*, 1995; St. Leger, 1995; St Leger *et al.*, 1996); la quitina se hidroliza por una serie de exo-N-acetilglucosamidasa, quitobiosas y endoquitinasas (Clarkson y Charnley, 1996; Hegedus y Khachatourians, 1995); de igual manera se sintetizan lipasas que degradan lipoproteínas y lípidos los cuales pueden ser tóxicos inhibitorios para algunos HE como *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* (Khachatourians y Qazi, 2008).

Posteriormente, el hongo prolifera dentro del insecto formando cuerpos hifales secundarios, los cuales se ramifican en la procutícula y la capa epidérmica lo que conlleva a la diseminación a través del hemocele invadiendo todas las estructuras del insecto (Deshpande, 1999; Pucheta-Díaz *et al.*, 2006). Dentro de la hemolinfa, algunos géneros de HE como *Beauveria*, *Metarhizium* y *Paecilomyces*, producen toxinas tales como oosporeína, bassiana, tenellina, beauverina, destruxinas y ácido oxálico cuya producción esta estrechamente relacionada con la toxicidad y virulencia de aislados de HE (Alatorre-Rosas, 2007; Khachatourians y Qazi, 2008; Strasser *et al.*, 2000) (Fig 1.1).

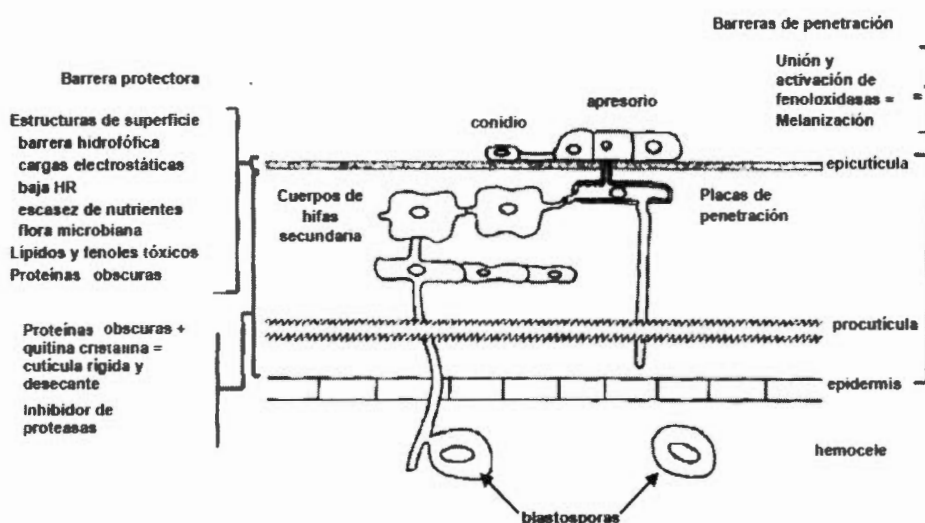


Figura 1.1. Estructura y composición de la cutícula de insectos y proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos (Modificado de Hajek y St Leger, 1994).

Los individuos infectados no se alimentan, presentan debilidad y desorientación; generalmente cambian de color. Una vez que el hongo ha agotado los nutrientes, provoca la muerte al insecto y crece hacia la superficie a través de los segmentos más blandos de la cutícula hasta cubrir al insecto con una capa de micelio que produce conidios facilitando su dispersión a través del aire, además cada individuo infectado constituye un nuevo foco de infección para otros individuos de la población (Montesinos-Matías, 2008; Tefera y Pringue, 2003).

1.4 Producción de Hongos Entomopatógenos.

Los hongos filamentosos están especialmente adaptados para crecer sobre superficies sólidas. Sin embargo, la producción industrial de algunas enzimas de este tipo de microorganismos se lleva a cabo en medios líquidos (Harvey y McNeil, 1993). Una gran parte de ésta contradicción se debe a la ausencia de métodos y conceptos para medir *in situ* o *ex situ*, las variables importantes de crecimiento y funcionamiento de estos organismos, cuando crecen en cultivos sólidos (Viniégra-González *et al.* 2003).

El cultivo en medio sólido (CMS) tiene varias ventajas para la producción de conidios y enzimas por hongos filamentosos. Primeramente, los hongos crecen en la naturaleza sobre sustratos sólidos como restos de madera, plantas, raíces, cutícula de insectos, etc. Además las propiedades de las enzimas y calidad de los conidios producidos en medio líquido son distintas si se producen por CMS, por ejemplo, la estabilidad a la temperatura y pH de enzimas producidas por FMS se mejora considerablemente con respecto a las enzimas producidas por el mismo hongo en cultivo líquido (CL) (Díaz-Godínez *et al.*, 2001; Minjares-Carranco *et al.*, 1997; Romero-Gómez *et al.*, 2000). Por otro lado, una vez establecidas las condiciones de crecimiento, la composición de cada sustrato permite la inducción de la maquinaria enzimática para su degradación, ya sea que el sustrato tenga la función de soporte o que se usen soportes inertes, como la espuma de poliuretano (PUF) (Díaz-Godínez

Tabla 1.2. Composición química del arroz. (ONI, 2008)

Arroz	
Almidón (%)	88-90
Celulosa-Lignina (%)	0.2-0.5
Pentosanas (%)	0.3-0.6
Azúcares Libres (%)	0.2-0.6
Proteínas (%)	7 a 12
Lípidos (%)	2

Además de este sistema, se han hecho estudios con subproductos de arroz para el cultivo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, así como mezclas de arroz y bagazo de caña en proporciones de 50% (p/p) (Arzumanov *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Liu y Tzeng., 1999). Asimismo se han hecho estudios para la producción de conidios de *Beauveria sp.* en donde se utiliza CMS, siendo el sustrato una combinación de residuos de papa y bagazo de caña (60-40% p/p) (Dalla-Santa *et al.*, 2004, 2005). De igual manera se ha utilizado arroz pre-cocido como sustrato para producir conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en CMS (Neves y Alves, 2000).

Debido a que los HE necesitan alta humedad relativa para que se inicie el proceso de infección sobre el insecto, se han incluido sustancias que retengan humedad en las formulaciones acuosas y aceitosas (Alatorre-Rosas, 2006). Es importante conservar los aislados y cepas de HE utilizados y evitar alteraciones en el crecimiento y virulencia, para lo cual existen diversos métodos; no obstante, algunos pueden llegar a ser muy costosos y sofisticados (Garza-López y Loera, 2006; López-Lastra *et al.*, 2002).

Los formulados comerciales de hongos entomopatógenos de mayor distribución en México son productos fabricados en el país por empresas privadas, organismos estatales o centros de investigación (Tabla 1.3). La mayoría son formulaciones de conidios del hongo que se asperjan sobre plantas (hojas y frutos) y además cada una se recomienda para hospederos específicos (Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

Tabla 1.3. Formulados comerciales de hongos entomopatógenos distribuidos en México. (Faria y Wraight, 2007; Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

Producto	Entomopatógeno utilizado
Mycotrol-WP	<i>Beauveria bassiana</i>
Mycotrol-O	<i>Beauveria bassiana</i>
Mycotrol-ES	<i>Beauveria bassiana</i>
Natularis-L	<i>Beauveria bassiana</i>
Beauverina CP	<i>Beauveria bassiana</i>
BotaniGard 22 WP	<i>Beauveria bassiana</i>
BotaniGard ES	<i>Beauveria bassiana</i>
Bio-Fung	<i>Beauveria bassiana</i>
Bea-Sin	<i>Beauveria bassiana</i>
Bio-Blast	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Meta-Sin	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Fitosan M	<i>Metarhizium anisopliae</i>
Pae-Sin	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
<i>P. fumosoroseus</i>	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
PFR-97	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
Verti-Sin	<i>Lecanicillium lecanii</i>

Para la realización de este proyecto de tesis se utilizó un aislado mutante del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, por lo cual a continuación se presenta la descripción morfológica y la taxonomía de dicho HE.

1.5 Morfología y Taxonomía de *Beauveria bassiana*.

El hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* es un hongo filamentoso que produce micelio blanco o ligeramente amarillento (dependiendo de las condiciones de cultivo). Sus hifas son septadas y contienen las estructuras reproductivas llamadas conidióforos, sobre los que se desarrollan los conidios (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999c; Rehner, 2005; Romero-Machado, 1996).

Beauveria bassiana ramifica su micelio para formar conidióforos simples e irregulares los cuales terminan en vértice con forma de racimos (denominados fiálides) con forma de botella o brazo alargado de donde surge el primer conidio (Figura 1.2). Posteriormente surgen más conidios alrededor de la primera. Los conidios son unicelulares y transparentes, generalmente de forma oval o globosa con tamaño aproximado de 1.5 - 4 x 1.5 - 3 μ m (Fassatiová, 1986; Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999c; Romero-Machado, 1996; Tanada y Kaya, 1993).

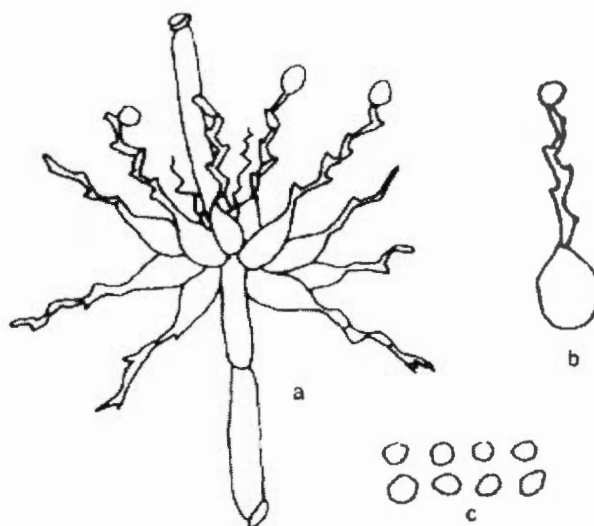


Figura 1.2. Representación esquemática de *Beauveria bassiana*: a) Conidióforo, b) Fiálides, c) Conidios (Tomado de Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999c).

Este hongo produce dos tipos de unidades infectivas a lo largo de su ciclo infectivo:

- Conidios que son producidas sobre el micelio, las cuales son muy resistentes a las condiciones ambientales.
- Blastosporas las cuales son producidas en la hemolinfa una vez que el hongo ha penetrado en el hospedero. Son de tamaño un poco mayor en comparación a los conidios y con resistencia mínima a condiciones ambientales adversas. (Hegedus *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1987).

Debido a que las especies de *Beauveria* se reproducen por producción de conidios (mitoesporas), ellas se han considerado asexuales y fueron tradicionalmente clasificados como hifomicetes asexuales (Deuteromycetes) (Fassatiová, 1986), sin embargo a través de métodos moleculares has sido posible colocar estos hongos entre sus congéneres sexuales.

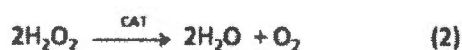
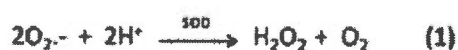
Recientes avances en la sistemática de *Beauveria* ponen en evidencia su relación con el teleomorfo del género *Cordyceps* (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipiteceae). Huang *et al.* (2002) confirman la relación de *C. bassiana* y *B. bassiana* basado en espaciadores internos transcritos (ITS). La conexión anamorfo-teleomorfo ha sido corroborado en forma independiente en subsecuentes análisis moleculares de pequeñas subunidades de RNA ribosomal (SSU-rRNA) (Rehner, 2005).

Tabla 1.4. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana* (Catalogue of Life, 2008).

Nombre	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. 1912
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Ascomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Clavicipitaceae
Genero	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>bassiana</i>

1.6 Efecto del Oxígeno sobre el Crecimiento de Hongos Entomopatógenos.

Se sabe que los organismos aerobios tienen que enfrentar los efectos tóxicos del O₂ ya que éste en ocasiones produce especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) debido al metabolismo celular, principalmente a la cadena respiratoria, o por acción de las NADPH oxidasas. Las ROS, tales como el radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, son altamente dañinos para los constituyentes celulares, incluidos DNA, lípidos y proteínas. Para proteger a las células de los posibles daños que pueden provocar las ROS, los organismos aerobios poseen defensas tanto enzimáticas como no enzimáticas, siendo unas muy importantes las superóxido dismutasas (SOD) y las catalasas (CAT) que se encuentran dentro de las defensas enzimáticas (Aguirre *et al.*, 2005; Fridovich, 1998).



Para la detoxificación de las ROS, primero el radical anión superóxido (O_2^-) es convertido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de las SOD (reacción 1), posteriormente las CAT descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (reacción 2).

Existen estudios donde se ha visto la respuesta que tienen tanto procariotas como eucariotas al estrés oxidativo, que se define como el desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidantes (Villa-Caballero *et al*, 2000). El estrés oxidativo provoca cambios morfogénéticos, cesa el crecimiento y en muchos casos lleva a la muerte de las células. Se sabe que en *Neurospora crassa* las ROS son necesarios para la citodiferenciación en ciertas fases del desarrollo celular, además induce la activación de sistemas antioxidantes de defensa tales como CAT y SOD (Belozerskaya y Gessler, 2006).

Angelova *et al.* (2004) estudiaron también la respuesta al estrés oxidativo en hongos filamentosos. Utilizaron paraquat y peróxido de hidrógeno como inductores de estrés oxidativo. Los resultados mostraron que el crecimiento era más lento y la producción de biomasa disminuía después de exponerlos a ROS, pero si le adicionaban SOD y CAT comerciales, la resistencia de las esporas a las ROS aumentaba.

Recientemente se ha demostrado que la cantidad de oxígeno es una limitante para la producción de blastosporas de *Metarhizium flavoviride* en CL; los resultados mostraron que con 100% de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se obtuvo el mejor rendimiento de blastosporas de dicho hongo (Issaly *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado que el consumo de oxígeno en *M. anisopliae* se incrementa en la germinación de los conidios, pocas horas después de que el tubo germinativo comienza a emerger (Braga *et al.*, 1999). Hasta el momento no se ha estudiado el efecto en el crecimiento y producción de conidios que provoca el estrés oxidativo en *Beauveria bassiana*.

2. ANTECEDENTES.

Además de los estudios relacionados con la producción de hongos entomopatógenos producidos en CMS mencionados anteriormente, en el laboratorio de Biología Molecular y Enzimología del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa se han realizado proyectos estudio con la finalidad de incrementar la virulencia de aislados de *B. bassiana*, para lo cual se realizaron mutaciones mediante radiación UV a 2 aislados silvestres de dicho hongo (Bb 4 y Bb 88) provenientes del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Posgraduados. Se utilizaron medios de cultivo con quitina y 2-desoxiglucosa (2DG) para seleccionar los aislados mutantes que no perdieran la capacidad de producir conidios, secreción de enzimas hidrolíticas y que tuvieran velocidades de crecimiento por lo menos similares a la de los aislados silvestres (Loera, 2005; Robledo *et al.*, 2005). Posteriormente se realizó la caracterización fisiológica de algunas de las mutantes obtenidas para lo cual se comparó la actividad enzimática en CMS y se realizaron pruebas de virulencia sobre *Sphenarium purpurascens* (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2004, 2005, 2007, 2008).

Asimismo, se ha determinado la relación entre fenotipos de fácil medición y la agresividad de los aislados contra insectos. Para ello se trabajó con una colección de aislados silvestres, mutantes y uno comercial de *B. bassiana*. Primero se determinaron los fenotipos sobre medios de cultivo, tales como la viabilidad, la densidad de los conidios y la velocidad de crecimiento radial. Posteriormente, por medio de bioensayos en larvas de *Tenebrio molitor*, se obtuvieron datos para conocer el aislado con mayor virulencia (Montesinos-Matías, 2008). Para el presente proyecto se utilizó el aislado Bb 885.2 el cual fue uno de los más virulentos con base en los resultados del trabajo descrito.

También se ha estudiado el efecto de la composición de la atmósfera sobre la producción y calidad de conidios de *B. bassiana*. Para la realización de dicho proyecto, se realizaron evaluaciones a distintos valores de a_w . Además se utilizó CMS con salvado de trigo como sustrato y soporte (Nuñez-Gaona *et al.*, 2008).

Paralelamente se ha evaluado el efecto de distintas composiciones de la atmósfera en la producción de biomasa de *Metarhizium anisopliae*, así como la calidad y la virulencia de sus conidios sobre larvas y adultos de *T. molitor* (Tlecuitl-Beristain, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN.

Recientemente el control biológico utilizando HE representa una alternativa al uso de insecticidas convencionales en México ya que se ha empleado con éxito para el control de diversas plagas en distintos estados del país como Guanajuato, Jalisco, Sinaloa y Tamaulipas. Los HE más usados han sido *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *P. fumosoroseus*, siendo el primero de gran importancia para el control de la broca del café (*Hyphothemus hampei*) debido a que esta plaga constituye una de las mayores amenazas para el sector cafetalero de México (De la Rosa *et al.*, 2000; Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999c; Montesinos-Matías, 2008).

Como se ha mencionado previamente, en la formulación de bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos existen problemas tales como el corto tiempo de vida de anaquel, variación de calidad entre lotes o la cantidad de conidios que se deben asperjar en campos de cultivo (Alatorre-Rosas, 2006). En los últimos años se han realizado estudios a nivel mundial con los hongos entomopatógenos mayormente utilizados, destacando *Beauveria bassiana* y *Metharizhium anisopliae*, para resolver estos problemas (Arzumanov *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005; Neves y Alves, 2000; Sun *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2006).

Por otro lado, no existen reportes sobre el efecto de las atmósferas en la producción de conidios en *Beauveria bassiana*, sólo se ha reportado el efecto de estrés oxidativo para otros hongos filamentosos (Angelova *et al.*, 2004; Belozerskaya y Gessler, 2006). En este trabajo se estudiará la respuesta de *Beauveria bassiana* a atmósferas con concentraciones distintas de oxígeno, y la posible interacción por la presencia de dióxido de carbono. La importancia del presente proyecto se basa en el análisis de parámetros de crecimiento, producción y calidad de conidios de *Beauveria bassiana*, usando un soporte natural fácilmente manipulable.

4. HIPÓTESIS.

La composición de la atmósfera afecta los patrones de crecimiento, producción y calidad de conidios de *Beauveria bassiana* obtenidos en CMS.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo General.

Estudiar el efecto que tiene la composición de distintas atmósferas sobre el crecimiento y calidad de conidios de *Beauveria bassiana*.

5.2. Objetivos Particulares.

Determinar las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de conidios.

Determinar los parámetros de rendimiento y tiempo máximo de producción conidios.

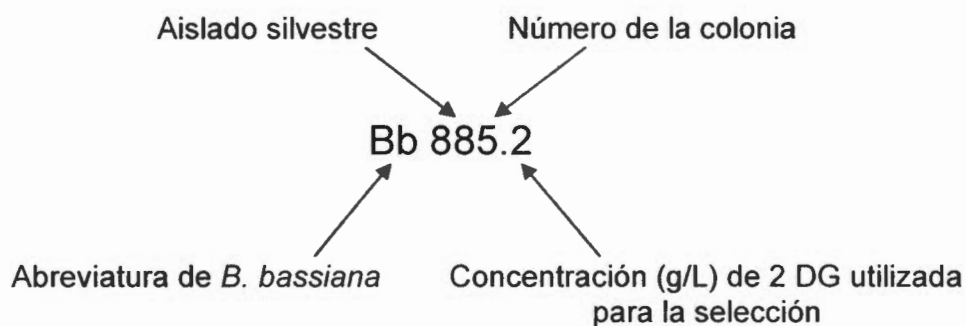
Evaluar el efecto de la atmósfera sobre los rendimientos y calidad de conidios obtenidos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Evaluación del Efecto de la Composición de la Atmósfera.

6.1.1. Microorganismo.

Se utilizó el aislado Bb 885.2 [esta cepa corresponde a la misma que reporta Robledo *et al.* (2005) como 882.5], perteneciente a la colección de hongos del laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa, debido a que ésta resultó ser el más virulento en un estudio previo (Montesinos-Matías, 2008), la cual se mantiene en pequeños cuadrillos de agar Saubouraud-Maltosa al 2% modificado (SMA) (agar 15g/L, maltosa 20 g/L, peptona de caseína 2.5 g/L, extracto de levadura 0.5 g/L, avena 15 g/L) depositados en viales de vidrio conteniendo agua desionizada (Garza-López y Loera, 2006). El significado del código de la nomenclatura del aislado utilizado se muestra a continuación:



6.1.2. Inóculo

El aislado de *B. bassiana* fue propagado por picadura en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de agar SMA, los cuales previamente fueron esterilizados en autoclave a 15 PSI durante 15 minutos y posteriormente se incubaron a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 8 días con fotoperíodo 12:12 horas.

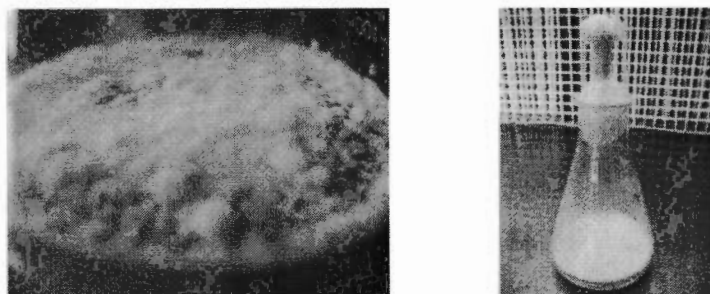


Figura 6.1. Propagación del aislado Bb 885.2.

6.1.3. Cultivo en Medio Sólido.

Se utilizaron botellas serológicas de 75 mL conteniendo 5 g de arroz pre-cocido las cuales fueron esterilizadas en el autoclave a 15 PSI durante 15 minutos. Se preparó una suspensión de conidios adicionando 20 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% estéril a los matraces Erlenmeyer utilizados en la propagación (sección 6.1.2). Posteriormente se realizó un conteo de conidios en cámara de Neubauer y las diluciones necesarias para obtener una concentración de 5×10^6 conidios por mililitro (con/mL). Finalmente se adicionó 1 mL de la suspensión de conidios para obtener una concentración final de 1×10^6 conidios por gramo de sustrato sólido inicial (con/gssi) y la cantidad necesaria de una solución de extracto de levadura estéril (0.5 g/L) para obtener humedad inicial de 40%, de la cual el extracto de levadura aportó nitrógeno y vitaminas para favorecer el crecimiento del hongo.

6.1.3.1. Composiciones Atmosféricas

Atmósfera	[O ₂]	[CO ₂]
Atmósfera Normal (AN)	21%	0%
21-5	21%	5%
16-5	16%	5%
26-0	26%	0%

La modificación de las composiciones atmosféricas se realizó colocando tapones de goma a las botellas serológicas, posteriormente se colocaron dos agujas, una para facilitar la salida de los gases y la segunda conectada por medio de una manguera a los tanques que contienen las diferentes mezclas gaseosas. Dicha modificación de la atmósfera se llevó a cabo a partir del tercer día de cultivo durante un minuto con recambios cada 24 horas para mantener la composición constante. El cultivo se incubó durante 8 días a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con fotoperíodo 12:12 horas, teniendo 3 réplicas para cada tratamiento.

Previamente se realizaron pruebas utilizando arroz como sustrato bajo las mismas condiciones de cultivo descritas previamente en esta sección, evaluando 40%, 50% y 60% de humedad inicial, con extracto de levadura (0.5 g/L) y sin extracto de levadura para determinar las mejores condiciones de cultivo únicamente con la atmósfera AN.

6.1.4. Determinación de Parámetros de Rendimiento.

6.1.4.1. Producción de Conidios.

Se realizaron conteos de conidios tomando muestras de las botellas serológicas cada 24 horas. Para ello, se adicionaron 20 mL una solución de Tween 80 al 0.05% a las botellas serológicas y se agitaron durante 10 minutos, posteriormente se realizó el conteo de conidios en la cámara de Neubauer.

6.1.4.2. Medición de pH.

La suspensión de conidios contenida en las botellas serológicas fue vertida en tubos Falcon de 50 mL para determinar los valores de pH utilizando un potenciómetro Conductronic pH 120.

6.1.4.3. Determinación de Proteína Soluble.

Se utilizó el método de Bradford (1976), debido a que esta técnica es más sensible comparado con otras metodologías (Bio-Rad), para lo cual se hizo una curva estándar con una solución de seroalbúmina bovina de 200 µg/mL (Anexo 11.1). Se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 595 nm. Para la determinación de proteína de las muestras se obtuvo un extracto adicionando 1 mL de la suspensión de conidios de los tubos Falcon a tubos Eppendorf y se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto. Se tomaron 800 µL del sobrenadante en tubos de ensayo de 10 mL y se adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford (Sigma™). Posteriormente se agitaron los tubos con un vórtex y se después de 5 minutos se leyó la absorbancia en espectrofotómetro (Beckman™ DU-640) a 595 nm.

6.1.4.4. Determinación de Actividad Amilasa.

Debido a que el componente principal del arroz es el almidón, el cual está formado por monómeros de glucosa, que es un azúcar reducto y además el hongo utiliza como fuente de energía, se utilizó el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) para cuantificar azúcares reductores (Miller *et al.* 1960). Se hizo una curva estándar con una solución de glucosa (2 mg/mL) (Anexo 11.2), leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 640 nm. Para la determinación de la actividad amilasa de las muestras se utilizó como sustrato una solución de almidón soluble al 1% (p/v) disuelta en buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.1). Asimismo se obtuvo un extracto como se describe en la sección 6.1.4.3. Se utilizaron tubos de ensayo de 10 mL. Se preparó un blanco general con 0.9 mL de sustrato y 0.1 mL de buffer. Se prepararon blancos de muestra adicionando 0.9 mL de sustrato. De igual manera para el análisis de las muestras se adicionaron 0.9 mL de sustrato. Posteriormente se pusieron todos los tubos en baño María a 40°C. Transcurrido un minuto se le agregó 0.1 mL de extracto a los tubos destinados a análisis de muestras y se adicionaron 1.5 mL de reactivo DNS al tubo de blanco general y a los tubos de blancos de muestra. Se

homogenizaron cuidadosamente todos los tubos y se dejó incubar por 30 minutos. Después de haber transcurrido el tiempo, se agregaron 1.5 mL de reactivo DNS a los tubos de las muestras para detener la reacción y 0.1 mL de extracto a los blancos de muestra; todos los tubos se pusieron a ebullición por 5 minutos. Después de ese tiempo, los tubos se pusieron en agua con hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia a 640 nm en un espectrofotómetro (Beckman™ DU-640). Una unidad de actividad amilasa fue definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo.

6.1.5. Determinación de Parámetros de Calidad.

6.1.5.1 Hidrofobicidad.

Para determinar la hidrofobicidad de los conidios, obtenidos en las diferentes composiciones atmosféricas, se realizó a los 8 días de cultivo el ensayo modificado de exclusión de fases utilizando n-hexadecano como solvente orgánico. Primero se centrifugaron las suspensiones de conidios obtenidos, como se indica en la sección 6.1.4.1, a 5000 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente, en varios tubos Eppendorff de 2 mL con la finalidad de tener suficiente volumen para el análisis. A continuación se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con agua destilada a 50°C; tanto la centrifugación como el lavado se realizó dos veces. Posteriormente se realizó una tercera centrifugación bajo las mismas condiciones y se adicionó nitrato de potasio (0.1 M) 1:1 v/v 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. Posteriormente, se adicionó 1 mL de n-hexadecano a tubos de ensayo y se agregaron 3 mL de la suspensión de conidios, se agitaron los tubos durante 10 segundos y se dejaron reposar por 30 minutos para permitir la separación de fases. Finalmente se recolectó la fase acuosa y se registraron los datos de densidad óptica (DO_{ac}) utilizando un espectrofotómetro a 660 nm (Boucias *et al.*, 1988; Jeffs y Khachatourians, 1997; Romero-Machado, 1996; Shah *et al.*, 2007). La densidad

óptica total (DO_{total}) se determinó con la suspensión de conidios inicial. La hidrofobicidad relativa se determinó utilizando una ecuación que describe la relación, expresada en porcentaje, entre los conidios hidrofóbicos que emigran a la fase orgánica y los que permanecen en la fase acuosa, la cual se muestra a continuación:

$$\text{Hidrofobicidad relativa (\%)} = 100 \left[1 - \left(\frac{DO_{ac}}{DO_{total}} \right) \right]$$

6.1.5.2. Porcentaje de Germinación.

Este parámetro se determinó a los 8 días de cultivo. Se prepararon cámaras húmedas colocando un portaobjetos con un soporte de goma sobre papel filtro. En los extremos de cada portaobjetos se colocó una alícuota de agar-agua (agar 15g/L) estéril con la ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente de una suspensión de conidios (1×10^3 con/mL) se adicionó una alícuota de 50 μ L sobre el de agar-agua ya solidificado y se adicionó 1 mL de agua destilada estéril al papel filtro de las cámaras húmedas. Pasadas 20 horas se realizó el conteo al microscopio de por lo menos 100 conidios, registrando los conidios germinados y los no germinados, utilizando el objetivo 40X. (Monzón, 2001). Los conidios con tubo germinativo mayor a su diámetro fueron considerados como germinados.

6.1.5.3. Cría de *Tenebrio molitor*.

Se separaron los diferentes estadios de *Tenebrio molitor* (larva, pupa, adulto) y se depositaron en contenedores de plástico con tapa agujerada para permitir que los insectos respiraran. Tres veces por semana se hizo limpieza de todos los contenedores para separar los estadios (Fig. 6.2) y quitar los cadáveres para evitar que la colonia se contaminara. Posteriormente se agregó avena y salvado de trigo como alimento y algodón humedecido con agua (Montesinos-Matías, 2008).

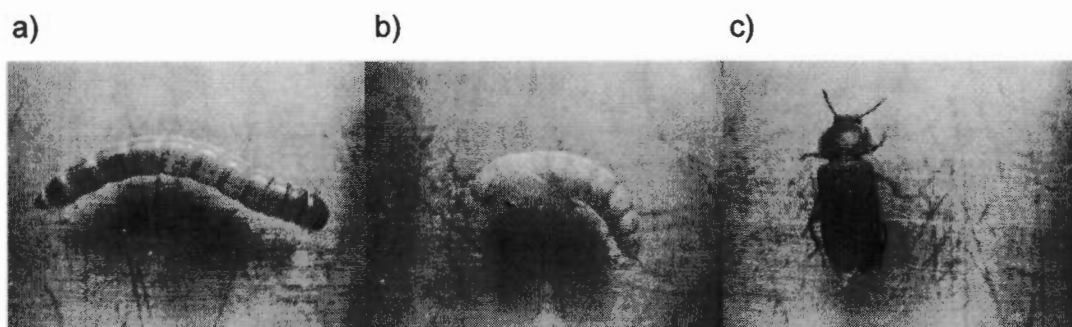


Figura 6.2. Estadios de *Tenebrio molitor*. a) Larva, b) Pupa, c) Adulto

6.1.5.4. Bioensayo.

Después de transcurrido el tiempo de CMS con atmósferas modificadas (sección 6.1.2), se obtuvieron suspensiones de conidios de los diferentes tratamientos, para lo cual se agregaron 30 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% en cada botella serológica, se agitaron durante 10 minutos y posteriormente se estandarizaron las suspensiones a una concentración final de 1×10^8 con/mL. Los conteos se realizaron en cámara de Neubauer. Se seleccionaron adultos de *Tenebrio molitor* sanos, de tamaño homogéneo formando grupos de 12 adultos por cada caja de Petri de 90 mm, para conformar una unidad experimental, teniendo además 5 replicas para cada tratamiento. Cada grupo de adultos fue sumergido en 30 mL de suspensión de conidios durante 3 segundos y depositado en una caja de Petri (Butt y Goettel, 2000; Eken *et al.*, 2006; Goettel e Inglis, 1997). Paralelamente, se hizo un tratamiento control, sumergiendo los insectos en 30 mL de Tween 80 al 0.05%. Se adicionó alimento estéril (avena, salvado de trigo 1:1) a todas las cajas. Finalmente las cajas de Petri se colocaron en una cámara húmeda, la cual consistió en una caja de plástico transparente con papel filtro humedecido con agua estéril y sellada con un pliego de plástico. Se incubaron las cajas a $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ con fotoperiodo 12:12 horas. Se mantuvo la cámara húmeda durante 5 días para promover la germinación de los conidios (Montesinos-Matías, 2008).

Se realizaron observaciones todos los días y se registró el número de individuos muertos. Posteriormente los insectos muertos se depositaron en cámara húmeda para confirmar que la muerte de los insectos fue debido a micosis producida por conidios de *B. bassiana* (Tefera y Pringle, 2003).

El tiempo en el que se alcanza 50% de mortalidad (TL_{50}) en los grupos de insectos se determinó mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que se muestra a continuación:

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

Donde:

k = Velocidad específica de mortalidad

t_0 = Tiempo de retardo de inicio de muerte

S = Porcentaje de sobrevivencia al final del bioensayo

Y = Porcentaje de sobrevivencia al tiempo **t**.

La ecuación anterior es una función de decaimiento exponencial a partir del momento en que los insectos infectados comienzan a morir (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2008). Los mejores ajustes de los datos experimentales se obtuvieron mediante el algoritmo Solver (Excel, Microsoft) (Montesinos-Matías, 2008).

6.2. Análisis Estadístico.

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey-Kramer, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para el análisis de diferentes porcentajes de humedad iniciales, la variable analizada fue rendimiento de conidios. Por otra parte, los parámetros analizados para el rendimiento debido efecto de la composición de la atmósfera al día final del cultivo fueron: rendimiento de conidios, pH, proteína soluble y rendimiento de actividad amilasa. En lo que respecta a la calidad de los conidios, los parámetros analizados fueron: TL_{50} , k , t_0 , S , viabilidad e hidrofobicidad. Se utilizó el programa de cómputo de análisis estadístico SPSS para Windows versión 13.

7. RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1. Efecto del contenido de humedad inicial del sustrato en la producción de conidios.

En la Figura 7.1 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de tres distintas humedades iniciales del sustrato (40%, 50% y 60%) y con o sin la adición de la solución de extracto de levadura (0.5 g/L). Con una humedad inicial de 40% en presencia de extracto de levadura, se obtuvo la mayor cantidad de conidios (4.9×10^9 con/gssi), a los 8 días de cultivo, mientras que con 50% de humedad inicial y sin la adición de extracto de levadura se registró la menor producción de conidios (4×10^7 con/gssi).

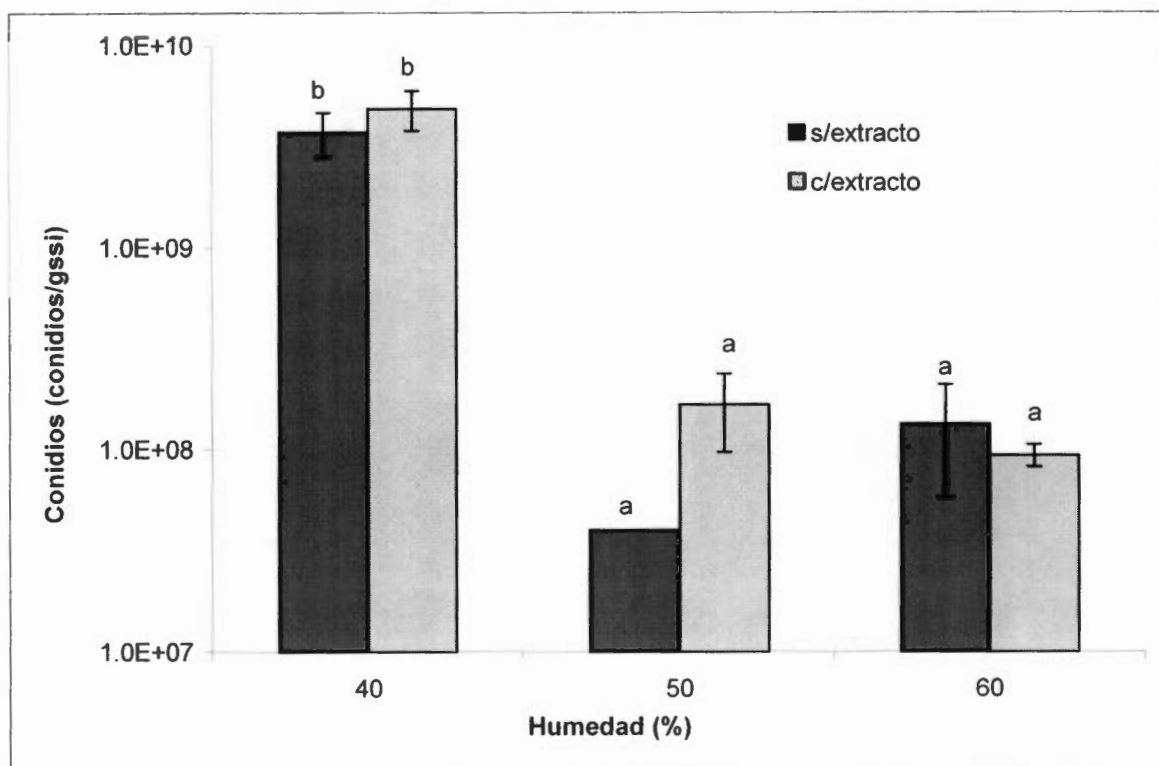


Figura 7.1. Concentración de conidios por gramo de sustrato sólido inicial medido a los 8 días de cultivo con distinta humedad inicial, con extracto de levadura y sin extracto de levadura (0.5 g/L) a atmósfera normal (AN). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tuckey ($P < 0.05$).

Asimismo se puede observar que se presentó una disminución en la producción de conidios en humedades mayores a 40%, siendo este porcentaje de humedad significativamente distinto ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos. Dicha disminución se pudo deber a que cuando se incrementa el contenido de agua, los poros del sustrato se llenan, dificultando la transferencia de oxígeno e impidiendo el crecimiento del hongo (Durand *et al.*, 1988; Nuñez-Gaona *et al.*, 2008). En un estudio previo, en el cual se utilizó el mismo aislado mutante de *B. bassiana* (Bb 885.2), se obtuvo una producción máxima de conidios con una humedad inicial del 66% utilizando salvado de trigo como sustrato, además se destacó que el incremento en la humedad inicial disminuía la producción de conidios (Nuñez-Gaona *et al.*, 2008). Una vez elegido el medio para obtener la máxima concentración de conidios en 8 días, se procedió a probar el efecto de las atmósferas en los parámetros fisiológicos y de calidad.

7.2. Perfiles de Producción de Conidios.

En lo que respecta a la determinación de parámetros de rendimiento (Fig. 7.2), se puede observar que al octavo día de cultivo, la cantidad máxima de conidios se obtuvo en la atmósfera denominada 26-0 (1.1×10^9 con/gssi), teniendo diferencia significativa con el resto de las atmósferas ($P < 0.05$). En la atmósfera 21-5 se obtuvo la producción de conidios más baja al final del cultivo (1.8×10^8 con/gssi).

El tiempo máximo de producción de conidios para el tratamiento AN fue al día 7 (Fig. 7.2), lo cual coincide con experimentos realizados con anterioridad en el laboratorio (Nuñez-Gaona *et al.*, 2008); sin embargo, el aislado de *B. bassiana* utilizado alcanzó la producción máxima de conidios 24 horas después con el resto de las composiciones atmosféricas. El rendimiento de la producción de conidios se incrementó 48% con la atmósfera 26-0 y 6% con atmósfera 16-5, en comparación a la atmósfera normal (AN). Es importante señalar que con la atmósfera 21-5 el rendimiento fue de solo 16% respecto a lo obtenido con la atmósfera AN (1.8×10^8

con/gssi y 1.1×10^9 con/gssi respectivamente). De acuerdo con el estudio realizado por Ye *et al.* (2006), en el cual se utilizó un sistema bifásico y arroz como sustrato para la producción de conidios, fue posible obtener rendimientos de aproximadamente 2.4×10^9 conidios/gssi; sin embargo, debido a que el inóculo que se utilizó para ese experimento fue micelio activo obtenido en CL, la producción máxima de conidios fue al sexto día de cultivo.

En un reporte de Grimm (2001) se mencionó un proceso de producción de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae* en Costa Rica, el cual consistió en una propagación en agar PDA sobre cajas de Petri, posteriormente, se tomaba inóculo y se depositaba en matraces Erlenmeyer que contenían 50 g de arroz pre-cocido y finalmente los conidios obtenidos de los matraces se transferían a bolsas de polipropileno con 200 g de arroz pre-cocido. Los rendimientos obtenidos de conidios fueron de 5×10^9 con/gssi y 8×10^8 con/gssi respectivamente para los HE utilizados. Cabe destacar que todo este proceso tomó aproximadamente 30 días. En este sentido, se realizó un estudio para seleccionar diferentes cepas de *B. bassiana* en el cual se utilizó el mismo sustrato y los rendimientos obtenidos máximos fueron de 2.7×10^9 con/gssi aunque no se menciona el tiempo del cultivo (Neves y Alves, 2000).

Por su parte, Kang *et al.* (2005) utilizaron una mezcla salvado de trigo y cascarilla de arroz como sustrato, depositados en un biorreactor. Se observó una producción máxima de conidios de 1×10^{10} con/gssi. En otro experimento se estudió la influencia del sustrato sobre la producción de conidios de *B. bassiana* utilizando distintos residuos agroindustriales, tales como residuos de papa, bagazo de caña y residuos de café. Los resultados mostraron que la mayor producción de conidios fue de 1.1×10^{10} conidios/gssi, siendo el sustrato una combinación de residuos de papa y bagazo de caña (60-40% p/p), sin embargo el inóculo inicial fue de 10^7 conidios/gssi y el tiempo de cultivo fue de 10 días (Dalla-Santa *et al.*, 2005); este nivel de inóculo fue del doble comparado con el presente trabajo, además los cultivos se prolongaron 2 días más.

También se sabe que utilizando únicamente salvado de trigo como sustrato para la producción de conidios de *B. bassiana* se pueden obtener rendimientos de alrededor de 1×10^{10} con/gssi (Nuñez-Gaona *et al.*, 2008).

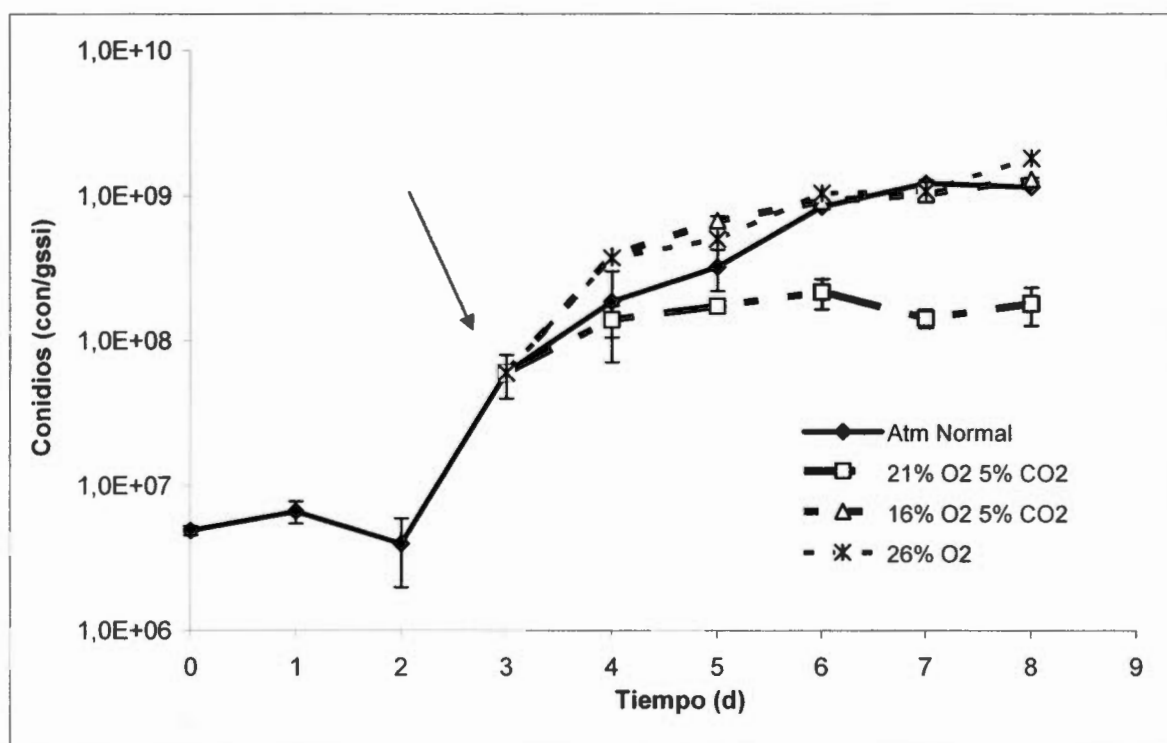


Figura 7.2. Cinética de producción de conidios del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas. (◆Atmósfera Normal; □Atmósfera 21% O₂, 5% CO₂; △Atmósfera 16% O₂, 5% CO₂; ✱Atmósfera 26% O₂). La flecha indica el día en que se inició la modificación de la atmósfera.

Los rendimientos de producción de conidios obtenidos bajo las distintas composiciones atmosféricas utilizadas son similares a algunos de los resultados publicados en la literatura, como se describe previamente (Fig. 7.2). Sin embargo, los datos publicados en los que se muestra que los conidios producidos fue mayor, puede ser debido a la utilización de diferentes sustratos o tipos de cultivo, como se describe anteriormente. Asimismo, ninguno de los trabajos mencionados incluye

modificaciones en la composición del aire o uso de moléculas que induzcan estado oxidante.

Como se ha mencionado anteriormente, el oxígeno tiene un papel limitante en la producción de unidades infectivas en *M. flavoviride*, ya que se necesita que el medio líquido esté saturado de oxígeno (Issaly *et al.*, 2005). Por otra parte, algunos hongos filamentosos como *N. crassa* y *A. nidulans*, necesitan la generación metabólica de ROS, ya que éstos actúan como mecanismos de señalización en la diferenciación celular, además se activan los sistemas antioxidantes enzimáticos (Aguirre *et al.*, 2005; Belozerskaya y Gessler, 2006). En este sentido, Angelova *et al.* (2004) desarrollaron un experimento donde indujeron estrés oxidativo en varias especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* por medio de moléculas altamente oxidantes; los resultados obtenidos mostraron disminución en el crecimiento y producción de biomasa de dichos hongos.

Se ha estudiado el efecto del CO₂ sobre el crecimiento de hongos filamentosos como *A. niger* y *P. chrysogenum* (Ho y Smith, 1986; McIntyre y McNeil, 1997; Smith y Ho, 1985), los resultados mostraron que a concentraciones entre 3% y 5% de CO₂ la producción de penicilina y la velocidad de crecimiento de *P. chrysogenum* no se afectó, además para el caso de *A. niger* se inhibía considerablemente la producción de biomasa y citrato en la fase lag de crecimiento, con una mezcla gaseosa que contenía 7.5% (v/v) de CO₂. Por su parte, Ikasari y Mitchell (1998), utilizando *Rhizopus oligosporus*, reportaron que el tiempo de fermentación se prolongaba al usar concentraciones de CO₂ entre 8 y 16% disuelto en medio líquido. Asimismo, se ha encontrado que este gas beneficia el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium*, *Polyporus tulipiferae*, and *Polyporus sp.* (Levonen-Muñoz y Bone, 1985). Un dato importante es que a concentraciones de CO₂ de 8%, las hifas y esporas de *P. chrysogenum* se hinchaban y se encontraron células esféricas con forma de levaduras (Smith y Ho, 1985). En este sentido también se ha demostrado que en *Aspergillus ruber*, *A. flavus*, *Penicillium brevi-compactum* y otros, la velocidad

de crecimiento radial aumentaba con una concentración de CO_2 de 10% (Yang y Lucas, 1970).

7.3. Perfiles de pH.

Como se puede observar en la Figura 7.3, los perfiles de pH tuvieron variaciones en todas las atmósferas. Con la atmósfera AN se obtuvo el menor valor ($\text{pH}=5.6$), significativamente distinto ($P < 0.05$) a los valores alcanzados con el resto de las atmósferas. Además la atmósfera 16-5 mostró el mayor valor de pH (6.0).

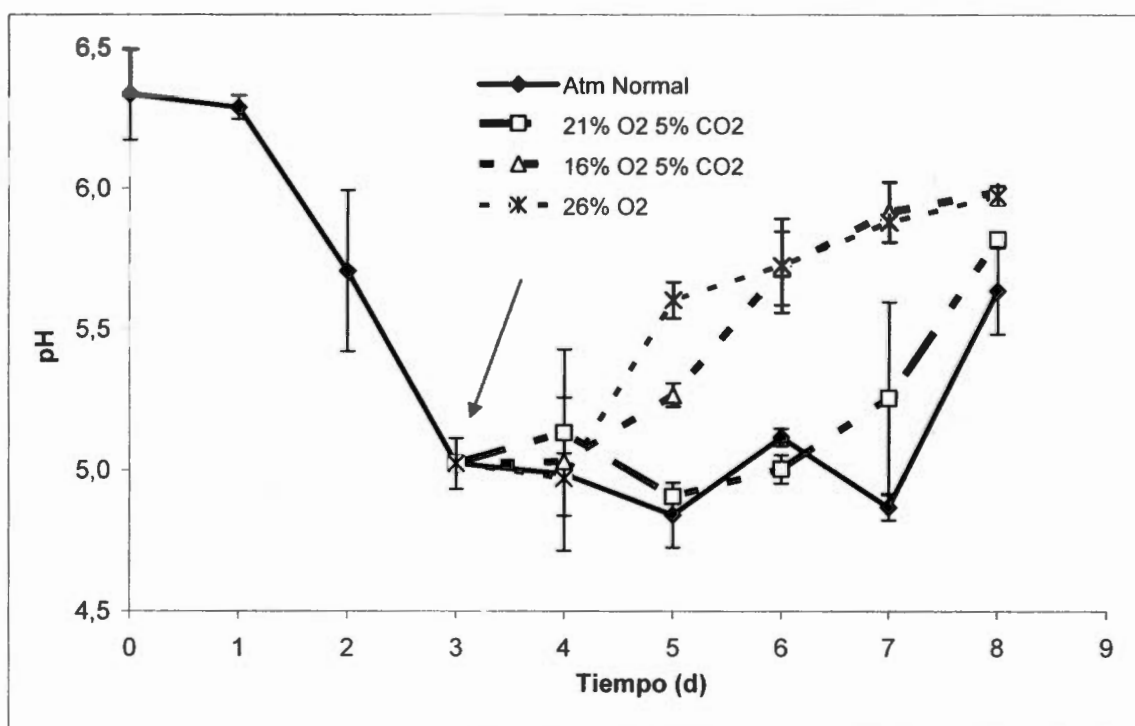


Figura 7.3. Cinética de pH del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas. (◆ Atmósfera Normal; □ Atmósfera 21%, O₂ 5% CO₂; △ Atmósfera 16% O₂, 5% CO₂; ✕ Atmósfera 26% O₂). La flecha indica el día en que se inició la modificación de la atmósfera.

Ying y Feng (2006) estudiaron el efecto de distintas fuentes de carbono, rango de pH inicial (entre 4 y 8) y concentraciones de metales sobre conidios aéreos de *B. bassiana* y su relación con la tolerancia al estrés térmico. Los resultados obtenidos mostraron que los conidios fueron más resistentes a la temperatura en un rango de pH entre 5 y 6, además la fuente de carbono óptima fue glucosa.

Se han realizado estudios en los que se varía el rango de pH inicial del sustrato, utilizando *B. bassiana*, obteniendo los mejores rendimientos a pH 6 (Dalla-Santa *et al.*, 2004, 2005; Soccol *et al.*, 1997). Por otra parte se han registrado los valores de pH en un cultivo en medio líquido Papa-Dextrosa (PDB) del mismo HE a los 7 días; dichos valores oscilan entre 4.3 y 5.4 (Talaie-Hassanloui *et al.*, 2006). Recientemente, se desarrolló un experimento donde se ajusta el valor inicial de pH a 7 para la propagación y obtención de conidios de *B. bassiana* en medio PDA (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2008).

Se puede observar que los valores reportados de pH iniciales y finales son muy variados dependiendo de las condiciones y tipo de cultivo, tal como ocurre con los rendimientos de conidios obtenidos. Es importante señalar que las cinéticas de pH obtenidos bajo las diferentes condiciones atmosféricas (Fig. 7.3) se encuentran dentro del rango de valores de pH reportados en los diferentes estudios realizados.

7.4. Perfiles de Proteína Soluble.

Los perfiles de proteína soluble en el extracto presentaron tendencias muy similares para los cuatro tratamientos evaluados (Fig. 7.4). Cabe señalar que se puede apreciar un aumento en los últimos tres días de la cinética con la atmósfera 16-5, siendo significativamente mayor ($P < 0.05$) a la proteína soluble presente con la atmósfera AN: 5.0 y 3.7 mg/gssi, respectivamente al octavo día de cultivo.

Una forma de medir actividad metabólica de *B. bassiana* bajo las condiciones de cultivo de este proyecto se determinó con esta variable de respuesta, debido a las dificultades de obtener valores confiables de biomasa; sin embargo, no hay reportes en los que se realicen mediciones de proteína soluble con la misma finalidad, únicamente para reportar actividad específica de proteasas (Donatti *et al.*, 2008).

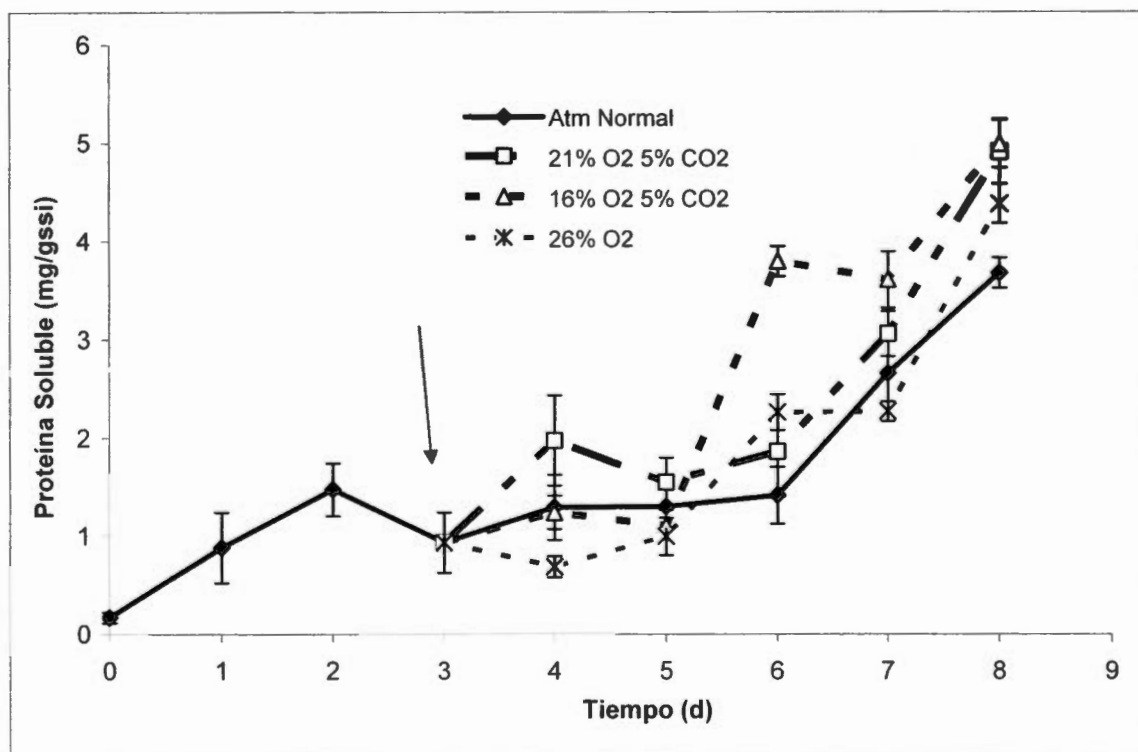


Figura 7.4. Cinética de proteína soluble presente en el extracto del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas. (◆ Atmósfera Normal; □ Atmósfera 21% O₂, 5% CO₂; △ Atmósfera 16% O₂, 5% CO₂; ✕ Atmósfera 26% O₂). La flecha indica el día en que se inició la modificación de la atmósfera.

7.5. Perfiles de Actividad Amilasa.

Los perfiles de actividad de amilasas totales mostraron que en la atmósfera 21-5 se aumentó de manera importante el rendimiento de ésta actividad, alcanzado 12.6 UI/gssi (Fig. 7.5), mientras que el menor rendimiento fue de 4.1 UI/gssi en la atmósfera con la más baja concentración de oxígeno (16-5). Cuando no existe limitación de O_2 , la concentración de CO_2 tiene un efecto positivo en la producción de amilasas, puesto que la producción de estas enzimas se incrementó 2.5 veces con la atmósfera 21-5 comparado con el valor obtenido en la atmósfera AN.

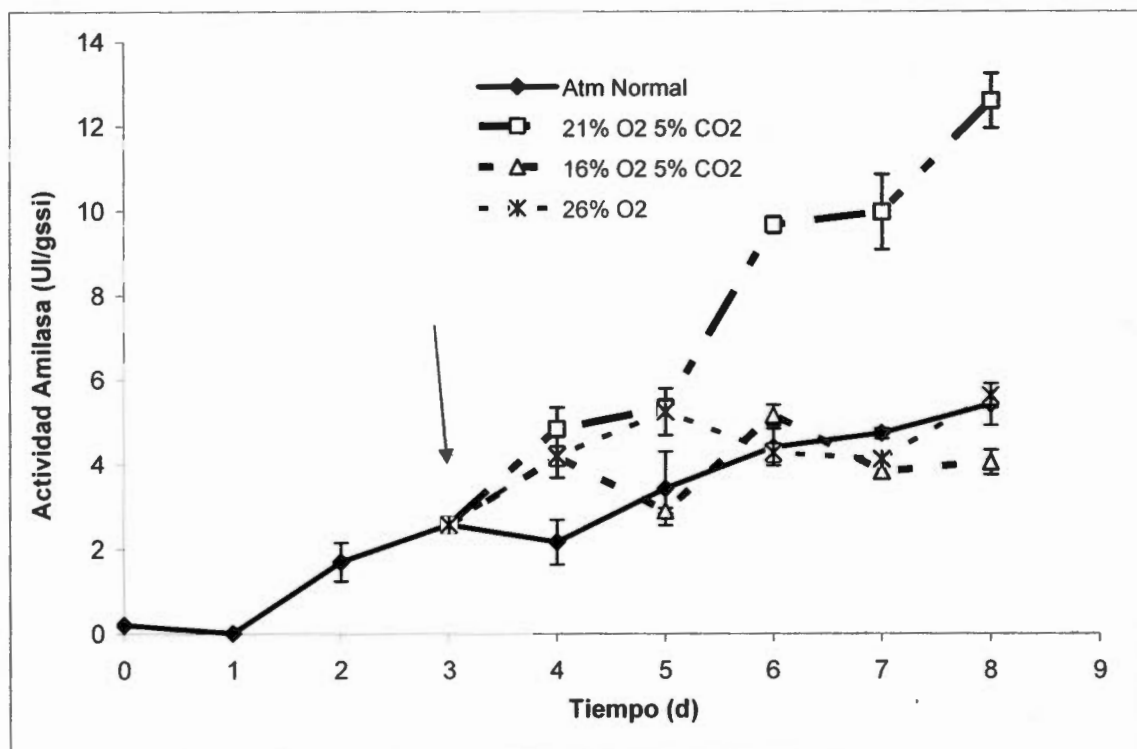


Figura 7.5. Cinética de rendimiento de actividad amilasa del aislado Bb 885.2 a distintas composiciones atmosféricas. (◆ Atmósfera Normal; □ Atmósfera 21% O_2 , 5% CO_2 ; △ Atmósfera 16% O_2 , 5% CO_2 ; ✕ Atmósfera 26% O_2). La flecha indica el día en que se inició la modificación de la atmósfera.

De igual manera se puede observar que la actividad amilasa se incrementó a partir del segundo día de recambio atmosférico. La producción de amilasas en diferentes hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavipes* y *N. crassa* se ha evaluado entre 48 y 168 horas (2 y 7 días) dependiendo del microorganismo y las condiciones de cultivo (Frolova *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 1998; Guimaraes *et al.*, 2006; Juge *et al.* 1998).

7.6. Hidrofobicidad y Germinación.

Previo a la realización del bioensayo se realizó la determinación de los parámetros de hidrofobicidad y germinación, ya que están relacionados con la virulencia, además en este trabajo se pretendió evaluar cómo se afectan en función de la atmósfera, lo cual no ha sido reportado. Como se puede observar en la figura 7.6, los porcentajes de hidrofobicidad y de germinación de los conidios obtenidos también fueron afectados por la composición de la atmósfera. El mayor porcentaje de hidrofobicidad se obtuvo con la atmósfera AN (64.2%), el cual fue significativamente mayor a los valores obtenidos con el resto de las atmósferas evaluadas ($P < 0.05$), mientras que el valor menor fue de 37.1% obtenido con la atmósfera 16-5. Comparativamente, el valor de hidrofobicidad obtenido con el tratamiento AN y los respectivos de las atmósferas modificadas, disminuyeron al menos 25%.

En lo que respecta al porcentaje de germinación, los conidios obtenidos con el tratamiento AN presentaron un valor de 88.7% teniendo diferencia significativa ($P < 0.05$) con los tratamientos restantes; por su parte, los conidios obtenidos con la atmósfera 16-5 mostraron el porcentaje de germinación menor (43.3%). Dichas disminuciones son más notables cuando las atmósferas utilizadas contenían CO_2 (Fig. 7.6). Cabe señalar que la modificación de la atmósfera provocó una disminución de aproximadamente 24% con respecto a la AN.

Previamente se ha determinado la hidrofobicidad de los conidios de aislados silvestres y mutantes de *B. bassiana* utilizando el método de exclusión de fases con la diferencia de que se utilizó tolueno como solvente orgánico. Dicho experimento mostró valores de hidrofobicidad entre 60% y 100% dependiendo del aislado y no se encontró ninguna correlación positiva entre este parámetro y el aumento de la virulencia de los aislados utilizados (Montesinos-Matías, 2008).

La hidrofobicidad es un factor muy importante que debe ser considerado en la formulación de un bioinsecticida ya que de esto depende que los conidios de los HE se adhieran a la cutícula de los insectos (Boucias y Pendland, 1998; Hegedus *et al.*, 1992). Dentro de las vías de infección de los HE, la más importante es por medio del tegumento del insecto por lo que la unión de los conidios a la cutícula se efectúa en dos pasos. Primero, se realiza una unión no específica mediada por la interacción hidrofóbica de la epicutícula del insecto con la pared celular de los conidios. Posteriormente se efectúa una unión específica entre antígenos que se encuentran en la superficie de los conidios y la cutícula del hospedero (Jeffs y Khachatourians, 1997). Además se ha demostrado que las capas exteriores de los conidios, las cuales son hidrofóbicas, ayudan a proteger a éstas contra las condiciones ambientales que pudieran afectarlas tales como falta de humedad, temperaturas extremas y radiación UV (Boucias *et al.*, 1988).

Se ha recomendado que el parámetro de germinación sea medido desde las 12 y hasta las 72 horas, sin embargo es muy común determinar este parámetro a las 24 horas (Goettel e Inglis, 1997). De igual manera se ha publicado en la literatura que en algunos países de Centroamérica es común medir el porcentaje de germinación de hongos entomopatógenos a las 20 horas (Monzón, 2001).

En estudios similares realizados con anterioridad sobre agar Sabouraud Maltosa (SMA), se reportan valores de porcentaje de germinación entre 50% y 87%, agar Sabouraud Maltosa (SMA) (Montesinos-Matías, 2008). Por su parte, Talaei-

Hassanloui *et al.* (2006) determinaron el porcentaje de germinación en distintas cepas de *B. bassiana*, propagadas en medio SDA a las 24 horas obteniendo un intervalo entre 23% y 81%. Las cepas que tuvieron los mayores porcentajes de germinación fueron provenientes del medio oriente mientras que la de menor valor fue una cepa de Canadá. Lo anterior indica que las diferencias entre los porcentajes de germinación e hidrofobicidad dependen del tipo de cultivo y de los aislados utilizados.

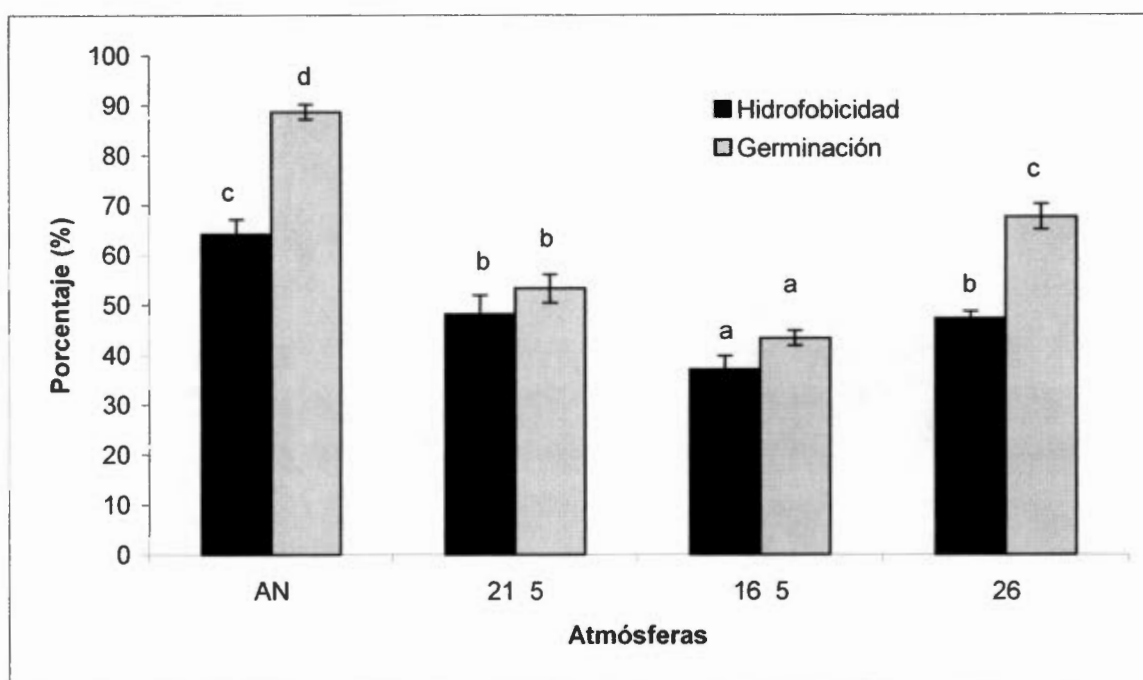


Figura 7.6. Porcentaje de hidrofobicidad y germinación de los conidios obtenidos a los 8 días de cultivo bajo diferentes composiciones atmosféricas. AN: Atmósfera Normal; 21 5: 21% O₂ 5% CO₂; 16 5: 16% O₂ 5% CO₂; 26: 26% O₂. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tuckey ($P < 0.05$).

7.7. Bioensayo.

Respecto a la determinación de los parámetros de calidad sobre adultos de *Tenebrio molitor*, una vez que se realizó el ajuste al modelo descrito en la sección 6.1.4.4, únicamente se alcanzó TL₅₀ con conidios obtenidos del tratamiento AN y 26-0, siendo

significativamente distintos ($P < 0.05$), ya que con los conidios obtenidos con los tratamientos 16-5 y 21-5, el porcentaje de mortalidad fue menor al 50% (31.6 y 47.5, respectivamente). Para el parámetro k no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). En cuanto al parámetro t_0 , el menor tiempo se obtuvo con la atmósfera AN (2.9 días) el cual es significativamente diferente a los valores obtenidos con las atmósferas restantes ($P < 0.05$). En lo que respecta al parámetro S , únicamente con el tratamiento AN se obtiene 0% de sobrevivencia de insectos infectados, siendo significativamente diferente al resto de los tratamientos ($P < 0.05$), mientras que con la atmósfera denominada 16-5 los insectos infectados tuvieron en mayor porcentaje de sobrevivencia (68.4%). Lo anterior indica que el aumento en los valores de estos parámetros, debido a la modificación de la composición de la atmósfera, principalmente por la presencia de CO_2 , se reflejó en la disminución virulencia de los conidios, ya que los insectos infectados tardaron más tiempo en morir y no se alcanzó el 100% de mortalidad (Tabla 7.1, Figura 7.7).

Por otra parte, la presencia de CO_2 provocó que la calidad de los conidios obtenidos disminuyera, debido a que no se alcanza el 50% de mortalidad de los insectos infectados. De igual manera, la modificación de las atmósferas incrementó casi al doble el tiempo de retardo de inicio de muerte (Tabla 7.1, Figura 7.7). Una característica de los conidios que puede explicar estos resultados se encuentra en los cambios en la hidrofobicidad, ya que el crecimiento en presencia de CO_2 (5%) y aunado a la baja en O_2 (16%), causó una disminución significativa de éste parámetro. Sin embargo, el efecto más notable fue en la reducción en el porcentaje de germinación (Fig. 7.6). Es importante señalar que estas comparaciones deben incluir otros insectos plaga, así como bioensayos en distintos estadios de desarrollo, de manera que se tenga una valoración del efecto de las atmósferas sobre otros insectos. Los distintos tipos de insectos y estadios de desarrollo tienen un efecto diferencial en la respuesta de virulencia (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2008).

En estudios realizados previamente, se reportaron valores para *B. bassiana* de TL_{50} entre 2.3 y 4.1, k entre 0.8 y 3.7, t_0 1.7 y 3.4, además el porcentaje de sobrevivencia no superó 3%, usando adultos de *Tenebrio molitor*. Los parámetros de virulencia fueron obtenidos con ayuda del mismo modelo propuesto en este trabajo (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2008). Asimismo se han utilizado larvas del mismo insecto con los cuales se obtuvieron valores menores en todos los parámetros mencionados anteriormente. Dichas diferencias se pueden atribuir al efecto de los sustratos y aislados utilizados (Montesinos-Matías, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2008).

Por otra parte, se han desarrollado estudios en los que comparan la virulencia de tres cepas de *B. bassiana* y una de *M. anisopliae* sobre larvas de *T. molitor*. Se evaluaron diferentes medios de cultivo, variando la relación C/N; sin embargo, únicamente reportan valores de TL_{50} dentro de un rango de 2 a 12 días, dependiendo del microorganismo (Safavi *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2005). De manera similar, se han realizado experimentos en los que se utilizaron diferentes HE e insectos hospederos. Gindin *et al.* (2006) evaluaron la virulencia de *B. bassiana* y *M. anisopliae* contra huevecillos, larvas y adultos de *Rhynchophorus ferrugineus*; los resultados mostraron que las cepas de *B. bassiana* no produjeron mortalidad mayor de 20%, mientras que *M. anisopliae* produjo 100% de mortalidad.

Por su parte, Sheeba *et al.* (2001) utilizaron *B. bassiana* para evaluar la virulencia en *Sitophilus oryzae* y encontraron que a una concentración de 10^7 con/mL el porcentaje de mortalidad era de 75% aproximadamente y TL_{50} de 13.5 días. Asimismo, se utilizó *B. bassiana* para estudiar la virulencia contra *Plutella xylostella* y *Leptinotarsa decemlineata* teniendo mortalidad máxima de 75% y 60% respectivamente (Talaie-Hassanloui *et al.*, 2006).

Las diferencias de virulencia de *B. bassiana* entre diversos insectos es inherente a las cepas utilizadas. De igual manera, son notables las diferencias en los parámetros de virulencia entre *B. bassiana* y *M. anisopliae* aún cuando se utilizó el mismo

insecto hospedero. Además es necesario mencionar que no se puede realizar una comparación más estricta debido a que se utilizan diferentes modelos para obtener los parámetros de virulencia.

De acuerdo con la literatura, se han evaluado en diversos hongos filamentosos combinaciones de mezclas de gases, variando la proporción de oxígeno y dióxido de carbono, los resultados encontrados no muestran una tendencia específica. Sin embargo, para el caso de hongos entomopatógenos no se han encontrado reportes donde se haya evaluado el efecto de diferentes composiciones atmosféricas sobre la producción de conidios, así como el impacto en la calidad de los mismos.

Tabla 7.2. Resumen de parámetros fisiológicos de conidios de *Beauveria bassiana* obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey-Kramer ($P < 0.05$).

Atmósfera	Producción de Conidios (con/gssi)	pH	Proteína Soluble (mg/gssi)	Actividad Amilasa (UI/gssi)
AN	$1.1 \times 10^9 \pm 2.1 \times 10^7$ b	5.6 ± 0.2 a	3.7 ± 0.2 a	5.4 ± 0.5 b
21-5	$1.8 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^7$ a	5.8 ± 0.0 a, b	4.9 ± 0.3 b	12.6 ± 0.7 c
16-5	$1.3 \times 10^9 \pm 4.0 \times 10^7$ c	6.0 ± 0.0 b	5.0 ± 0.3 b	4.1 ± 0.3 a
26	$1.8 \times 10^9 \pm 5.3 \times 10^7$ d	6.0 ± 0.0 b	4.4 ± 0.2 b	5.6 ± 0.3 b

Tabla 7.3. Resumen de parámetros importantes de calidad de conidios de *Beauveria bassiana* obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey-Kramer ($P < 0.05$).

Atmósfera	TL ₅₀ (d)	S (%)	Hidrofobicidad (%)	Germinación (%)
AN	3.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0 a	64.2 ± 2.9 c	88.7 ± 1.5 d
21-5	---	52.5 ± 12.3 b, c	48.2 ± 3.7 b	53.3 ± 2.9 b
16-5	---	68.4 ± 5.9 c	37.1 ± 2.8 a	43.3 ± 1.5 a
26	6.1 ± 0.1	35.6 ± 10.3 b	47.3 ± 1.4 b	67.7 ± 2.5 c

8. CONCLUSIONES

Se demostró que a humedades iniciales superiores a 40% el aislado de *Beauveria bassiana* Bb 885.2 disminuyó su crecimiento sobre arroz. Por otra parte, se encontró que este aislado tiene un efecto positivo en la producción de conidios cuando se incrementa la concentración de O₂ (26%). Asimismo, se encontró que el aislado fue sensible al incremento en la concentración de CO₂ (5%), ya que se produjo un decremento en la producción de conidios y un aumento en la actividad amilasa.

Respecto a las variables de calidad de los conidios analizadas (TL₅₀, k, t₀, S, hidrofobicidad y germinación) sobre *Tenebrio molitor*, se observó que todas las variables fueron afectadas al modificar la atmósfera. El efecto más notable, tal como se observó en las variables fisiológicas, fue cuando las mezclas gaseosas contenían 5% de CO₂, ya que en general la calidad de los conidios disminuyó.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar perfiles de producción de conidios, pH, proteína soluble y actividad amilasa, así como los parámetros de calidad de conidios obtenidos bajo las composiciones atmosféricas 16% O₂ sin CO₂ y 26% O₂, 5% CO₂.
- Realizar bioensayos en larvas de *Tenebrio molitor* con la finalidad de maximizar las diferencias del efecto de la composición de la atmósfera y comparar con los resultados obtenidos en adultos del mismo insecto.
- Determinar la existencia de estrés oxidativo en los cultivos sometidos a las diferentes atmósferas.

10. REFERENCIAS

- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg, W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*. 13: 111-118.
- Alatorre-Rosas, R. Insecticidas Microbianos en el Manejo de Insectos Plaga. Taller: Hongos Entomopatógenos: Control de Calidad. Manzanillo, Colima, México. Noviembre 2006. 1-9 pp.
- Alatorre-Rosas, R. 2007. Hongos entomopatógenos. En: Teoría y Aplicación del Control Biológico. L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Capítulo 9. 127-143.
- Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B., Tamai, M. A., Pereira R. M. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 81: 70-77.
- Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova B. K., Vassilev, S. V., Slokoska, L. S. 2004. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research*. 1-9.
- Arzumanov, T., Jenkins, N., Roussos, S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridium*. *Process Biochemistry*. 40: 1037-1042.
- Barrera, J. F. 2007. Hongos entomopatógenos. En: Teoría y Aplicación del Control Biológico. L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal. Sociedad Mexicana de Control Biológico. Capítulo 1. 1-18.
- Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N. 2006. Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Mikrobiologiya*. 75: 427-431.
- Bidochka, M.J., Khachatourians. 1992. Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 59:165-173.
- Bio-Rad Protein Assay. Bio-Rad Laboratories™.
- Boucias, D. G., Pendland, J. C. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers. 1-14 pp.

Boucias, D. G., Pendland, J. C., Latge, J. P. 1988. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1975-1805.

Bradford, M. 1976. A quick and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

Braga, G. U. L., Destéfano, R. H. R., Messias, C. L. 1999. Oxygen Consumption by *Metarhizium anisopliae* during Germination and Growth on Different Carbon Sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 112-119.

Butt, T. M., Goettel, M. S. 2000. Bioassays with Entomogenous Fungi. *In*: A. Navon and K.R.S. Ascher eds. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*: Willingford, UK: CABI Publishing, 141-195.

Candas, M., Bulla, L. A. 2003. Microbial Insecticides. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright © 2002 by John Wiley & Sons.

Casida, J. E., Quistad, G. B., 1998. Golden age of insecticides research. Past, Present or Future. *Annual Review of Entomology*. 43: 1-16.

Catalogue of Life: 2008 Annual Checklist. <http://www.catalogueoflife.org/search.php>. 29 de septiembre de 2008.

Clarkson, J. M., Charnley, A. K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*. 4: 197- 203.

Dalla-Santa, H. S., Dalla-Santa, O. R., Brand, D., Porto de Souza-Vandenberghe, L., Soccol, C. R. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48: 51-60.

Dalla-Santa, H. S., Sousa, N. J., Brand, D., Dalla-Santa, O. R., Pandey, A., Sobotka, M., Pada, J., Soccol, C. R. 2004. Conidia production of *Beauveria* sp. by Solid-State Fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* Caterpillars. *Folia Microbiologica*. 49: 418-422.

De la Rosa, W., Alatorre, R., Barrera, J. F., Toriello, C. 2000. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: *Scolytidae*) under field conditions. *Journal of Economic Entomology*. 93: 1409-1414.

De la Rosa, W., Alatorre, R., Trujillo, J., Barrera, J. F. 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: *Scolytidae*). *Journal Economic Entomology*. 90: 1534-1538.

De la Rosa, W., López, C. L., Liedo, P. 2002. *Beauveria bassiana* as a Pathogen of the Mexican Fruit Fly (Diptera: *Tephritidae*) under Laboratory Conditions. *Journal of Economic Entomology*. 95: 36-43.

Deshpande, M. V. 1999. Mycopesticide Production by Fermentation: Potential and Challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, 25(3):229-243.

Diario Oficial de la Federación. 28 de Diciembre de 2004. Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos. SEMARNAT. México.

Diario Oficial de la Federación. 18 de Marzo de 2005. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Secretaría de Salud. México.

Diario Oficial de la Federación. 19 de Marzo de 2008. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Secretaría de Salud. México.

Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., Viniegra-González, G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 26: 271-275.

Donatti, A. C., Furlaneto-Maia, L., Fungaro, M. H. P., Furlaneto, M. C. 2008. Production and Regulation of Cuticle-Degrading Proteases from *Beauveria bassiana* in the Presence of *Rhammatocerus schistocercoides* Cuticle. *Currents of Microbiology*. 56: 256-260.

Durand, A., Pichon, P., Desgranges, C. 1988. Approaches to KLa measurements in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques*. 2: 11-16.

Eken, C., Tozlu, G., Dane, E., Coruh, S., Demirci, E. 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycete) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae). *Mycopathologia* 162: 69-71

Elizalde-Blancas, V. 2006. Signos y Síntomas causados por Hongos Entomopatógenos en Insectos Hospederos. Taller: Hongos Entomopatógenos: Control de Calidad. Manzanillo, Colima, México. Noviembre 2006. 10-24 pp.

Faria, H. R., Wraight, S. P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Contro*. 43: 237-256.

Fassatiová, O. 1986. Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. *Progress in Industrial Microbiology*. 22: 64 - 85.

Flores, A. G., Rosa, W. de la, Rojas, J. C., Castro-Ramírez, A. E. 2002. Evaluation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (mitosporic) against species of the "white grub complex" in the south of Mexico. *Southwestern entomologist*. 27: 73-83.

Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* 201: 1203–1209.

Frolova, G. M., Sil'chenko, A. S., Pivkin, M. V., Mikhailov, V. V. 2002. Amylases of the Fungus *Aspergillus flavipes* Associated with *Fucus evanescens*. 38:134-138.

Garza-López, P. M., Loera, O. Comparación de Métodos de Conservación de cepas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (MONILIALES: MONILIACEAE). XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima, México. Noviembre 2006.

Gindin, G., Levski, S., Soroker, V. 2006. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Entomology*. 34: 370-379.

Goettel, M. S., Inglis, D. G. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: LA Lacey ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. California, USA, Academic Press, INC. 213-249.

Goto, C. E., Barbosa, E. P., Kistner, L. C. L., Moreira, F. G., Lenartovicz, V., Peralta, R. M. 1998. Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing K-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate. *FEMS Microbiology Letters*. 167: 139-143.

Glare, T. R., 2004. Biotechnological Potential of entomopathogenic Fungi. En: *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food and Enviromental Applications*. D. K. Arora. Marcel Dekker Inc. New York, USA. Capítulo 7. 79-90.

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

Greathead, D. J. and J. K. Waage. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11. 44 p.

Guimaraes, L. H. S., Peixoto-Nogueira, S. C., Michelin, M., Rizzati, A. C. S., Sandrim, V. C., Zanoelo, F. F., Aquino, A. C. M. M., Junior, A. B., Polizeli, M. L. T. M. 2006. Screening of Filamentous Fungi for Production of Enzymes of Biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 474-480.

Hajek, A. E., St. Leger, R. J. 1994. Interactions between fungal pathogen and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.

Harvey, L. M., McNeil, B. 1993. Liquid fermentation systems and product recovery of *Aspergillus*. En: *Biotechnology Handbooks*. J. E. Smith. Plenum Press. New York, USA.

Hegedus, D. D., Bidochka M. J., Khachatourians, G. G. 1990. *Beauveria bassiana* submerged conidia production in a defined medium containing chitin, two hexosamines or glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 33: 641 - 647.

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

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

Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M. 1999a. Control Microbial de Mosca Pinta *Aeneolamia* spp. con *Metahizium anisopliae*. Ficha Técnica CB-08. SAGARPA.

Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M. 1999b. *Paecilomyces* spp. enemigo natural de mosquitos blancos. Ficha Técnica CB-06. SAGARPA.

Hernández-Velázquez, V. M., Berlanga-Padilla, A. M. 1999c. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. Ficha Técnica CB-03. SAGARPA.

Ho, C. S., Smith, M. D. 1986. Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: mycelial growth and penicillin production. *Biotechnology and bioengineering*, 28: 668-677.

Huang, B., Chun-Ru, L., Zhen-Gang, L., Mei-Zhen, F., Zeng-Zhi, L. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. *Mycotaxon*. 81: 229-236.

Ikasari, L., Mitchell, D. A. 1998. Mimicking gas and temperature changes during enzyme production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 20: 349-353.

Issaly, N., Chauveau, H., Aglevor, F., Fargues, J., Durand, A. 2005. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*. 40: 1425-1431.

Jeffs, L. B., Khachatourians, G. G. 1997. Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal Microbiology*. 43: 23-28.

Jeffs, L. B., Xavier I. J., Matai R. E., Khachatourians, G. G. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Lecanicillium*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 936-948.

Joshi, L., St Leger, R. J., Bidochka, M. J. 1995. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* 125: 211-218.

Juge, N., Svensson, B., Williamson, G. 1998. Secretion, purification, and characterisation of barley α -amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 385-392.

Kang, S. W., Lee, S. H., Yoon, C. S., Kim, S. W. 2005. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 27: 135-139.

Khachatourians, G. G. Qazi, S. S. 2008. Entomopathogenic Fungi. *Biochemistry and Molecular Biology*. En: The Mycota VI. A. A. Brakhage, P. F. Zipfel. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Capítulo 3. 33-61

Levonen-Muñoz, E., Bone, D. H. 1985. Effect of different gas environments on bench-scale solid state fermentation of oat straw by white-rot fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, 27: 382-387.

Liu, B. L., Tzeng, Y. M. 1999. Water content and water activity for the production cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. *Biotechnology Letters*. 21: 657-661.

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

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

McIntyre, M., McNeil, B. 1997. Effects of Elevated Dissolved CO₂ Levels on Batch and Continuous Cultures of *Aspergillus niger* A60: an Evaluation of Experimental Methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4171-4177.

- Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilar, B. A., Aguilar, G., Viniegra-Gonzalez, G. 1997. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 21: 25-31.
- Miller, G. L., Blum, B., Glennon, W. E., Burton, A. L. 1960. Measurement of Carboxymethylcellulase Activity. *Analytical Biochemistry*. 2: 127-132.
- Montesinos-Matías, R. 2008. Relación entre Variables de Crecimiento y Virulencia en asilados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Montiel-González, A. M., Viniegra-González, G., Fernández, F. J., Loera, O. 2004. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 39: 2085-2090.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63: 95-103.
- Neves, P. J., Alves, S. B. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 43: 373-378.
- Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, A., Loera, O. 2008. Effect moisture content and inoculum level over growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Enviado.
- ONI, Olimpiadas Nacionales de Contenido Educativo en Internet. <http://www.oni.escuelas.edu.ar>. 24 de septiembre de 2008.
- Ooijkaas, L. P., Weber, F. J., Buitelaar, R. M., Tramper, J., Rinzema, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid state fermentation production systems. *Trends Biotechnology*. 18: 356-360.
- Pandey, A. 2003. Solid-state Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 81-84.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-Bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 35: 1153-1169.
- Pucheta-Díaz, M., Flores-Macias, A., Rodríguez-Navarro, S., De la Torre, M. 2006. Mecanismos de acción de los Hongos Entomopatógenos. *INCI* vol. 31 No. 12.

Rehner, S. 2005. Phylogenetics of the Insect Pathogenic Genus *Beauveria*. In: F. E. Vega and M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations, Ecology and Evolution*. Oxford Univ. Press. 3-27 pp.

Riquelme, M., Reynaga Peña, C. G., Bartnicki-García, S., Gires, G. 1998. What determines Growth Direction in Fungal Hyphae? *Fungal Gen. Biol.* 24: 101-109.

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

Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. Caracterización enzimática de una cepa silvestres de *Beauveria bassiana* y su mutante en cultivo sólido. Memorias: XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Los Mochis, Sinaloa. México. 2004.

Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. Caracterización fisiológica de aislamientos de *Beauveria bassiana* en cultivo sólidos, en medio sólido y en medio superficial. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia, Michoacán. México. Junio 2007.

Rodríguez-Gómez, D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. Estimation of μ for *Beauveria bassiana* on agar plates and its correlation with complex solid cultures. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Guanajuato. México. 2005.

Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., Viniegra-Gonzalez, G. 2008. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s11274-008-9917-x.

Romero-Machado, J. M. 1996. Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.

Romero-Gómez, S., Augur, C., Viniegra-González, G., 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 22: 1255-1258.

Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., Pell, J. K. 2006. Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Annual Review of Entomology*. 51: 331-357.

Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A., Rasoulia, G. R., Bandani, A. R., Butt, T. M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. FEMS Microbiology Letters. 270: 116-123.

Saucedo-Castañeda, G.; Gutiérrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M. y Viniegra-González, G. 1990. Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 35: 802-808.

Shah, F. A., Allen, N., Wright, C. J., Butt, T. M. 2007. Repeated invitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters. 276: 60-66.

Shah, F. A., Wang, C. S., Butt, T. M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters. 251: 259-266.

Sheeba, G., Seshadri, S., Raja, N., Janarthanan, S., Ignacimuthu, S. 2001. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Applied Entomology and Zoology. 36: 117-120.

Smith, M. D., Ho, C. S. 1985. The effect of dissolved carbon dioxide on penicillin production: Mycelial morphology. Journal of Biotechnology. 2: 347-363.

Soccol, C. R., Ayala, L. A., Soccol, V. T., Krueger, N., Santos, H. R. 1997. Spore production by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* from declassified potato by solid-state fermentation. Review of Microbiology. 28: 34-42.

St Leger R. 1995. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. Canadian Journal of Botany. 73 (Supp. 1): S1119-11125.

St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M.J., Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of National Academy of Sciences. Vol. 93: 6349-6354.

Steinhaus, E. A. 1949. Insect Pathology: An Advanced Treatise. Vol. 2. New York. McGraw Hill.

Strasser, H., Vey, A., Butt, T. M. 2000. Are There any Risks in Using Entomopathogenic Fungi for Pest Control, with Particular Reference to the Bioactive Metabolites of *Metarhizium*, *Toxopneustium* and *Beauveria* species? Biocontrol Science and Technology. 10: 717-735.

Summy, K. R. and J. V. French. 1988. Biological control of agricultural pests: concepts every producer should understand. J. Rio Grande Valley Hort. Soc. 41: 119-133.

-
- Sun, J., Fuxa, J. R., Henderson, G. 2002. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*. 81: 78-85.
- Tamayo-Mejía, F. Control Biológico de los Chapulines y en el Sureste del estado de Guanajuato. Taller: Hongos Entomopatógenos: Control de Calidad. Manzanillo, Colima, México. Noviembre 2006. 105-110 pp.
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M., Mozaffari, J. 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*. 16: 525-534.
- Tamez-Guerra, P., Galán-Wong, M. J., Medrano-Roldán, H., García-Gutiérrez, C., Rodríguez-Padilla, C., Gómez-Flores, R. A., Tamez-Guerra, R. S. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, comercialización y uso en México. *Ciencia UANL*. 4: 143-152.
- Tanada, Y., Kaya, H. K. 1993. *Insect Pathology*. Chapter 10. Fungal Infections. 318-387 pp.
- Tefera, T., Pringue, K. L. 2003. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 84:90-95.
- Tlecuítl-Beristain, S. 2008. Producción de esporas de *Metarhizium anisopliae* var. *Flavoviride* en condiciones de estrés oxidativo. Tesis de Doctorado en proceso. UAM-Iztapalapa.
- Thomas, K. C., Khachatourians, G. G., Ingledew, W. M. 1987. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 12 - 20.
- Van des Boshch, R., Messenger, P. S., Gutierrez, A. P. 1982. *An introduction to biological control*. New York: Plenum Press.
- Villa-Caballero, L., Nava-Ocampo, A. A., Frati-Munari, A. C., Ponce-Monter, H. 2000. El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético? *Gaceta Médica Mexicana*. 136: 249-255.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S., Díaz-Godínez, G., Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13:157-167.
- Wessel, J. G. H. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genetic Biol*. 27: 134-145.

11. ANEXOS

11.1. Curva Estándar para la determinación de Proteína Soluble por el Método de Bradford.

Para la construcción de la curva estándar se preparó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) a una concentración de 200 µg/mL. Se agregaron 100 µL de la solución de BSA y 700 µL de agua destilada en tubos de ensayo de 10 mL. Posteriormente se hicieron diluciones 1:1 v/v con agua destilada. Finalmente se agregó a cada tubo 200 µL del reactivo de Bradford (Sigma™) y después de transcurridos 5 minutos se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro Beckman™ DU-640 a 595 nm (Bradford, 1976). Cada dilución se realizó por triplicado.

Las concentraciones finales de proteína y en promedio de absorbancia fueron las siguientes:

Proteína (µg/mL)	Absorbancia Promedio
0.00	0.00
0.63	0.04
1.25	0.05
5.00	0.11
10.00	0.17
20.00	0.25

Se realizó el ajuste con la ecuación de la línea recta para obtener los parámetros correspondientes. La ecuación de la recta se describe a continuación.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia

m = Pendiente de la Recta

x = Concentración de Proteína

b = Ordenada al Origen

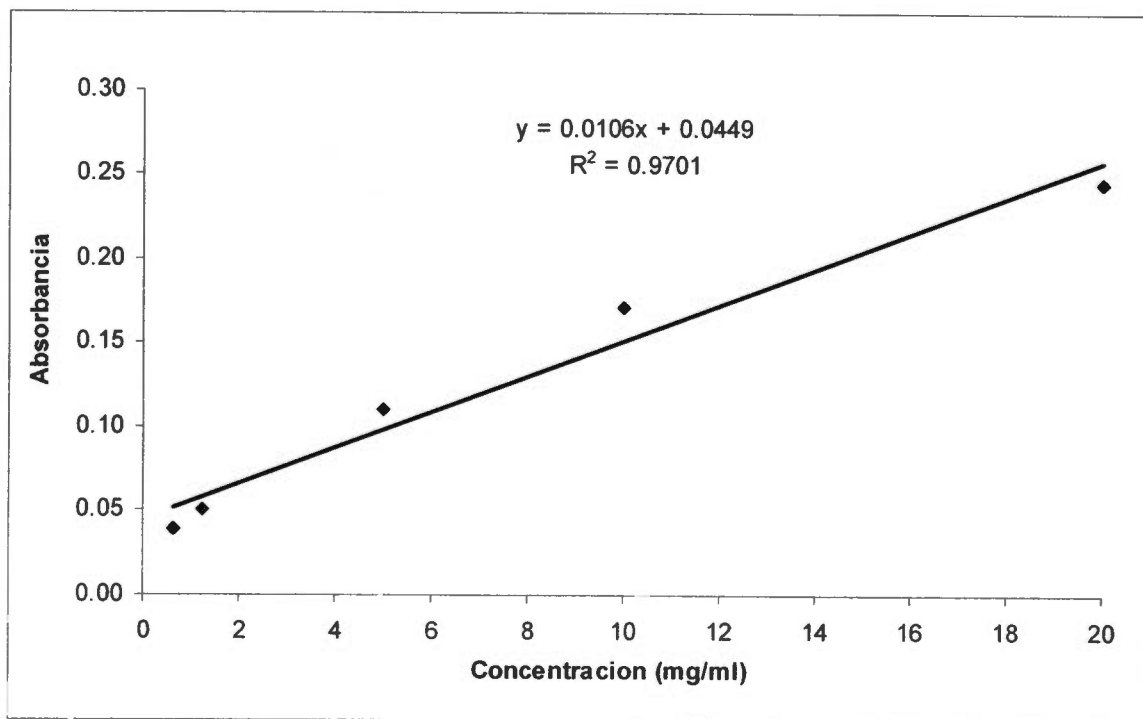


Figura 11.1. Curva estándar de BSA para la medición de proteína soluble por el método de Bradford.

11.2. Curva Estándar para la determinación de Actividad Amilasa por el Método de DNS.

Para la construcción de la curva estándar se preparó una solución de glucosa a una concentración de 2 mg/mL. Se tomaron 2 mL de la solución de glucosa y se depositaron en tubos de ensayo de 10 mL, se agregó 1 mL de buffer de fosfatos (0.1M, pH 6.1). Posteriormente se hicieron diluciones 1:1 v/v con el mismo buffer. Cada dilución se realizó por triplicado. Se agregaron a todos los tubos 1.5 mL del reactivo DNS y se dejaron incubar en baño María durante 30 minutos a 40°C. Pasado ese tiempo los tubos se pusieron a ebullición durante 5 minutos. Finalmente los tubos se enfriaron en agua con hielo hasta temperatura ambiente y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro Beckman™ DU-640 a 640 nm (Miller *et al.*, 1960)

A continuación se muestran las concentraciones finales de glucosa en cada tubo y los promedios de absorbancia correspondiente a cada concentración.

Glucosa (mg/mL)	Absorbancia Promedio
0.00	0.00
0.06	0.04
0.13	0.10
0.25	0.24
0.50	0.51
1.00	1.00

Se realizó el ajuste con la ecuación de la línea recta para obtener los parámetros correspondientes. La ecuación de la recta se describe a continuación

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia

m = Pendiente de la Recta

x = Concentración de Proteína

b = Ordenada al Origen

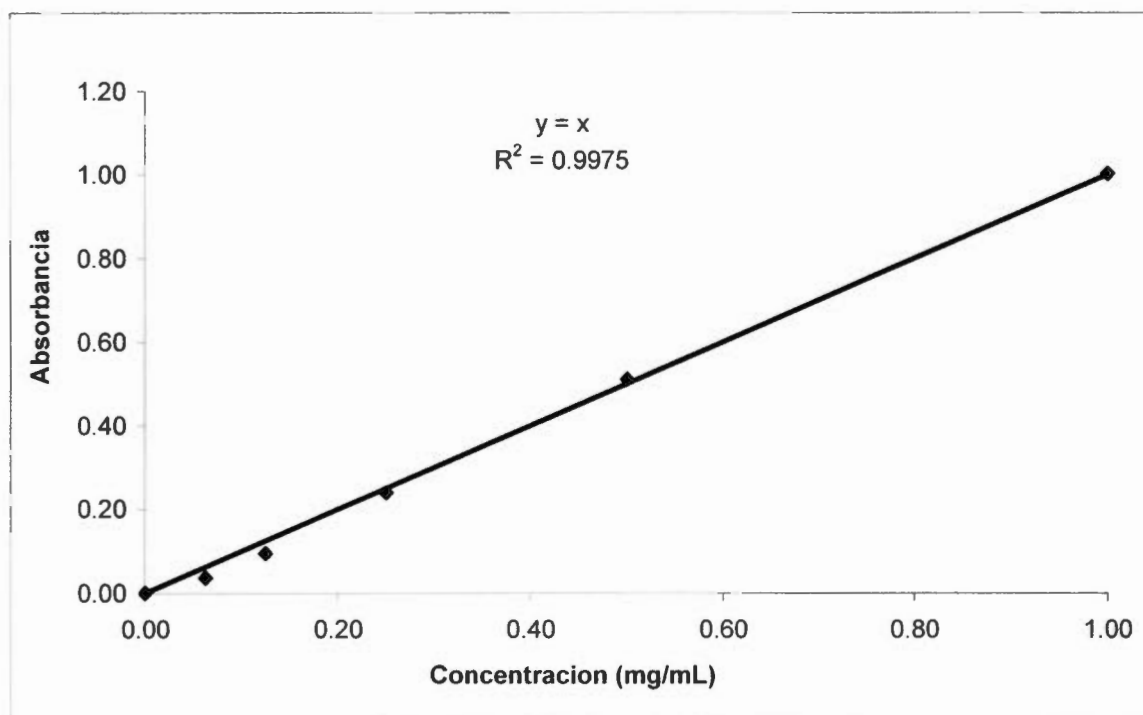


Figura 11.2. Curva estándar de glucosa para la medición de actividad amilasa por el método de DNS.