

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA Y LA MODIFICACIÓN DE
LA ATMÓSFERA GASEOSA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD
DE CONIDIOS DE *Beauveria bassiana*”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

M. en B. Oscar Nuñez Gaona

Director
Dr. Octavio Loera Corral

Asesores:
Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda
Dra. Raquel Alatorre Rosas

México D. F. 31 de julio de 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con el apoyo del mismo con el número de registro **0472-O.**”

AGRADECIMIENTOS

"Conocer, aprender, discernir, reducen la ignorancia dándonos la oportunidad de crecer"
Héctor Gómez.

A la inteligencia creadora, por hacerme conciente.

A mi familia, por darme el espacio y libertad para ser. De manera especial a mi hermana, cuñado y sobrinas por brindarme momentos de calma y reflexión.

Al Doctor Octavio por la dirección durante este trabajo.

A los Doctores Raquel Alatorre, Gerardo Saucedo, Sergio Huerta y Esteban Barranco, por el tiempo invertido en la revisión del documento y sus invaluable comentarios.

A Laura, con mucho amor y admiración quien es una parte importante en mi vida sin la cual sería un hombre incompleto. También extendiendo mi solidaridad y admiración para con su familia, que sin su apoyo muchas cosas no hubieran sido posibles.

A mis entrañables hermanos "Veteranos", Héctor, Fabiola y Raúl, por enseñarme el valor de la experiencia y la importancia de la coherencia.

A mis otros hermanos, Karina, Karla, Max, Enrique, Jonathan, Manuel, Jorge, Luís Carlos, Efraín, por compartir conmigo esos momentos que son física y mentalmente extenuantes, pero que conllevan la infinita gratificación de poder marcar la diferencia cuando las cosas se ponen mal.

A Luís, Gerardo, Rogelio, Balam y Citlali, con quienes comparto el espíritu del esfuerzo y superación constantes.

A mis compañeros de la planta piloto, que a pesar de la distancia, están dispuestos a apoyarme, de manera especial a Tere, por su ayuda con algunos cálculos.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir parte de su vida conmigo.

A esos seres tan poco valorados, los que están y los que me han dejado, por enseñarme la importancia de las cosas sencillas.

"Estamos aquí para hablarle de frente al destino y desafiar a la fortuna" Carlos Fuentes

"With great sacrifices come great rewards" Tito Ortiz

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	I
ÍNDICE GENERAL	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1 Definición de control biológico	3
2.2. Ventajas y desventajas del método	7
2.3. Hongos como agentes de control biológico	9
2.4. <i>Beauveria bassiana</i>	10
2.5. Mecanismo de infección	13
2.6. Hongos como bioinsecticidas	17
2.7. Virulencia	21
2.8. Factores ambientales.....	25
2.8.1. Luz solar.....	25
2.8.2. Temperatura.....	27
2.8.3. Humedad.....	29
2.8.4. Actividad de agua (a_w).....	30
2.8.5. Lluvia.....	31
2.9. Métodos de conservación	32
2.10. Producción de conidios	34
2.11. Fermentación en medio sólido (FMS).....	34
2.11.1. Definición	34
2.11.2. Ventajas y desventajas	35
2.11.3. Factores ambientales.....	36
2.11.4. Actividad de agua (a_w).....	37
2.11.5. Substratos y Nutrientes.....	38
2.11.6. Inóculo.....	40
2.11.7. pH.....	40

ÍNDICE GENERAL

2.11.8. Temperatura.....	41
2.11.9. Aireación y composición de la atmósfera.....	41
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	45
4. JUSTIFICACION.....	47
5. HIPÓTESIS.....	49
6. OBJETIVOS.....	50
7. MATERIALES Y MÉTODOS	51
7.1. Microorganismo	51
7.2. Actividad de agua (a_w).....	51
7.3. Método de conservación	51
7.4. Cultivo en placa	53
7.4.1. Medio de cultivo a diferentes valores de a_w	53
7.4.2. Tiempo de inóculo.....	54
7.4.3. Tiempo de incubación	54
7.4.4. Temperatura.....	54
7.4.5. Medio con rastrojo de maíz.....	55
7.5. Fermentación en medio sólido (FMS).....	55
7.5.1. Mezcla de sustratos	55
7.5.2. Atmósfera normal.....	56
7.5.3. Viabilidad.....	56
7.5.4. Concentración de inóculo.....	57
7.5.5. Hidrofobicidad	57
7.5.6. Atmósfera modificada	58
7.5.7. Extracción de conidios	58
7.5.8. pH.....	58
7.5.9. Bioensayos.....	59
7.5.10. Análisis estadístico.....	60
8. RESULTADOS Y DISCUSION	61
8.1. Efecto de la concentración de etilenglicol sobre la actividad de agua (a_w) de los medios de cultivo	61
8.2. Método de conservación	62
8.3. Cultivo en placa	64

8.3.1.	Efecto de la composición del medio de cultivo y la actividad de agua (a_w) sobre el crecimiento y esporulación.....	64
8.3.2.	Efecto del tiempo de inóculo y a_w sobre el crecimiento y esporulación.....	69
8.3.3.	Efecto del tiempo de incubación y a_w sobre el crecimiento y esporulación de <i>Beauveria bassiana</i>	72
8.3.4.	Efecto de la presencia de sales inorgánicas en el medio de cultivo y la a_w sobre el crecimiento y conidiación de <i>B. bassiana</i>	74
8.3.5.	Efecto de la temperatura y la a_w sobre el crecimiento y conidiación de <i>Beauveria bassiana</i>	77
8.4.	Fermentación en medio sólido (FMS).....	82
8.4.1.	Humedad.....	82
8.4.2.	Mezclas de sustratos	84
8.4.3.	Efecto de la concentración de inóculo	86
8.4.4.	Modelo	87
8.5.	Atmósfera modificada	90
8.5.1.	Cinética de crecimiento atmósfera normal.....	92
8.5.2.	Cinética de crecimiento atmósfera modificada	93
8.6.	Bioensayos	99
9.	CONCLUSIONES	103
10.	RECOMENDACIONES.....	104
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	105
ANEXO	113
	Trabajos presentados	113
	Publicaciones.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Micoinsecticidas comerciales (adaptado de Charnley y Collins, 2007).....	19
Tabla 2.2. Vida media estimada de esporas de especies de hongos entomopatógenos expuestos a luz solar simulada y natural (adaptado de Ignoffo, 1992).....	26
Tabla 2.3. Sistemas de conservación para hongos entomopatógenos modificado de Khachatourians, (1991) (a= años, m= meses).....	33
Tabla 8.1. Ecuaciones y coeficiente de correlación para el efecto de la concentración de etilenglicol sobre la a_w con diferentes medios. X = concentración de etilenglicol.	62
Tabla 8.2. Producción total de conidios (conidios/placa) en los valores extremos de actividad de agua con los medios evaluados.	68
Tabla 8.4. Rendimientos reales (conidios/g Salvado).....	86
Tabla 8.5. Validación del modelo exponencial.....	87
Tabla 8.6. Valores de la velocidad específica de producción de conidios (k) para diferentes niveles de inóculo.....	89
Tabla 8.7. Rendimientos de hongos empleados en el control biológico, con diferentes substratos.	93
Tabla 8.8. Velocidad específica de producción de conidios (k) para distintas mezclas gaseosas.	97
Tabla 8.9. Resumen de parámetros para el bioensayo con larvas de <i>Tenebrio molitor</i> tratadas con conidios de <i>Beauveria bassiana</i> cultivados en una atmosfera normal.	100
Tabla 8.10. Hidrofobicidad relativa (%) y viabilidad (%) para los conidios de <i>Beauveria bassiana</i> obtenidos por FMS con distintas atmosferas. La desviación estándar se muestra entre paréntesis. Distintas letras difieren significativamente ($\alpha = 0.05$).....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 8.1.** Efecto de la concentración de Etilenglicol sobre la actividad de agua Sabouraud Dextrosa al 4% (\diamond), Papa Dextrosa Agar (\square), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (Δ), Quitina coloidal al 1% (X). ----- 61
- Figura 8.2.** Efecto del método de conservación sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana*, (\square), conservación a 4 °C (\blacksquare), conservación en Sílica gel.----- 63
- Figura 8.3.** Efecto del método de conservación sobre la densidad de conidios de *Beauveria bassiana*, (\square), conservación a 4 °C (\blacksquare), conservación en Sílica gel. ----- 64
- Figura 8.4.** Efecto de la actividad de agua sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana*, en los medios Sabouraud Dextrosa al 4% (\diamond), Papa Dextrosa Agar (\square), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (Δ), Quitina coloidal al 1% (X).----- 66
- Figura 8.5.** Grafica de residuos para la v_r de los diferentes medios evaluados. ----- 66
- Figura 8.6.** Efecto de la actividad de agua sobre la producción de conidios de *B. bassiana*, en función de la actividad de agua, con los medios Sabouraud Dextrosa al 4% (\diamond), Papa Dextrosa Agar (\square), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (Δ), Quitina coloidal al 1% (X). ----- 67
- Figura 8.7.** Densidad de conidios de *Beauveria bassiana* en función de la actividad de agua, Medios: Sabouraud Dextrosa al 4% (\diamond), Papa Dextrosa Agar (\square), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (Δ), Quitina coloidal al 1% (X).----- 69
- Figura 8.8.** Efecto de la actividad de agua y la antigüedad del inóculo sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana* (\square) 10 días, (\square) 20 días, (\blacksquare) 30 días. ----- 70
- Figura 8.9.** Efecto de la antigüedad del inóculo y la a_w sobre la densidad de conidios de *Beauveria bassiana* en un medio sintético (Alves y col., 2002), (\square) 10 días, (\square) 20 días, (\blacksquare) 30 días. ----- 71
- Figura 8.10.** Efecto de la actividad de agua y el tiempo de incubación sobre la productividad de *Beauveria bassiana*, en un medio definido (Alves y col., 2002), (\square) 16 días, (\blacksquare) 30 días.----- 73
- Figura 8.11.** Efecto del tiempo de incubación y la actividad de agua sobre la densidad de esporas de *Beauveria bassiana*, en un medio definido (Alves y col., 2002), (\square) 16 días, (\blacksquare) 30 días. ----- 74

Figura 8.12. Efecto las sales del medio y la actividad de agua sobre la velocidad radial de <i>Beauveria bassiana</i> medio con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (■). -----	75
Figura 8.13. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> en un medio con salvado de trigo y sales inorgánicas en los valores extremos de a_w . -----	76
Figura 8.14. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> en un medio con salvado de trigo sin sales inorgánicas en los valores extremos de a_w .-----	76
Figura 8.15. Efecto de la composición del medio y la actividad de agua sobre la densidad de conidios medio, con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (■). -----	77
Figura 8.16. Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i> en un medio con rastrojo de maíz como fuente de carbono y sales inorgánicas en los valores extremos de a_w . -----	78
Figura 8.17. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la velocidad radial de <i>Beauveria bassiana</i> incubada a 28 °C, medio con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (□), medio con rastrojo de maíz al 1% (▣). -----	79
Figura 8.18. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la densidad de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> incubada a 28° C. medio con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (□), medio con rastrojo de maíz al 1% (▣). -----	80
Figura 8.19. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la velocidad radial de <i>Beauveria bassiana</i> incubada a 30° C. Medio con salvado de trigo al 1% y sales inorgánicas (■) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales inorgánicas (□). -	81
Figura 8.20. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la densidad de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> incubada a 30° C. medio con salvado de trigo al 1% y sales inorgánicas (■) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales inorgánicas (□).-----	82
Figura 8.21. Efecto del contenido de humedad del soporte sobre el rendimiento de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> en fermentación en medio sólido. Las medias con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha= 0.05$) entre ellas. -----	84
Figura 8.22. Efecto del bagazo de caña como texturizante sobre el rendimiento de conidios de <i>Beauveria bassiana</i> en fermentación en medio sólido. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha= 0.05$) . -----	85

Figura 8.23. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* en función del inóculo, ajustado a un modelo exponencial. (\diamond): 1×10^6 conidios/gssi, (\square): 7×10^6 conidios/gssi, (Δ): 5×10^7 conidios/gssi. Líneas discontinuas: ajuste del modelo exponencial. ----- 88

Figura 8.24. Evolución del pH durante la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido. (\diamond): 1×10^6 conidios/gssi, (\square): 7×10^6 conidios/gssi, (Δ): 5×10^7 conidios/gssi.----- 90

Figura 8.25. Comparación del crecimiento de *Beauveria bassiana* después de 10 días de fermentación con una mezcla gaseosa O_2/CO_2 26/0 %.----- 95

Figura 8.26. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido con atmósfera modificada O_2/CO_2 (%), (\diamond): 21/0, (\square): 26/0, (Δ): 21/5, (X): 16/5
Líneas discontinuas: ajuste del modelo exponencial. ----- 96

Figura 8.27. Comparación del crecimiento de *Beauveria bassiana* entre el tratamiento y el testigo después de 10 días de fermentación con una mezcla gaseosa O_2/CO_2 16/5 %.
----- 97

Figura 8.28. Evolución del pH durante la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido con atmósfera modificada O_2/CO_2 (%), (\diamond): 21/0, (\square): 26/0, (Δ): 21/5, (X): 16/5. ----- 99

Figura 8.29. Curva de mortalidad para larvas de *Tenebrio molitor* tratadas con conidios de *Beauveria bassiana* cultivados en FMS bajo una atmósfera normal. ----- 100

RESUMEN

El control biológico se define como la reducción de las poblaciones de plagas mediante el uso de enemigos naturales. Esta forma de control ha cobrado un renovado interés a nivel mundial en las últimas dos décadas por razones económicas, ambientales y de salud pública. Uno de los hongos entomopatógenos que mayor desarrollo ha tenido es *Beauveria bassiana*, el cual tiene el potencial para controlar alrededor de 70 plagas de insectos. Dependiendo de las condiciones de cultivo son los tipos de unidades infectivas (conidios) que produce. La metodología empleada para la producción masiva de los hongos entomopatógenos afecta significativamente su actividad bioinsecticida, los métodos más comúnmente empleados para la producción masiva son la fermentación en medio sólido, y un sistema de cultivo en dos fases.

Para la evaluación de la composición del medio de cultivo, en caja Petri se emplearon 4 medios, Sabouraud Dextrosa al 4 %, PDA, Medio Sintético y un medio con Quitina coloidal al 1%. Los máximos valores de V_r fueron, 79, 76, 79, 75 $\mu\text{m/h}$, respectivamente, con valores de a_w cercanos a 1. La máxima producción de conidios se obtuvo con el medio Sabouraud dextrosa al 4 % (3.6×10^9 conidios/caja) y una $a_w = 0.994$, disminuyendo en función de la a_w , y observándose diferencias de hasta un orden de magnitud entre los valores máximos y mínimos de a_w . La máxima densidad de conidios (6.9×10^8 conidios/ cm^2), se obtuvo con los medios con quitina coloidal al 1 % y una $a_w = 0.973$. La composición del medio de cultivo tuvo un efecto determinante sobre la velocidad de extensión radial y la producción de conidios, obteniéndose los máximos valores de estos parámetros en los medios complejos. Macroscópicamente, en los medios complejos se observó un crecimiento mayor con valores elevados de a_w , así como, colonias más definidas con micelio mas compacto.

El máximo rendimiento de conidios 1.15×10^{10} conidios/gssi, en fermentación en medio sólido se obtuvo con un contenido de humedad de 66 % y $a_w = 1$, disminuyendo progresivamente en función del incremento del contenido de humedad del soporte. Con la mezcla de sustratos (salvado de trigo y bagazo de caña) el máximo rendimiento se obtuvo en los medios que únicamente contenía salvado de trigo, los rendimientos reales (conidios/ g Salvado) no se modificaron sustancialmente, no observándose diferencias

significativas entre ellos. Cuando, se evaluaron distintos niveles de inóculo (1×10^6 , 7×10^6 , 5×10^7 conidios/gssi), se observaron rendimientos similares, independientemente del inóculo. La viabilidad en el punto donde se alcanzaron concentraciones de 1×10^{10} conidios/gssi, fue de 77.5 (+/- 4.9) 61 (+/- 8.4) y 54 (+/- 1) % respectivamente. Independientemente del nivel de inóculo los rendimientos obtenidos fueron del orden de 1×10^{10} conidios/gssi, variando únicamente el tiempo de producción, por lo que se propuso este tiempo t_{10} como un parámetro de evaluación de las fermentaciones. También se observó que los mejores valores de viabilidad se obtuvieron con los inóculos menores.

Los rendimientos de conidios mostraron comportamientos distintos en las atmósferas evaluadas 21/0, 26/0, 21/5, 16/5 %, por un lado con la mezcla O_2/CO_2 (26/0 %) se obtuvieron rendimientos similares (1×10^{10} conidios/gssi) a los obtenidos con una atmósfera normal (21/0 %). Pero, cuando se incrementó el CO_2 en las mezclas y el O_2 , (21/5, 16/5 %) el rendimiento de conidios, permaneció prácticamente constante después de la modificación. El máximo rendimiento de conidios para la mezcla 21/5 % fue de 1.4×10^9 conidios/gssi, representó una disminución de prácticamente un orden de magnitud en comparación con el obtenido en una atmósfera normal y con la mezcla 26/0 % (1×10^{10} conidios/gssi), para el caso de la mezcla de 16/5 % el máximo obtenido fue de 5.8×10^8 conidios/gssi y represento una reducción de aproximadamente dos ordenes de magnitud en comparación con la atmósfera normal. Macroscópicamente se observó en las mezclas con CO_2 una disminución en la cantidad de micelio en función del tiempo, desapareciendo prácticamente hacia el final de la fermentación, lo que fue mas acentuado para la mezcla 16/5 %. La viabilidad se vió afectada por el incremento de CO_2 en la atmósfera, los valores obtenidos en los puntos de mayor producción fueron de 73, 58, 44, y 39 % para las mezclas O_2/CO_2 (%) 21/0, 26/0, 21/5 y 16/5, respectivamente.

Los bioensayos con larvas de *Tenebrio molitor*, en atmósfera normal, mostraron una mortalidad máxima de 52 %, con un tiempo letal 50 (TL_{50}) de 16.9 d. La modificación de la atmósfera tuvo un efecto negativo, sobre la virulencia de *B. bassiana*, puesto que para el resto de los tratamientos, los valores obtenidos fueron del orden del 20 % o menores. Los valores de viabilidad e hidrofobicidad se redujeron con la modificación de la atmosfera.

Las principales conclusiones que se desprenden de este trabajo son:

- *Beauveria bassiana* mostró una sensibilidad hacia la composición de los medios de cultivo y la actividad de agua en caja de Petri, obteniéndose las mejores velocidades de extensión radial, rendimientos de conidios y crecimiento en los medios con fuentes de nitrógeno complejas y con valores de actividad de agua elevados (cerca de 1).
- Los máximos rendimientos de conidios (1×10^{10} conidios/gssi) se obtuvieron en fermentaciones con una atmósfera normal, con salvado de trigo como sustrato con un contenido de humedad de 66%, una $a_w = 1$ y un inóculo de 1×10^6 conidios /gssi y un tiempo de 10 días, el uso de bagazo de caña como texturizante no tuvo efecto en los rendimientos de conidios por gramo de salvado de trigo. Sin embargo, el rendimiento sí disminuyó con respecto al peso de sustrato inicial (salvado de trigo más bagazo de caña).
- El incremento en la concentración de CO_2 en la mezcla gaseosa tuvo un efecto adverso sobre el crecimiento, rendimientos y viabilidad de los conidios. A diferencia de otros reportes, no se encontró relación entre la hidrofobicidad relativa de los conidios y su virulencia.

ABSTRACT

Biological control is defined as the reduction of pest populations using natural enemies, *Beauveria bassiana* is widely distributed in nature, has a potential to control nearly of 70 pests of insects, this feature has increased the interest for industrial production, in fact in many places of the world there are commercial formulations based on *Beauveria bassiana*. Produces a different kind of conidia, depending on culture conditions. The method used for conidia production affects bioinsecticide activity of fungus, and the main production methods are solid state fermentation, which is defined as microorganism grown on moistened solid substrates with enough water to allow metabolisms, with no water leakage and with air as continue phase. Other culture method is a biphasic system, in which inoculum is produced in liquid media, followed by a solid production medium, in both production systems the desirable product are conidia.

Composition effect was evaluated using four media: Sabouraud Dextrose Agar 4 %, Potato Dextrose Agar, Defined medium and Colloid Chitin 1 % medium. The higher V_r were 79, 76, 79, 75 $\mu\text{m}/\text{h}$ respectively, with $a_w = 1$. The maximum conidia production (3.6×10^9 conidia/plate) was reached with Sabouraud Dextrose Agar 4 % at $a_w = 0.994$. Conidia production decreased as a function of a_w , in fact differences of one magnitude order were observed between a_w extremes. Maximum conidia density was 6.9×10^8 conidia/cm² reached with colloidal chitin and $a_w = 0.973$. The medium competition effect was showed over V_r and conidia production, the best results were obtained with complex media.

In solid state fermentation maximal yield was 1.15×10^{10} conidia/gdss, this value was obtained with a moisture content of 66 % ($a_w = 1$), however, yield reduced as moisture content increased. In addition, the use of substrates mixes (wheat bran and sugar cane baggase) higher yields were obtained with media containing only wheat bran, in fact the presence of sugar cane as a texturizer reduced in conidial yields, however real yields (conidia per gram of wheat bran) did not show any statistical difference in all mixtures.

When different levels of inocula (1×10^6 , 7×10^6 , 5×10^7 conidia/gdss) were tested, similar yields were observed (1×10^{10} conidia/gdss), but time at which this yield was reached (t_{10})

was reduced as inoculum increases; t_{10} was proposed as fermentations quality parameter. Viability values in at times with the highest yield (1×10^{10} conidia/gdss) were 77.5, 61 and 54% for inocula of 1×10^6 , 7×10^6 , 5×10^7 conidia/dss, respectively. A inoculum size of 1×10^6 conidia/dss was selected for further experiments.

Gaseous atmosphere was modified after 72 h once mycelia was visible, in oxygen riched atmosphere O_2/CO_2 (26/0 %) yield of 1×10^{10} conidia/gdss was obtained, this yield was similar to that reached in normal atmosphere O_2/CO_2 (21/0 %). Nonetheless, using atmospheres with O_2/CO_2 ratios of 21/5 % and 16/5 %, yields were substantially reduced: 1.4×10^9 and 5.8×10^8 conidia/gdss, respectively. CO_2 mixtures showed mycelia disruption at the end of cultures, this was more evident in a atmosphere of O_2/CO_2 : 16/5 %. Conidial viability was affected when atmosphere was modified, values were 73, 58, 44 and 39 % in O_2/CO_2 (%) mixtures of 21/0, 26/0, 21/5 and 16/5, respectively.

Finally, bioassays were performed using *Tenebrio molitor* larvae. Maximum mortality (52%) was reached with conidia obtained in a normal atmosphere (O_2/CO_2 ,: 21/0) with a 50 lethal time (TL_{50}) of 16.9 d. Atmosphere modification caused a negative effect on *Beauveria bassiana* virulence, since mortality was equal or less to 20 % in the rest of treatments, Viability and hidrofobicity showed as well a reduction with atmosphere modification.

The main conclusions were:

1. *Beauveria bassiana* is very sensitive to culture media composition and water activity. Better radial extension rates, conidia yields and growth were obtained with complex nitrogen sources and water activity values closer to 1.
2. As a recommendation for production systems, the highest solid state fermentation conidia yields (1×10^{10} cnidias/gdss) were reached with normal atmosphere, wheat bran as a substrate, moisture contents of 66 % ($a_w = 1$), a inoculum zise of 1×10^6 conidia/gdss, with an inoculum age of 10 days. Sugar cane bagaze as texturizer did not show effect over conidia yields.
3. Accumulation of CO_2 in culture of *Beauveria bassiana* should be regarded as a detrimental factor. In this work the presence of CO_2 in gaseous atmosphere was a

ABSTRACT

negative effect on fungal growth, yields and conidia viability. A clear relationship between conidia relative hydrophobicity and virulence was not found.

1. INTRODUCCIÓN

El control químico de insectos, comenzó a ganar interés con la introducción de los plaguicidas orgánicos en la década de 1940. Los cuales ofrecen un buen método de control. Sin embargo, su efecto sobre organismos no blanco y el surgimiento de resistencia hacia ellos, ha provocado el desarrollo de bioplaguicidas así como la implementación del manejo integrado de plagas. (Mierzejewski y col., 2007). El control biológico, es el uso de organismos vivos, para reducir la densidad poblacional de un organismo plaga específico, menos abundante dañino de lo que podría ser, para lo cual se emplean organismos vivos (Eilenberg, 2006).

Los hongos fueron los microorganismos más usados en los primeros trabajos de control biológico (Lord, 2005; De Faria y Wraight, 2007). Esto debido a que producen enfermedades visibles en los insectos y son fácilmente cultivables. (Lord, 2005). Debido a la sencillez técnica en la producción, su intervalo de huéspedes, su capacidad de desencadenar epizootias, su temperatura óptima y otros criterios ecológicos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. (Ascomycota: Cordycipitaceae) y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Ascomycota: Clavicipitaceae) son las dos especies más frecuentemente empleadas en la producción de agentes de biocontrol (Grimm, 2001). La producción masiva y el proceso de formulación de los hongos entomopatógenos influyen directamente sobre el costo, la vida de anaquel, virulencia y eficiencia en el campo (Fravel, 2005; Kassa y col., 2008), porque cuando el micelio está unido a los microgranulos donde se cultivó y esporuló, como en el caso de la fermentación en medio sólido, tiene una buena eficiencia en el campo (Desgranges y col., 1993). En la calidad del producto final se analizan la cantidad de unidades infectivas, la viabilidad, virulencia y pureza. De todos los aspectos que deben considerarse para la calidad de un plaguicida biológico, el bioensayo es el más importante, que es la forma segura de validar la calidad de un producto. (Fernández-Larrea 2002).

En la fermentación en medio sólido, el estado energético del agua, es uno de los factores más importantes de las condiciones de cultivo, tiene un efecto determinante sobre las células vivas, siendo un factor clave en este proceso (Grajek y Gervais, 1987). Por otro lado, las presiones parciales elevadas de oxígeno pueden ser tóxicas, debido a la

inhibición de enzimas esenciales, producción de radicales y compuestos reactivos, como peróxido de hidrógeno, súper óxido y radicales hidroxilo o por cambiar el balance redox dentro de la célula y subsecuentemente perturbar las reacciones de biosíntesis (Hand y Mudgett, 1992). Sin embargo, hay estudios que sugieren que la acumulación de estos compuestos reactivos, es lo que desencadena la diferenciación celular (Hansberg y col., 1993). También el CO₂ influye profundamente sobre el crecimiento y la diferenciación de los hongos patógenos, que incluyen *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. Las concentraciones elevadas de este gas promueven la biosíntesis y filamentación que son los principales factores de virulencia para *Candida albicans* y *Candida neoformans*. Los niveles de CO₂ de 5% indujeron filamentación de 208 aislados de *C. albicans* (Bahn y Mühlischlegel 2006).

En este trabajo se describen los efectos de la actividad de agua y la modificación de la atmósfera gaseosa, sobre la producción, viabilidad y virulencia de los conidios de *Beauveria bassiana* obtenidos por fermentación en medio sólido sobre salvado de trigo. En el siguiente capítulo se presenta la revisión de la literatura científica, se dan la definición, características, e importancia del control biológico, con hongos como agentes de control, poniendo énfasis *Beauveria bassiana*. También, se revisan las características y factores que afectan a la fermentación en medio sólido vista como el mejor método para la producción de conidios por este hongo. Dentro de los parámetros evaluados se le da relevancia a la composición de la atmósfera gaseosa. Posteriormente se enumeran los antecedentes directos, justificación, hipótesis, materiales y métodos, en este capítulo se propone un modelo exponencial para el ajuste de las cinéticas de producción. En resultados y discusiones se presentan los resultados del trabajo comparándolos con los existentes en la literatura, proponiendo el tiempo al cual se alcanza la concentración de 1×10^{10} conidios/gss (t_{10}) como parámetro de calidad en las fermentaciones, evaluando también el efecto de la modificación de la atmósfera sobre la calidad de los conidios mediante la realización de bioensayos. El trabajo se cierra con las secciones de conclusiones y recomendaciones, en esta última se dan una serie de sugerencias sobre los probables rumbos que pudieran tomar las investigaciones futuras que pudieran complementar este trabajo.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los insecticidas químicos son dañinos para los organismos que no son blancos, muchos de los cuales tienen papeles determinantes en el control de las poblaciones de los insectos plaga. Otro problema asociado con la aplicación en grandes cantidades de éstos, incluye la acumulación de residuos tóxicos en los alimentos que subsecuentemente afectan la salud humana (Edwards y Gatehouse, 2007) y la contaminación ambiental causada por el uso excesivo de estos insecticidas (Cavalcante y col., 2008). La hipótesis de que una dependencia excesiva en los insecticidas químicos no es sustentable, se fundamenta además por el descubrimiento de que muchas plagas de insectos desarrollan resistencia hacia esos compuestos (Edwards y Gatehouse, 2007). Lo anterior incrementa el interés en el manejo integrado de plagas, donde los plaguicidas químicos son substituidos por bioplaguicidas para el control de plagas y enfermedades de plantas (Chi y col., 2005; Cavalcante y col., 2008). Por lo que es imperativo desarrollar estrategias sustentables y amigables con el ambiente (Ji y col., 2008; Sahebani, y Hadavi 2008; St. Leger, 2007).

2.1 Definición de control biológico

El control biológico es un componente de una estrategia de manejo integral de plagas (MIP); se define como la reducción de las poblaciones de plagas mediante el uso de enemigos naturales, y típicamente involucra una participación activa por parte del ser humano. Los enemigos naturales de las plagas de insectos, también conocidos como agentes de control biológico, incluyen depredadores, parasitoides y patógenos (Xiao y Tang, 2008). A continuación se en listan las características de cada clase (Barrera, 2007):

- 1) Depredadores. Son individuos que consumen varios organismos durante su vida, y activamente buscan su alimento. Al organismo que un depredador consume se le denomina presa y por lo general es más pequeña que éste. Algunos consumen un rango amplio de especies presa (polífagos), otros un rango más estrecho (oligófagos) y otros más son altamente específicos (monófagos). Desde el punto de vista del control biológico, los depredadores oligófagos y monófagos son mejores como agentes de control. La mayoría de los depredadores consumen el

mismo tipo de presa como inmaduros o como adultos. Las mantis, arañas y muchas especies de catarinitas (Coccinellidae) son ejemplos de depredadores.

- 2) Parasitoides. Generalmente se les incluye en la categoría de parásitos, pero un parasitoide es una clase especial de depredador que generalmente es del mismo tamaño que el organismo que ataca, también se caracterizan porque se desarrollan dentro o sobre un organismo, el cual casi siempre muere al ser atacado. El estado larvario del parasitoide es parasítico, mientras que los adultos son de vida libre y activos para buscar a los organismos que parasitan (huéspedes). Cada parasitoide consume un sólo huésped. A diferencia de los parásitos verdaderos, los parasitoides matan a su huésped. Las avispidas parasíticas son buenos ejemplos de parasitoides.

- 3) Patógenos. Son microorganismos parasíticos que frecuentemente matan a su huésped. Los cadáveres de los huéspedes liberan millones de microbios individuales, que son dispersados por el viento y la lluvia. Debido a su tamaño diminuto y a su rápida reproducción en el huésped, los patógenos son más fáciles de producir masivamente que los parasitoides y pueden ser liberados contra las plagas con los equipos desarrollados para la aplicación de plaguicidas químicos. La utilización de patógenos para el manejo de las poblaciones de las plagas se llama “control microbiano” y es considerado como una subdivisión del control biológico.

Los Patógenos, incluyen virus, bacterias, riketsias, hongos, protozoarios y nemátodos (Kaya y Lacey, 2007; Barrera 2007), son comúnmente aislados de los insectos y otros huéspedes invertebrados. Su presencia natural en poblaciones de invertebrados contribuye a la regulación de plagas dañinas para los humanos, sus cultivos, casa y animales domésticos. Estos entomopatógenos tienen el potencial para ser incluidos en programas de control biológico (microbiológico), y muchos de ellos han sido empleados para el control de plagas de insectos mediante liberaciones inoculativas, inundativas y de incremento (aumentativas) (Kaya y Lacey, 2007). A continuación se definen los diferentes tipos de control biológico (Barrera, 2007):

- I. Control biológico por conservación. El primer paso en control biológico consiste en conservar (promover la actividad, supervivencia y reproducción) a los enemigos naturales nativos (o ya presentes en un cultivo), a fin de incrementar su impacto sobre las plagas. La conservación de los entomófagos va dirigida preferentemente contra plagas endémicas; no obstante, también incluye el mejoramiento de las posibilidades de establecimiento de especies introducidas para el control biológico de plagas exóticas o incrementar la eficiencia de especies criadas masivamente en laboratorio. Para lograr mejores resultados, se requiere conocer cuáles especies están presentes, qué plagas atacan y cuáles lo hacen mejor y bajo qué condiciones; en función de esta información, se pueden escoger las formas más apropiadas de protegerlos y ayudarlos. Esta estrategia es la que más se presta a las condiciones de los países latinoamericanos, ya que la mayoría de las plagas son endémicas, forma parte de las prácticas agroecológicas y su aplicación suele ser más barata.

- II. Control biológico por introducción. Si no hay enemigos naturales que efectivamente controlen a la plaga, entonces se puede considerar la introducción y establecimiento permanente de nuevas especies. Esta forma de control, también llamada control biológico clásico, es usada más frecuentemente en el control de plagas exóticas, las cuales comúnmente llegan a un área nueva sin factores naturales de control. Cuando se usa en el control de plagas nativas que carecen de enemigos naturales efectivos se le denomina “control biológico neoclásico” o control biológico clásico de nueva asociación. En los casos exitosos, esta forma de control biológico puede reducir a la plaga a niveles por debajo de los umbrales económicos de manera indefinida.

- III. Control biológico por incremento. Cuando los enemigos naturales son biológicamente efectivos, pero fallan en controlar a las plagas no obstante los esfuerzos de conservación o introducción, se puede recurrir al incremento o aumento de su población a través de cría masiva y liberación inoculativa (el agente de control biológico se multiplica y controla a la plaga por un tiempo determinado) o inundativa (el control es realizado exclusivamente por los individuos liberados).

Debido a que esta forma de control biológico puede ser más cara que las otras, sólo se deberá recurrir a ella si las otras formas de control biológico son ineficientes. Para que esta estrategia sea usada por los productores es necesario que sea competitiva en términos económicos con el control químico.

Sin embargo, muchas introducciones de patógenos han resultado en su establecimiento pero no necesariamente en el control de la plaga. En algunos casos, las introducciones fortuitas o accidentales, han resultado en un excelente control biológico de alguna plaga. Aparte de las infecciones naturales y su introducción como agentes de control biológico clásico, los entomopatógenos han sido comúnmente usados como agentes inundativos para la supresión de plagas (Kaya y Lacey, 2007). Un número de ellos han sido registrados y/o están comercialmente disponibles (Kaya y Lacey, 2007; St. Leger, 2007).

Se ha propuesto al control biológico, como una alternativa para los insecticidas agroquímicos, esto debido a factores como, la cancelación de registro de insecticidas químicos, el surgimiento de plaguicidas de reducido espectro, la posibilidad de desarrollar resistencia por parte del huésped, el rechazo del público hacia los insecticidas químicos y la expansión de la agricultura orgánica (Warner y ges, 2008). Además el control biológico reduce el uso de insecticidas químicos (Knudsen y col., 1991) y tiene el beneficio extra de tener pocos efectos dañinos sobre la salud de los humanos (Cullen y col., 2008). También puede contribuir a la rentabilidad de las granjas de varias formas, que incluyen, el incremento en los rendimientos (por la reducción del daño causado por las plagas); disminución de costos (sin pérdidas en el rendimiento, por la reducción en el uso de insecticidas químicos) y mejorando el acceso al mercado (o manteniéndolo), por la reducción de los niveles de residuos en alimentos y por lo que estos cumplen con los requerimientos del mercado. Asimismo, los consumidores pueden estar dispuestos a pagar un costo extra por los productos obtenidos empleando este método (Cullen y col., 2008).

Los agentes de control biológico (control microbiano, ACM) son producidos por grandes y pequeñas compañías comerciales. Algunos como los baculovirus y *Paenibacillus popilliae* son patógenos obligados y son producidos *in vivo*, mientras que otros como hongos,

nematodos entomopatógenos y *Bacillus thuringiensis* pueden ser producidos *in vitro*. Estos ACM son formulados y vendidos para la supresión de plagas (Kaya y Lacey, 2007).

2.2. Ventajas y desventajas del método

La comparación de los (ACM) con los insecticidas químicos convencionales usualmente es solo desde la perspectiva de su eficiencia y costo. Sin embargo, estos tienen los siguientes beneficios ambientales (Kaya y Lacey, 2007):

1. Seguros para los humanos y otros organismos no blanco; sin embargo, recientemente *Beauveria bassiana* (Henke y col., 2002) y la bacteria *Photorhabdus asymbiotica* asociadas con *Heterorhabditis sp* han sido implicadas en enfermedades humanas (Gerrard y col., 2006)
2. Reducción de los residuos de plaguicidas en ambientes acuáticos y terrestres.
3. Incremento de la actividad de muchos otros enemigos naturales.
4. Incremento de la biodiversidad en ecosistemas acuáticos.
5. Especificidad hacia el organismo blanco, o hacia un número limitado de especies de huéspedes.
6. Poco o nulo desarrollo de resistencia por parte del huésped (sin embargo, algunos insectos blanco han desarrollado resistencia hacia *Bt*, *Bacillus sphaericus* y baculovirus).
7. No permiten un segundo brote de la plaga.
8. Compatibilidad con otros agentes de control biológico.
9. Posibilidad de control a largo plazo.
10. Facilidad en la aplicación.
11. No tienen intervalos de precosecha.
12. Adaptables a modificaciones genéticas mediante la biotecnología.

Algunas ventajas de los ACM se convierten también en desventajas. Por ejemplo, la especificidad del huésped es una espada de doble filo. Si más de una especie de plaga ocurre en el ecosistema, se requieren medidas de control adicional. Sus desventajas en comparación con los insecticidas químicos incluyen (Kaya y Lacey, 2007):

1. Especificidad solo hacia el organismo blanco.
2. Periodo largo para desarrollar la infección letal (poco o nulo efecto “knock-down”).

3. Tiempo estricto de aplicación para maximizar el efecto.
4. Inactivación por factores ambientales (luz ultravioleta, desecación, temperaturas extremas etc.) y por consiguiente poca persistencia.
5. Dificultad para producir a los patógenos obligados, y/o formularlos.
6. Vida de anaquel corta.
7. Desarrollo de resistencia por parte del organismo huésped, especialmente hacia *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus*.
8. No económicos excepto para los mercados nicho.
9. Riesgos de no ser aceptados por los consumidores, quienes los asocian con los organismos genéticamente modificados.

El uso de ACM en el MIP, requiere conocimiento del ecosistema, ya que es muy improbable que cualquier preparación de hongos entomopatógenos pueda ser empleada exitosamente bajo todas las condiciones ambientales presentes en el campo. Consecuentemente se deben entender estas condiciones, como ventanas de oportunidades para identificar el uso efectivo de estas preparaciones (Wraight y col., 2007). Los factores abióticos, temperatura, humedad, lluvia, viento, luz solar, suelo, sustrato y pH afectan la susceptibilidad del huésped y la persistencia, transmisión, dispersión, desarrollo y producción del patógeno. Los factores bióticos, la población y tipo del huésped, planta, predadores, parásitos, huéspedes alternos, pequeños mamíferos, rumiantes, pájaros, y otros microorganismos, pueden afectar el ciclo de vida, la dispersión, transmisión y persistencia de los entomopatógenos. Una manera de atenuar esto es mediante el uso de aditivos. Los más comúnmente usados son los protectores de luz UV. Otras sustancias se han adicionado para neutralizar el follaje o para retardar la evaporación. Otro método consiste en aplicar patógenos entre el crepúsculo y el amanecer para evitar la luz solar (Fuxa, 1987; Wraight y col., 2007).

El tipo de ecosistema afecta el uso de entomopatógenos en el MIP, en hábitats relativamente estables, como bosques y pastizales, el método inoculativo de baja frecuencia, y ocasionalmente el inundativo, y la manipulación ambiental han sido efectivos. En ecosistemas inestables, particularmente, los cultivos agrícolas, parece ser que solo los patógenos de daño rápido son capaces de competir con los insecticidas cuando se aplican en incrementos inundativos (Fuxa, 1987).

Existe la duda si los entomopatógenos son dependientes de la densidad del huésped. Una gran densidad de huéspedes permite el incremento en el contacto entre infectados, sanos, y unidades patogénicas. Esto también puede estresar a los insectos, predisponiéndolos a la enfermedad, lo que ocasiona que estén más disponibles para la infección. Si la tasa de transmisión es baja, un patógeno obligado requiere una densidad elevada del huésped. Si un patógeno tiene una velocidad de transmisión elevada, puede persistir con bajas densidades del huésped. Una persistencia larga es esencial durante periodos en los cuales no hay huéspedes, por ejemplo durante el invierno en un clima templado (Fuxa, 1987).

Los cambios en el comportamiento del insecto después de la infección incluyen: cambios en los hábitats o capacidad de vuelo, alimentación durante el día más que por la noche, dificultad para hacer una madriguera profunda en el suelo, imposibilidad de regresar al nido, reclusión en la basura y movimiento inusual hacia partes elevadas de la planta (Fuxa, 1987). También, es sabido que la ecdisis (muda de piel de los artrópodos) puede remover conidios de su superficie afectando profundamente el proceso de infección y disminuyendo la susceptibilidad al patógeno. De esta forma, cualquier incremento en la duración de un estadio de un insecto inoculado, pudiera contribuir a incrementar la susceptibilidad hacia el patógeno (Furlong y Groden, 2003).

2.3. Hongos como agentes de control biológico

El mayor esfuerzo en la investigación de biocontrol de insectos se ha realizado con virus y bacterias, a pesar de que los hongos son el grupo más grande de patógenos de insectos (Dorta y col., 1996). Los hongos son organismos eucariontes, heterótrofos absorbitos, que desarrollan de preferencia un cuerpo tubular ramificado y difuso (hifas) y se reproducen mediante esporas sexuales o asexuales. Se conoce ahora que los organismos que cumplen con esta descripción general son filogenéticamente distintos, y son comúnmente clasificados en dos reinos, el Straminipila (Stramenopila o Straminopila, Chromista) y el Eumicota (Wraight y col., 2007).

Existen alrededor de 100,000 especies de hongos de las cuales se han reconocido cerca de 750 agrupadas en 90 géneros como patógenas para los insectos. Los hongos

entomopatógenos (Bielikova y col., 2002) son aquellos que causan la muerte prematura del insecto huésped (Glare y Milner, 1991). Muchos tienen un intervalo amplio de huéspedes, infectan diferentes edades y estadios de ellos, (Fuxa, 1987; Wraight y col., 2007); sin embargo, el espectro de huéspedes varía mucho dependiendo de la especie fúngica. Por ejemplo, *Entomophaga grylli* infecta únicamente saltamontes, *Aschersonia aleyrodís* infecta solo moscas blancas, y *Nomuraea rileyi* infecta al menos exclusivamente lepidópteros. En contraste, especies como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, y *Zoophthora radicans* tienen rangos de huéspedes más amplios, que comprende numerosos órdenes dentro de los artrópodos (Wraight y col., 2007). Cuentan con un gran potencial para el control de insectos (Ying y Feng 2004), especialmente dentro de programas MIP. Sus rangos de huéspedes, permiten el control de plagas con un daño limitado hacia organismos no blanco, incluyendo depredadores, parásitos y otros patógenos, también, son compatibles con algunos fungicidas y otro tipo de plaguicidas (Wraight y col., 2007) y están ampliamente distribuidos a través del reino Fungi (Clarkson y col., 1996; Wraight y col., 2007).

Los hongos, son potencialmente los entomopatógenos más versátiles. Algunos producen toxinas, lo que acelera el daño, pero por lo general, son patógenos lentos. Para fines prácticos, se pueden dividir en dos categorías, sobretodo con base a la velocidad de acción: patógenos de acción rápida y de acción lenta. Los primeros incluyen aquellos que producen toxinas, y a unos pocos que matan directa o indirectamente (por ejemplo facilitando una septicemia bacteriana), cuando entran en el huésped, estos patógenos ocasionan que el insecto deje de alimentarse en 24 horas, aun cuando la muerte se produzca varios días después. Los patógenos lentos debilitan al huésped mucho después de 24 horas por realizar al menos una porción de su ciclo de vida a expensas del huésped (Fuxa, 1987).

2.4. *Beauveria bassiana*

Es un hongo entomopatógeno que está distribuido ampliamente en la naturaleza (Talaie-Hassanloui y col., 2006; Ownley y col., 2008), es el estado anamórfico de *Cordyceps bassiana*, un telomorfo en los ascomicetos familia *Clavicipitaceae*. Los miembros de esta familia se encuentran en hábitats ecológicos diversos, incluyendo entomopatógenos,

fitopatógenos, micoparásitos y hongos endofíticos de gramíneas. Esta familia de hongos también es conocida por la producción de metabolitos secundarios con propiedades tóxicas (Ownley y col., 2008). Tiene potencial para controlar alrededor de 70 plagas de insectos (Alves y col., 2002, Holder y Kyhani, 2005), pero, si se consideran a los insectos facultativos, el número se incrementa a cerca de 200 especies sensibles (Khachatourians, 1991), esto incrementa considerablemente el interés para su producción a nivel industrial, para aplicaciones en los campos de cultivo (Arcas y col., 1999). Las cepas de este hongo se han empleado para el control de insectos y otros artrópodos, que actúan como vectores, incluyendo mosquitos y pulgas; plagas agrícolas como mosquita blanca, gusanos, saltamontes y barrenadores, incluso para plagas invasivas ecológicamente peligrosas como hormigas del fuego y termitas (Holder y Kyhani, 2005).

Las cepas de *B. bassiana* puede ser aisladas de insectos del suelo, donde forman parte de la flora microbiana normal, así como de otros substratos. La patogenicidad y virulencia para diferentes insectos así como sus características enzimáticas y genéticas, varían entre aislamientos (Alves y col., 2002). *B. bassiana* puede utilizar una gran variedad de substratos, sin embargo, la adición de carbohidratos en el medio de cultivo afecta la respuesta fisiológica, por consiguiente, la producción de biomasa, la síntesis de enzimas extracelulares, el rendimiento de blastosporas y el pH del medio dependen del tipo y cantidad de carbohidratos adicionados (Bidochka y col., 1990).

Este patógeno es importante en la regulación de las poblaciones de insectos plaga, por lo que se ha desarrollado como agente de control biológico, pudiendo encontrar preparaciones comerciales en varias partes del mundo para la protección de plantas y cultivos (Fuguest y Vey, 2004). Sin embargo, cuando este hongo se emplea solo, las aplicaciones al follaje o las formulaciones a partir de sus conidios tienen resultados variables ocasionando niveles de control inapreciables. Un manejo efectivo de las plagas a largo plazo, se consigue cuando se emplea como parte de una estrategia de control integrada (Furlong y Groden, 2003).

B. bassiana muestra polimorfismo vegetativo dependiendo de las condiciones de cultivo, en medio sólido o semi sólido produce conidios aéreos, en medios líquidos definidos produce conidios sumergidos, que son similares a los aéreos y en medios líquidos

complejos (caldo Dextrosa Peptona) produce cuerpos hifales llamados blastosporas (Bidochka y col., 1995; Holder y Kyhani, 2005). Los conidios aéreos son capaces de unirse a superficies hidrofóbicas, pero no a superficies hidrofílicas, mientras que las blastosporas se unen uniformemente a superficies hidrofílicas, pero débilmente a las hidrofóbicas formando pequeños agregados en estas últimas, mientras que los conidios sumergidos se unen igualmente bien a ambas superficies, formando grandes agregados mejor distribuidos a lo largo del tiempo (Holder y Kyhani, 2005).

Los conidios aéreos se dispersan fácilmente por las corrientes de aire, además por su pared celular son más resistentes a condiciones ambientales adversas, como la desecación y las temperaturas extremas; sin embargo, el microciclo de conidiación, y la formación de blastosporas pueden ocurrir bajo una variedad de condiciones ambientales, así como durante la interacción huésped patógeno. El microciclo de conidiación se define como una simplificación extrema del ciclo asexual y consiste en la diferenciación de un conidio germinativo, que da origen a uno o más conidios nuevos (llamados conidios secundarios o conidios hijos), que provienen de la punta de un tubo germinativo o de una célula de conidiogénesis simple (Boch y Yantorno, 1999). La producción de múltiples tipos celulares con diferentes propiedades adhesivas podría ocurrir como respuesta a condiciones ambientales específicas, permitiendo a las células fúngicas unirse a un intervalo amplio de huéspedes, proveyendo al hongo de una forma de adaptarse a las condiciones del substrato (Holder y Kyhani, 2005).

Una de las ventajas de usar este hongo para el control de plagas, es que las suspensiones de sus conidios se pueden aplicar con el equipo convencional de aspersión de insecticidas. La aplicación en las hojas usualmente resulta en que los conidios esparcidos pueden caer directamente sobre el insecto, o éste puede adquirirlos al comer y moverse sobre el follaje contaminado. Sin embargo, se desconoce qué tipo de contacto resulta en una mayor mortalidad. La distribución de los conidios en el insecto parece ser diferente dependiendo del modo de exposición, y según los sitios de adherencia de los conidios sobre la cutícula del insecto resultan en diferentes rutas de penetración e infección exitosas. Con una aplicación directa sobre la cutícula del insecto, los conidios germinan y atacan rápidamente. Si el insecto se expone a follaje contaminado existe un

potencial de infección; sin embargo, este proceso depende de la capacidad del hongo para sobrevivir después del contacto con el huésped (Fernández y col., 2001).

Algunos estudios han investigado la combinación de insecticidas y *B. bassiana* para el control de la larva de escarabajo colorado de la papa, pero han tenido un éxito limitado. Sin embargo, un trabajo reciente ha mostrado una interacción sinérgica marcada entre dosis subletales de las sustancias químicas clonicotinil imidacloprid y *Beauveria bassiana* sobre este insecto. La evidencia experimental sugiere que un tratamiento con dosis subletales de imidacloprid causa estrés por inanición en las larvas intoxicadas, lo cual ocurre en un tiempo crítico en el proceso de infección del huésped, facilitando enormemente el establecimiento del hongo sobre el huésped (Furlong y Groden, 2003).

2.5. Mecanismo de infección

La colonización de la cavidad interna del insecto, por el hongo patógeno es estrictamente dependiente de la capacidad de éste para sobrepasar los mecanismos de defensa del insecto. La inmunidad humoral de los insectos es más inducida en el caso de infecciones bacterianas, mientras que las infecciones fúngicas deben enfrentar reacciones celulares. Los propágulos débiles o no patogénicos, son fagocitados por los hemocitos. Sin embargo, la principal reacción en el mecanismo de defensa antifúngica es la encapsulación del hongo, el cual es melanizado inmediatamente cuando entra en la cavidad del insecto. Los granulocitos son atraídos por el hongo en cuestión de minutos, luego los plasmotocitos poco a poco, forman un pseudo tejido en capas concéntricas, diferenciando un granuloma que puede alcanzar un milímetro de diámetro, la lisis completa del hongo se observa en granulomas de 15 días de antigüedad, para entonces, el citoplasma del hongo ha sido degradado hasta una masa granular e inclusiones densas. Esta encapsulación provee al huésped protección solo contra patógenos ligeramente virulentos. En el caso de las cepas hipervirulentas, los huéspedes son incapaces de formar los granulomas típicos o el hongo sobrepasa la encapsulación y continúa creciendo. Se ha mostrado que en los filtrados de un aislamiento de *M. anisopliae* contenían sustancias inmunodepresivas, que inhibían la formación de granulomas en la cavidad interna del insecto, alterando los movimientos y flujos de los hematocitos (Ferron y col., 1991).

Los hongos entomopatógenos se deben adaptar a dos situaciones diferentes, primero, deben ser capaces de emplear diferentes tipos de sustratos orgánicos como fuente de energía y nutrientes durante su vida saprófita y además, ser capaces de establecer un vínculo y germinar sobre un huésped susceptible, usando los nutrientes presentes en la cutícula o los sustratos movilizados por la acción de las exoenzimas hidrolíticas en las primeras etapas de la infección (Braga y col., 1999). Comúnmente invaden a sus huéspedes a través de la cutícula externa, es por esto que los mecanismos de reconocimiento del huésped están ligados, al menos en parte, a la constitución química de la cutícula o al tipo de nutrientes disponibles sobre ella (Braga y col., 1999; Jarrold y col. 2007; Wraight y col., 2007; Vega y col., 2008), algunos son capaces de entrar por el canal alimentario (*Ascospaera* y *Culicinomyces*). Sin embargo, la epicutícula, la “delgada” capa externa de la cutícula (1–3 μm), de los insectos también contiene varias estructuras con lipoproteínas, grasas y capas cerosas (Khachatourians, 1991; Crespo y col., 2000; Jarrold y col., 2007). Algunos de estos materiales cerosos contienen un número de sustancias antifúngicas capaces de interferir y prevenir el crecimiento de los hongos entomopatógenos. Por ejemplo, el crecimiento de *B. bassiana* puede ser inhibido por varios ácidos grasos saturados de cadena corta extraídos de las larvas de *Heliothis zea*. Por otro lado, los lípidos y los esteroides fraccionados, diacil glicerol o lípidos polares extraídos de cultivos de cutícula de lepidóptero tienen un efecto estimulante sobre la germinación de *N. rileyi* (Khachatourians, 1991; Jarrold y col., 2007). La superficie dorsal de la cutícula puede producir grandes cantidades de cera cuticular para prevenir la desecación, en este sentido, el ácido oleico induce la germinación, también se sabe que los niveles elevados de ácido palmítico incrementan el crecimiento micelial, y los bajos niveles de ácido linoleico y ácido linolénico tienen efectos adversos sobre la germinación de las esporas y la proliferación del micelio. Los ácidos grasos libres de C:8 a C:20 son tóxicos para *B. bassiana* y *P. fumosoroseus* (Khachatourians, 1991).

La variedad de cutículas de los insectos representan la primera barrera para el patógeno, la unión de los propágulos fúngicos a la cutícula es el evento inicial para el establecimiento de la micosis. Esta unión involucra mecanismos específicos de receptor-ligando y/o mecanismos hidrofóbicos y electrostáticos no específicos (Fang y col., 2007). Sin embargo, el proceso responsable de la adhesión inicial del propágulo fúngico a la cutícula del huésped está entendido de manera limitada (Boucinas y col., 1988; Holder y

Kyhani, 2005). En la adhesión de los hongos entomopatógenos está involucrada una interacción inicial seguida de un paso de consolidación, resultando en una unión fuerte a la cutícula (Holder y Kyhani, 2005). De manera general, la adhesión ha sido implicada como un posible factor de virulencia para varios microorganismos patógenos que son importantes en las industrias de alimentos y farmacéutica (Wiencek y col., 1990), también la hidrofobicidad superficial está involucrada en la unión de esporas de hongos fitopatógenos a substratos hidrofóbicos naturales y artificiales. Por otro lado, la hidrofobicidad de los conidios del hongo micoparásito *Coniothyrium minutans* está involucrada en la adhesión no específica, que puede influir sobre la virulencia del hongo. Similarmente, las esporas aéreas y sumergidas de *Penicillium oxalicum* difieren en hidrofobicidad, viabilidad y eficacia contra *Fusarium oxysporum*, así como, en comparación con las esporas obtenidas en medios líquidos, las esporas aéreas de *Trichoderma harzianum* fueron más resistentes a las variaciones ambientales, fueron más hidrofóbicas y mostraron mayor viabilidad después del almacenamiento (Pascual y col., 2000).

Asimismo, algunos estudios del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* revelaron un proceso de adhesión en dos pasos; una adhesión inmediata que ocurre en la hidratación y que estuvo caracterizada por una unión relativamente débil y posteriormente una adhesión retardada más fuerte que se observó cuando los conidios germinaron. La adhesión inmediata fue pasiva (no metabólica), y aunque las estructuras específicas no fueron visibles sobre los conidios, la adhesión se caracterizó, en parte, como dependiente de interacciones hidrofóbicas. Las interacciones hidrofóbicas se han implicado también en la unión de los conidios de los hongos entomopatógenos *Nomurae rileyi*, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* tanto en huéspedes como en preparaciones con cutícula de los huéspedes (Holder y Kyhani, 2005).

Las esporas (el término es usado genéricamente para referirse a los diferentes tipos de unidades infectivas), se adhieren a la cutícula, germinan y penetran al huésped, por la formación de un tubo germinativo, el cual mediante acción enzimática y mecánica penetra la cutícula (Wraight y col., 2007; Vega y col., 2008). Los conidios germinan en respuesta a las señales químicas, pero crecen sobre la superficie hasta encontrar un sitio adecuado para la penetración. Sobre la superficie relativamente lisa dorsal del abdomen, el hongo

puede crecer más a lo largo de la cutícula hasta alcanzar un sitio adecuado para la penetración (Fernández y col., 2001). Cuando la infección ocurre de manera natural, las enzimas degradadoras de cutícula intervienen en las primeras etapas de la penetración del tegumento interno del huésped (Fuguest y Vey, 2004). La acción *in vivo* de estas enzimas (quitinolíticas, proteolíticas y lipolíticas), inicialmente está encaminada a la digestión de la cutícula del insecto, para facilitar la penetración fúngica. Los análisis químicos y de microscopía, indican que estas enzimas están involucradas en el ataque directo al tegumento interno del insecto. Primero, las enzimas se unen covalentemente a la quitina, seguido de un ataque proteolítico de la capa interior de la quitina y la degradación coordinada de la quitina por las quitinasas. Las proteínas y la quitina son transformadas en precursores monoméricos utilizables. Se ha comprobado que la interacción patógeno-insecto está mediada por procesos mecánicos y enzimáticos (Khachatourians, 1991).

La síntesis de proteasas extracelulares y exoquitinasas en *B. bassiana* responde a los requerimientos de carbono y nitrógeno de la célula. Si se le proveen a la célula ciertos aminoácidos la síntesis de exoquitinasas se reprime. Si se le proporciona N-acetil glucosamina (GlcNAc), se induce la producción de exoquitinasas y se reprime la de proteasas. Esto indica una posible interrelación entre estas dos enzimas claves para la degradación de la cutícula, particularmente por la composición proteica de la cutícula de los insectos, ya que en la cutícula de los insectos, las proteínas rodean a las fibras de quitina. Así las quitinasas pueden degradar las fibras de quitina solamente después de la acción de las proteasas. En estos procesos, la acción preliminar de las proteasas permite el crecimiento del hongo con aminoácidos que reprimen la síntesis de exoquitinasas. Subsecuentemente, las fibras de quitina del insecto quedan expuestas, y la GlcNAc se solubiliza por la acción de las exoquitinasas, en niveles basales y constitutivos; la GlcNAc inducirá la síntesis de exoquitinasas seguida por una posterior hidrólisis de la quitina y de la provisión de GlcNAc de la célula del hongo. Entre tanto, la síntesis de proteasas es reprimida antes de que los niveles de GlcNAc disminuyan (Khachatourians, 1991).

Después el hongo prolifera en la hemolinfa del huésped como células con pared de cuerpos hifales (algunas formas se denominan como blastosporas) o como protoplastos ameboides sin pared. La muerte de huésped resulta de una combinación de acciones,

que incluyen agotamiento de nutrientes, obstrucción física, o invasión de órganos y toxemia. Inmediatamente después de la muerte del huésped, y bajo condiciones favorables, las hifas emergen del cadáver y producen esporangios, la esporulación ocurre sobre la superficie del huésped, y las esporas se liberan (Boucinas y col., 1988; Khachatourians, 1991; Fuguest y Vey, 2004; Holder y Kyhani, 2005; Wraight y col., 2007; Vega y col., 2008).

2.6. Hongos como bioinsecticidas

Se han realizado varios intentos alrededor del mundo para emplear bioinsecticidas, producidos masivamente basados en hongos entomopatógenos. En Brasil, la producción masiva de *Metarhizium anisopliae* ha resultado en su uso intensivo ha sido oportuno para el control de la plaga de la caña de azúcar, *Mahanarva posticata*. En varios países de Europa del este, se recomienda el uso *B. bassiana* para el control de *Leptinotarsa decemlineata*. Cuba ha sido obligada a desarrollar biopesticidas, para reemplazar el uso de los insecticidas químicos debido a un embargo económico, especialmente con hongos entomopatógenos, para controlar diferentes plagas de insectos. En África los intentos internacionales para desarrollar prácticas de control más ecológicas resultaron en la formulación de un producto comercial “Green Muscle” basado en *M. flavoviride* para el control de varias especies de langosta del desierto, *Schistocerca gregaria* (Bustillo y col., 1999).

Sin embargo, la comercialización de hongos entomopatógenos ha estado restringida a aquellas especies que son compatibles con la producción masiva *in vitro* sobre substratos económicos. Consecuentemente, con la excepción de *Lagenidium giganteum* para el control de mosquitos, todos los productos comerciales desarrollados han sido basados en especies dentro de los *Hypocreales*. Los ejemplos incluyen *B. bassiana* para el control de una gran variedad de insectos, que incluyen orugas de pino y barrenadores de maíz en Asia, y trips, mosca blanca, afidos y palomilla dorso de diamante en Norte y Sudamérica. También, se ha producido *Beauveria brongniartii* para el control de escarabajos en Europa, así como *M. anisopliae* para el control del gusano baboso en Sudáfrica, el gorgojo de la vid en Europa, *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (inicialmente identificado como *Metarhizium flavoviride*) para el control de langostas y saltamontes en África y

Sudamérica, *Nomuraea rileyi* para el control de plagas de lepidópteros en Sudamérica, *Paecilomyces fumosoroseus* para el control de mosca blanca en Europa y Norteamérica y *Lecanicillium spp* para el control de áfidos y mosca blanca en Europa y Sudamérica (Wraight y col., 2007). En México las empresas productoras de hongos entomopatógenos se encuentran principalmente en el norte del país, Química internacional aplicada, S.A. de C.V. (Sinaloa), Certis de México, S.A. de C.V. (Nuevo León), Agrobiológicos del noroeste, S.A. de C.V. (Sinaloa) y Biotropic, S.A. de C.V. (Jalisco).

Estos hongos son factores clave en la regulación de las poblaciones de insectos plaga. A diferencia de las bacterias y virus que tienen que ser ingeridos para causar la enfermedad, infectan a los insectos por penetración directa de la cutícula. Es por ello que proveen una forma práctica de control de insectos que se alimentan succionando jugos de plantas o animales, así como para muchas plagas de coleópteros que no se les conocen enfermedades bacterianas o virales (Fuxa, 1987; St. Leger, 2007). Esto ha ocasionado el resurgimiento en el interés por su uso para el control de plagas de insectos, lo que ha permitido la producción masiva de varios hongos y la comercialización de micoinsecticidas (Arcas y col., 1999; Dorta y col., 1996), pudiéndose emplear como componentes de una estrategia de MIP de forma inundativa. El objetivo de esto es maximizar la muerte desde la primera aplicación, de la misma forma como un insecticida químico. Esta estrategia se desarrolló con la comprensión de que con la formulación apropiada, la infección puede ocurrir a partir de una aplicación inicial independientemente de la humedad, pero la humedad elevada se requiere para la producción de esporas y es la que limita la propagación de la infección (Tefera y Pringle 2003; St. Leger, 2007). Sin embargo, la lenta velocidad de muerte y los resultados inconsistentes de los biológicos en general, comparados con los químicos, han restringido su desarrollo. Por ejemplo, *M. anisopliae sf. acridum* ("Green Muscle"), usualmente toma 10 días para matar langostas, lo cual ha restringido una comercialización exitosa, aun cuando provea de manera consistente un control > 80% de langostas. Consecuentemente cualquier consideración de la conveniencia de un patógeno para desarrollo comercial inevitablemente, conlleva a la posibilidad de mejorar su desempeño (St. Leger, 2007).

Un gran numero de productos exitosos basados en conidios de hongos entomopatógenos han sido desarrollados, producidos y vendidos comercialmente por compañías como,

Koppert, Mycotech, Natural Plant Protection, Agricultura and EcoScience (Jenkins y col., 1998). En la Tabla 2.1 se en listan los micoinsecticidas más importantes y su país de origen.

Tabla 2.1. Micoinsecticidas comerciales (adaptado de Charnley y Collins, 2007).

País	Nombre del producto	Ingrediente activo
Austria	Melocont Pilzgerste	<i>Beauveria brongniartii</i>
Australia	BioCane BioGreen Green Guard	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i>
Bélgica	PreFeRal WG	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
Bolivia	Probiomet Probiovert Probiobass	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Beauveria bassiana</i>
Brasil	Metarhizium PM Bovril Metarril wp Vertirril WP	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i>
China	Kiloca Tianli	<i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i> <i>Beauveria bassiana</i>
Colombia	Bassianil Metabiol Vertilec Bassiana Cebiopest Anisafer Vercani	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Beauveria brongniartii</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i>
Cuba	Bibisav	<i>Beauveria bassiana</i>

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Guatemala	Met-92 Teraboveria ZeroQK	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>
India	Bio-catch Bio-magic Priority Multiplex Baba Multiplex Mycomite Multiplex Metarhizium Melikil Pacer Racer Biovert Rich Pacihit Rich Bioguard Rich Biomet Rich	<i>Verticillium lecanii</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Verticillium lecanii</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Verticillium sp</i> <i>Paecilomyces sp</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>
Indonesia	Bevaria Biometeor NirAma	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>
Italia	Beavaria brog	<i>Beauveria brongniartii</i>
Japon	Biolisa Kamikiri	<i>Beauveria brongniartii</i>
México	Bea-Sin Meta-Sin	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>
Países Bajos	Mycotal Vertalec	<i>Lecanicillium muscarium</i> <i>Lecanicillium longisporum</i>
Nueva Zelanda	Vertikil Vertiblast Beaugenic	<i>Lecanicillium muscarium</i> <i>Lecanicillium longisporum</i> <i>Beauveria bassiana</i>
Sudafrica	Bb Plus Bb Weevil Green Muscle	<i>Beauveria bassiana</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Metarhizium anisopliae</i> var <i>acridum</i>

Suiza	Engerlingspliz	<i>Beauveria brongniartii</i>
Estados Unidos	BotaniGard ES	<i>Beauveria bassiana</i>
	BotaniGard 22WP	<i>Beauveria bassiana</i>
	Mycotrol	<i>Beauveria bassiana</i>
	Naturalis L	<i>Beauveria bassiana</i>
	Naturalis HG	<i>Beauveria bassiana</i>
Venezuela	Meta-Ven	<i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Beauveria bassiana</i>
	Bassi	<i>Beauveria bassiana</i> y <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>

2.7. Virulencia

La virulencia se ha definido como el grado de patogenicidad de un grupo o especie, sin embargo, en el caso de los hongos entomopatógenos, es imposible dar una definición general de virulencia o patogenicidad, pero se puede hablar acerca de infectividad que conlleva a la muerte del insecto huésped, lo cual usualmente resulta de la penetración del tubo germinal a través de la cutícula externa, esófago o traquea de un insecto. Usualmente la medición de la virulencia para un hongo entomopatógeno se expresa en términos de dosis letal media (DL₅₀). Sin embargo, no hay un acuerdo sobre un estándar único que defina los valores de este término obtenidos en diferentes estudios (Khachatourians, 1991). Por otro lado, es posible que las cepas induzcan una respuesta diferente en el sistema inmune del huésped, lo que además se ve reflejado en las concentraciones necesarias de esporas y el tiempo en el que finalmente cada cepa mata al 50% de los individuos, DL₅₀, y TL₅₀, respectivamente (Clarkson y col., 1996).

La virulencia de los entomopatógenos se ha relacionado con una rápida germinación, elevada velocidad de crecimiento y actividades quitinolíticas altas (Feng y col., 2002; Khachatourians, 1991), la capacidad de adherencia de las esporas a la cutícula, la capacidad de secreción de enzimas hidrolíticas, que determina la penetración al insecto, y las cantidades mínimas de propágulos para diezmar a la población de insectos, así como la velocidad con la que matan (Clarkson y col., 1996).

Las velocidades de crecimiento elevadas pueden tener una ventaja para los hongos entomopatógenos, por que les permitiría reducir el tiempo para su producción masiva, les provee de una estrategia competitiva contra otros microorganismos durante su vida saprófita y acelera el nivel de control de plaga debido a la rápida infección del huésped (Talaei-Hassanloui y col., 2006). La importancia de la velocidad de germinación puede ser atribuida a varios factores. Durante el periodo de exposición del conidio a la cutícula del insecto antes de la penetración, el hongo puede sufrir desecación, antibiosis de microorganismos saprófitos, inhibición por parte de los lípidos de la cutícula, o ser removido junto con la cutícula durante la muda. Por consiguiente cualquier método que reduzca el tiempo de germinación sobre la cutícula del huésped podría incrementar la eficiencia de un micoinsecticida (Braga y col., 1999). Asimismo se ha reportado que la diferencia en la virulencia entre cepas tiene relación con los retardos en la germinación sobre la cutícula, por eso el porcentaje de germinación después de 10 a 18 h es un parámetro de calidad (Clarkson y col., 1996). Sin embargo, para los agentes de biocontrol existe la necesidad no solo que germinen sino también que infecten y degraden las estructuras de resistencia del patógeno (Jones y col., 2004), de ahí la importancia de las enzimas extracelulares mencionadas anteriormente.

Similarmente, se ha relacionado el tamaño de los conidios con la virulencia en hongos entomopatógenos hifomicetos, mostrando una correlación positiva entre la infectividad y la longitud de los conidios, pero también se han reportado lo contrario (Talaei-Hassanloui y col., 2006; Feng y col., 2000). Por otro lado, se considera que los aislados más virulentos para un huésped específico son aquellos que provienen de la misma o de especies relacionadas. Sin embargo, esto no es un indicador confiable de la virulencia (Talaei-Hassanloui y col., 2006).

En la mayoría de los hongos entomopatógenos, la dispersión de las esporas es pasiva, liberándolas principalmente en el aire y agua (Boucinas y col., 1988; Holder y Kyhani, 2005; Wraight y col., 2007). Sin embargo, en los *Entomophthorales* las esporas son fuertemente descargadas y pueden aterrizar a varios centímetros del huésped o ser acarreados grandes distancias por las corrientes de aire. Algunos insectos infectados con hongos *Entomophthorales* suben a la punta de las plantas solo para morir, una vez que mueren se adhieren firmemente a la planta (Saltamontes infectados con *Entomophaga*

grylli). En otros casos el hongo produce rizoides con pegamento, los cuales fijan el insecto al substrato (afidos infectados con *Pandora neoaphidis*). Dichas adaptaciones ayudan a asegurar que la descarga de esporas entre en contacto con huéspedes potenciales por debajo o en el dosel de la planta. En especies que forman esporas móviles, las zoosporas atacan selectivamente y se encapsulan sobre la cutícula de los huéspedes específicos (*Lagenidium giganteum* sobre larvas de mosquito) (Wraight y col., 2007).

También hay factores específicos del huésped que tienen relevancia sobre la virulencia del hongo, como el estado de desarrollo o edad, integridad del tegumento interno, presencia de heridas, estructura y composición de la cutícula, anatomía del sistema respiratorio y mecanismos de resistencia e inmunidad. Más aun, la especificidad de los hongos entomopatógenos, sugiere que la situación es bastante compleja, a tal grado que se ha clasificado a los hongos entomopatógenos en cuatro grupos: accidentales, ocasionales, facultativos, y patógenos obligados (Khachatourians, 1991). Por otro lado, la dispersión o distribución de la población de patógenos afecta principalmente su probabilidad de encontrar miembros de la población del huésped. El patrón de un patógeno asperjado raramente se parece a su distribución natural, y mucho de éste se desperdicia. Por supuesto, esta pérdida es común entre parásitos (por ejemplo la mayoría no encuentra un nuevo huésped), lo cual justifica una producción elevada. Los patógenos de manera natural están distribuidos de forma desigual y esto explica que deban ser aplicados en dosis elevadas para desarrollar la infección. Esto podría explicar los pobres resultados, cuando muchos patógenos son aplicados por aspersión. La persistencia es otro factor importante en la regulación de la población del huésped por el patógeno (Fuxa, 1987).

Los hongos producen varios metabolitos secundarios (toxinas) (Khachatourians, 1991; Vurro 2007), durante la micosis y en muchos casos la muerte del huésped es debida a ellos (Khachatourians, 1991), Muchos de estos metabolitos pueden ser fuentes novedosas de insecticidas naturales (Vurro 2007). Una de las primeras sustancias identificadas como toxina fue el pigmento rojo, oosporeina, el cual se encontró en cultivos filtrados de *B. bassiana*. La máxima síntesis del pigmento ocurre cuando se emplea glicerol como fuente de carbono y con nitrato como fuente de nitrógeno. Por otro lado, la producción de bassianinas se incrementó cuando se empleó D-glucosa como fuente de

carbono y tartrato de amonio o glicina como fuente de nitrógeno (Khachatourians, 1991). Asimismo, *Beauveria sp* produce varios metabolitos, que incluyen bassianina, beauverisina, bassianolina, beauveriolida, bassiacridina, oosporeina y tenellina. Beauverisina es tóxica para *Culex pipiens (L)*, rompiendo el epitelio del intestino y disolviendo los ribosomas para *Aedes aegypti (L.)* y para *Calliphora erythrocephala*, aunque no fue tóxica para *Helicoverpa zea Boddie*. También, *Paecilomyces fumosoroseus (Isaria fumosorosea)* produce beauvericina y beauverolidas y *Verticillium lecanii (Lecanicillium lecanii)* también produce bassianolida. Otros hongos entomopatógenos también producen toxinas como por ejemplo *Isaria sp.* produce izarían, *Hirsutella thompsonii* produce fomalactona y hirsutellina A, que son conocidas por tener actividad ribonucleasa y ser tóxicas para el ácaro de los cítricos *Oospora destructor*. *Metarhizium anisopliae* produce dextrans que son tóxicas para *Delia antiqua (Meigen)*, *Metarhizium sp* produce dextrans y citochalasin, *Paecilomyces tenuipes (Isaria tenuipes)* produce tenuipesina, *Akanthomyces gracilis* produce akanfomicina, *Cordyceps pseudomilitaris* produce corianhidridas, *Tolypocladium spp* produce efrapetinas, *Aschersonia aleyrodis* produce dextrans y homodextrans y *Aschersonia tubulata* produce dustatina. No obstante, que la producción de estos metabolitos, en adición a que tengan una probable función contra los insectos, probablemente también actúen contra otros hongos o bacterias. Asimismo, algunos metabolitos provenientes de otros hongos actúan contra los hongos entomopatógenos. Por ejemplo, un metabolito de *Penicillium urticae* inhibe el crecimiento y germinación de *B. bassiana* (Vega y col., 2008).

Se debe considerar también, la influencia del ambiente sobre virulencia. Por ejemplo los entomoflorales son patógenos de insectos de crecimiento rápido, o de aquellos que tienen un estadio de vida adulta corta. En estos casos el desarrollo del huésped y del patógeno se ven seriamente afectados por la temperatura del ambiente, con temperaturas bajas se retarda el ciclo de desarrollo del insecto más que el del hongo, de la misma manera, con temperaturas elevadas se acorta el periodo de muda de la cutícula, y el crecimiento del hongo podría restringirse antes de que sea capaz de penetrar en el huésped (Khachatourians, 1991).

2.8. Factores ambientales

Los factores ambientales afectan la epizootia de los entomopatógenos y por tanto su uso en el control de insectos, la persistencia del patógeno es un factor crítico dentro de la epizootia, así como factores de introducción y ambientales son importantes en su persistencia (Fuxa, 1987). Esto se debe a que los microorganismos se adaptan para crecer bajo diferentes condiciones ambientales, aun en algunas relativamente extremas. La mayoría de microorganismos sufre un proceso de diferenciación celular, por ejemplo la esporulación, cuando la continuación del crecimiento no es posible. Tanto el crecimiento como el estado diferenciado son estados estables. De esta forma el proceso de diferenciación se puede considerar como una transición entre estados estables vía uno inestable (Toledo y col., 1994). Asimismo, los factores ambientales regulan la fisiología de los hongos, su habilidad para infectar al huésped, la susceptibilidad o resistencia de éste hacia la infección, el progreso de la infección, la esporulación sobre el cadáver y la capacidad de dispersión y supervivencia de las formas fúngicas infecciosas. A continuación, se enlista una sinopsis de los factores ambientales más importantes (Ferron y col., 1991; Wraight y col., 2007).

2.8.1. Luz solar

La luz solar (el espectro activo está entre 290 y 400nm) es el factor ambiental más destructivo para la persistencia de los entomopatógenos. La vida media de diferentes tipos de inóculo (conidios, esporas, toxinas) expuestos a la luz solar se estima alrededor de una hora para el entomopatógeno más sensible, hasta aproximadamente 96 h para el más resistente. La luz solar puede inactivar a los entomopatógenos de manera directa o indirecta. El efecto directo puede ser por eliminaciones, entrecruzamientos, rompimiento de la hebra y/o formación de sitios lábiles en el DNA. El efecto indirecto puede ser debido a la generación de radicales altamente reactivos (peróxidos, hidroxilos, oxígeno singulete) que inactivarían a los entomopatógenos. Estos radicales, producidos por la radiación ultravioleta cercana, son los primeros responsables de la reducción de la persistencia en el campo de los entomopatógenos e insecticidas microbianos (Ignoffo, 1992). La radiación de menores longitudes de onda, la porción ultravioleta B (UVB) del espectro solar (280-320 nm) es más letal. Sin embargo, la radiación dentro del intervalo UVA (320-400 nm) también es dañina. La persistencia de los propágulos fúngicos sobre substratos expuestos

a la radiación solar directa, es substancialmente reducida, en comparación con los propágulos en lugares protegidos (como son dentro de los biseles de la planta o bajo las hojas, las cuales absorben la radiación UV). Aun en áreas con sombra los propágulos pueden morir por la radiación reflejada. A pesar, de esta gran susceptibilidad inherente, las especies de hongos entomopatógenos y las cepas dentro de ellas, difieren significativamente en su susceptibilidad hacia la radiación solar (Wraight y col., 2007). En la Tabla 2.2, se resume el efecto de la radiación solar sobre la vida media de los conidios de varias especies de hongos entomopatógenos en función del sitio de aplicación.

Tabla 2.2. Vida media estimada de esporas de especies de hongos entomopatógenos expuestos a luz solar simulada y natural (adaptado de Ignoffo, 1992).

Especie	Sitio de aplicación	Vida media (h)
Luz solar simulada		
<i>Aspergillus niger</i>	vidrio	14.8
<i>Beauveria bassiana</i>	vidrio	1.9-2.0
<i>Metarhizium anisopliae</i>	vidrio	1.3-4.0
<i>Nomuraea rileyi</i>	vidrio	2.4
Luz solar natural		
<i>Beauveria bassiana</i>	hojas de soya	48-72
<i>Nomuraea rileyi</i>	hojas de soya	48-192
	hojas de repollo	3.6

Mientras que los componentes de la radiación UV del espectro solar son dañinos, la irradiación a elevadas longitudes de onda (luz visible) puede ser benéfica por la estimulación de un mecanismo de fotoreactivación que repara el DNA dañado. La importancia de este mecanismo de reparación parece variar entre aislados del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Aunque no se observaron niveles significativos de él en cepas de *Lecanicillium sp* (identificado como *V. lecanii*) *Aphanocladium album*, o *M. anisopliae* (Wraight y col., 2007).

Los propágulos fúngicos son irradiados sobre un substrato definido usando una longitud de onda y lux (lumen/m²) definidos por un periodo específico, y la viabilidad de estos se

cuantifica y compara con la de propágulos cubiertos de la radiación. A pesar de que la luz solar es variable e impredecible, se puede obtener mucha información útil, estudiando el efecto de la luz solar natural sobre la supervivencia fúngica y su eficiencia contra artrópodos. Sin embargo, un número de variables climáticas (temperatura, precipitación, humedad relativa, época del año, nubes, etc.), complican enormemente la evaluación del impacto perjudicial de la radiación solar en el campo (Wraight y col., 2007).

2.8.2. Temperatura

Para evaluar la habilidad de un hongo entomopatógeno, se deben considerar su virulencia, así como su resistencia a las condiciones ambientales del hábitat del insecto. Las altas y bajas temperaturas son dos factores ambientales abióticos muy importantes que limitan el uso de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico. Es por ello que el efectivo uso de patógenos fúngicos, en un programa de manejo integrado de plagas (MIP), necesita la selección de aquellos tolerantes al intervalo de temperatura encontrado en el ecosistema involucrado (Fernández y col., 2008).

En muchos ambientes agrarios, la temperatura durante la estación de crecimiento se incrementa en un intervalo aproximado de 10 a 40 °C; sin embargo, el intervalo óptimo para el crecimiento y el desarrollo de la infección para la mayoría de hongos entomopatógenos está entre 10 y 35 °C (Ignoffo, 1992; Wraight y col., 2007; Fernandes y col., 2008). *Beauveria bassiana* crece en un intervalo amplio de temperatura, de 8 a 35 °C, con un límite máximo de 37 °C (Fernández y col., 2008).

Los efectos dañinos a temperaturas menores de 10 y mayores de 30 °C, se presentan cuando los hongos son estresados por interacciones con agua, luz solar, químicos para follaje o suelo y/o otros factores (bióticos o abióticos). Las temperaturas mayores a 35 °C generalmente inhiben el crecimiento y desarrollo de los entomopatógenos, y la viabilidad o actividad insecticida del inóculo disminuye marcadamente cuando la temperatura se aproxima a 50 °C. Las temperaturas menores a 10 °C también inhiben el crecimiento y desarrollo de los entomopatógenos pero pueden incrementar la persistencia del inóculo (Ignoffo, 1992).

La termotolerancia de los conidios de los agentes de control biológico varía mucho entre cepas. También, las condiciones bajo las cuales los conidios son producidos pueden afectar seriamente la termotolerancia, estos toleran temperaturas más elevadas que el micelio debido a (Fernández y col., 2008):

- a) Grandes cantidades de ácidos grasos insaturados los cuales disminuyen la permeabilidad de la membrana celular.
- b) Grandes cantidades de trealosa y manitol que proveen protección contra la desnaturalización de proteínas y membranas.

El intervalo relativamente amplio de tolerancia térmica, le confiere a los conidios una adaptación a condiciones con grandes fluctuaciones térmicas. El punto de muerte térmica para conidios de aislados de *B. bassiana* se encuentra entre 45 y 50 °C o incluso hasta 55 °C después de 10 minutos de exposición (Fernández y col., 2008). Las esporas de varias especies pueden tolerar muy elevadas temperaturas por periodos de tiempo muy cortos (150 °C por 30 s); Sin embargo, la mayor amenaza para periodos largos está usualmente cercana a los 40 °C (Wraight y col., 2007).

Por otro lado, los conidios de la mayoría de especies sobreviven bien a temperaturas por debajo de 0 °C y pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo, en un intervalo de temperatura de -20 a -80 °C o en nitrógeno líquido (-196°C). La influencia de la temperatura sobre la germinación *in vitro*, el crecimiento vegetativo y la esporulación se determina generalmente en cámaras de ambiente controlado usando una variedad de medios de cultivo (Wraight y col., 2007).

En el diseño de un bioensayo es preciso considerar las temperaturas que se esperarían en condiciones de campo, no solo se debe considerar la temperatura ambiental, si no también el comportamiento del insecto que puede influenciar su temperatura corporal. La mayoría de estudios sobre la eficacia de entomopatógenos se ha enfocado en el efecto de las temperaturas constantes y han ignorado las fluctuaciones. Su influencia sobre la eficacia de los hongos entomopatógenos en el campo está limitada principalmente a mediciones detalladas de las temperaturas después de la aplicación de un hongo. Los datos obtenidos, se comparan con observaciones del desarrollo de epizootias. A pesar de que esta estrategia puede proveer información valiosa a cerca de los factores que afectan

la iniciación y desarrollo de una epizootia y facilitar futuros experimentos, otras de variables como radiación solar y humedad limitan alcanzar conclusiones definitivas (Wraight y col., 2007).

2.8.3. Humedad

La esporulación fúngica, así como su germinación requieren una elevada humedad o agua libre. Se ha intentado demostrar la importancia de la humedad en el inicio de una epizootia fúngica natural y muchos fracasos en intentos de control microbiano con hongos han sido atribuidos a condiciones climáticas adversas (especialmente secas). Esto ha generado la creencia general de que condiciones de humedad elevada son esenciales para el uso efectivo de los hongos en el control microbiano. A pesar de que esto es cierto para muchas asociaciones insecto-hongo patógeno, no es una regla general. Por ejemplo *M. anisopliae* var. *acridum* es capaz de infectar a la langosta del desierto *Schistocerca gregaria*, a humedades relativas tan bajas como 13 %. Este hongo está muy adaptado a las condiciones de poca humedad, incluso produce esporas dentro del cadáver. La capacidad de algunos hongos para operar bajo condiciones de poca humedad, generalmente se atribuye a las condiciones de humedad en los microhabitats dentro de los cuales son activos (superficies axiales de las hojas o pliegues membranosos de la cutícula del insecto). En algunos casos los hongos son capaces de aprovechar periodos cíclicos u ocasionales de elevada humedad (especialmente durante la noche), para infectar huéspedes bajo lo que generalmente se describiría como condiciones de poca humedad. La humedad puede tener también varios efectos significativos sobre la persistencia de los inóculos fúngicos (Wraight y col., 2007). Los conidios generalmente exhiben una mayor estabilidad bajo condiciones secas y frías, sin embargo, la supervivencia de los conidios de algunos hongos (por ejemplo *M. anisopliae*) es mayor bajo una combinación de temperatura moderada y humedad elevada (Arthurs y Thomas, 2001). La medición de los efectos de la humedad sobre la viabilidad, germinación, crecimiento y esporulación usualmente se efectúa usando medios ajustados con diferentes cantidades de agua, o bien manipulando la actividad de agua (Wraight y col., 2007).

2.8.4. Actividad de agua (a_w)

El simple contenido de agua de un material (porcentaje de humedad), no toma en consideración la cantidad de agua que esta termodinámicamente disponible, y tiene poca utilidad en la mayoría de las situaciones. La actividad de agua (a_w) se define como la humedad relativa de la atmósfera gaseosa en equilibrio con el substrato (Han y. Nout, 2000), esta basada en la ley de Roault para soluciones ideales y no toma en consideración la interacción de los solutos con otros componentes diferentes al agua; consecuentemente, la precisión del cálculo es mayor para soluciones diluidas (Grant, 2004). Este concepto se utiliza para describir el equilibrio entre un sistema heterogéneo y la fase de vapor de agua circundante (considerada como un gas ideal). La actividad de agua de una solución está dada por (Gervais y col., 1996):

$$a_w = \frac{P_w}{P_w^o} = \gamma_w X_w$$

Donde:

P_w : Presión parcial de vapor de agua en equilibrio con la solución.

P_w^o : Presión parcial de vapor de agua pura en las mismas condiciones.

X_w : Fracción molecular de agua.

γ_w : Coeficiente de actividad de agua (dependiente de la concentración).

La actividad de agua es simplemente el contenido efectivo de agua expresado como su fracción mol, lo cual también se refleja en la humedad relativa a la cual se alcanza el equilibrio dentro de un contenedor sellado, donde se colocó un producto higroscópico o solución. El agua pura tiene un valor de actividad de agua de 1 y todas las demás soluciones tienen valores menores de 1, que se pueden medir con métodos fáciles y rápidos (Grant, 2004). La a_w y la temperatura son factores críticos que afectan el crecimiento y metabolismo de los hongos. (Parra y col., 2004).

Existe poca información sobre la influencia del estrés sobre la virulencia de los hongos entomopatógenos. Se ha mostrado que el estrés osmótico hace de los conidios de *M. anisopliae* más virulentos hacia los insectos. También, se ha mostrado, que el estrés nutricional, la radiación UV y el estrés osmótico durante el crecimiento mejoran la virulencia de los conidios de *M. anisopliae* (Rancel y col., 2008).

El crecimiento de *L. lecanii* disminuye progresivamente con valores de actividad de agua (a_w) menores a 0.957. Lo cual es similar a lo reportado para *Beauveria bassiana*, *M. anisopliae* y *P. farinosus*. (Gillespie y Crawford, 1986). La actividad de agua se emplea como criterio de selección para simular un micro ambiente con poca disponibilidad de agua. Es importante evaluar los hongos utilizados en el control biológico, creciendo a baja actividad de agua, porque, sus conidios varían su infectividad en función de este parámetro (Barranco-Florido y col., 2002).

2.8.5. Lluvia

El impacto de la lluvia sobre la persistencia de los propágulos fúngicos sobre insectos y follaje no ha sido estudiado extensivamente. La recuperación pobre de propágulos de los insectos después de un lavado vigoroso, ha permitido la creencia general de que la lluvia no lava un número significativo de esporas del íntertegumento de los insectos. Sin embargo, en un estudio de laboratorio, con lluvia simulada, se encontró que se remueven cantidades significativas de conidios de *B. bassiana* del íntertegumento de la larva del escarabajo colorado de la papa. Asimismo, estudios de campo dieron evidencia que apoya estos resultados al menos con respecto a la lluvia que ocurre inmediatamente después de la aplicación del hongo (Wraight y col., 2007).

Otros estudios de laboratorio indicaron que la formulación puede afectar significativamente la retención de los conidios sobre follaje expuesto a la lluvia. Sin embargo, los que se aplican en formulaciones aceitosas o con aceites emulsificantes persisten más tiempo sobre el follaje expuesto a lluvia inmediatamente después de su aplicación, que los aplicados en formulaciones acuosas. La lluvia que va acompañada de viento, también ha mostrado que interrumpe el desarrollo de las epizootias fúngicas, por la remoción del inóculo o de las fuentes de inoculación (cadáveres de insectos) y de esta manera podría interferir con los programas de biocontrol inoculativo, el cual cuenta con la producción de esporas mediante el inóculo primario para efectos de control (Wraight y col., 2007).

2.9. Métodos de conservación

La pérdida potencial de virulencia es relevante en el mantenimiento de cepas en general, en la producción de aislados para bioensayos comparativos, y es particularmente crítico para cepas comerciales, sometidas a varios ciclos de siembra, antes de un cultivo a gran escala. La potencial pérdida de virulencia tiene implicaciones sobre la calidad del producto obtenido a partir de un lote de fermentación en particular, por lo que mantener este parámetro durante el proceso de producción es esencial para asegurar la calidad del producto (Brownbridge y col., 2001).

Una variedad amplia de técnicas se han desarrollado para la conservación de hongos entomopatógenos, las cuales tienen sus ventajas y desventajas: la selección de la técnica más apropiada tendrá que ser definida con base en las necesidades específicas de los aislados y de su uso en particular. Los hongos entomopatógenos se conservan generalmente por transferencias frecuentes en medio de cultivo (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2003). Sin embargo, los efectos sobre la morfología y virulencia de este método de conservación varían considerablemente entre aislados y especies (Butt y col., 2006). Por ejemplo, este método de conservación, puede inducir la pérdida de patogenicidad en aislados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces farinosus* y *Lecanicillium lecanii* mientras que, otros aislados retienen aparentemente su virulencia después de cultivos subsecuentes (Brownbridge y col., 2001). Otros problemas asociados con este método de conservación son que los cultivos tienen un corto periodo de vida y son susceptibles a contaminaciones (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2003).

La aparente contradicción que existe en el empleo de los diferentes métodos de conservación sirve para resaltar la variación considerable, inter e intra especies, en los efectos de cultivos subsecuentes sobre la virulencia y la estabilidad genética. Esta variabilidad, puede deberse a las diferentes metodologías empleadas, por ejemplo, cultivo monospórico versus cultivo multiespórico, uso de medios de cultivo enriquecidos, etc., esto se debe especialmente a que los eventos que producen la atenuación pueden ser aleatorios (mutaciones) o debidos a las condiciones de cultivo (Brownbridge y col., 2001).

La preservación con un crioprotector a -196°C inmerso en nitrógeno líquido, después de un congelamiento a velocidad controlada, se recomienda como el mejor método de conservación para mantener tanto la viabilidad celular como las propiedades biológicas, por ejemplo, la infectividad y la virulencia. Sin embargo, mantener cultivos en nitrógeno líquido es caro y requiere mucho tiempo de dedicación, es por esto que no es accesible para muchos laboratorios y pequeños productores. Existen otras técnicas relativamente más simples y baratas para la preservación de cultivos, pero cada uno de estos métodos menos sofisticados, puede resultar en un éxito parcial con diferentes grupos de hongos (López-Lastra, y col., 2002). En la Tabla 2.3 se enlistan los principales métodos de conservación.

Tabla 2.3. Sistemas de conservación para hongos entomopatógenos modificado de Khachatourians, (1991) (a= años, m= meses).

Sistema de conservación	Duración	Estabilidad fúngica	Comentarios
Placas 20°C	1-8 m	Poca	Requiere resiembras periódicas. Intensiva en mano de obra
Placas -20°C	1-2 a	Buena	Costo y mantenimiento moderadamente intensivos
Placas + aceite mineral	1-20 a	Promedio	Bajo costo
Agua destilada	1-10 a	Promedio	El costo depende del sistema de refrigeración
Nitrógeno líquido -196°C	> 10 a	Excelente	Disponibilidad del sistema de nitrógeno líquido
Liofilización	> 10 a	Excelente	intensiva en mano de obra y costos

La técnica de conservación en Sílica gel se considera como una buena opción para los laboratorios que se dedican a la producción masiva de hongos entomopatógenos, ya que es una técnica de conservación a largo plazo, sencilla, que no requiere de equipo específico, sobre todo preserva la viabilidad y pureza del aislamiento, además conserva sus características morfológicas, genéticas y su virulencia (Berlanga-Padilla y Hernández-Velázquez, 2003). Además esta técnica ha sido exitosa en la conservación de esporas de otros Deuteromicetos (Loera y col., 1999).

2.10. Producción de conidios

A continuación se exponen algunos factores que inciden en la producción de conidios de hongos entomopatógenos, la mayoría ya han sido analizados en estudios del tipo de cultivo, condiciones de crecimiento, influencia de nutrientes y aireación, así como de la respuesta inherente de cepas individuales.

2.11. Fermentación en medio sólido (FMS)

2.11.1. Definición

La FMS se define como el crecimiento de microorganismos sobre substratos sólidos húmedos, que contienen la suficiente humedad para permitir el crecimiento y metabolismo microbiano, pero sin que exista agua libre y con el aire como fase continúa (Pandey, 2003; Krishna, 2005; Rahardjo y col., 2006). Generalmente se relaciona el crecimiento de estos en medios comprendiendo tres fases (Desgranges y Duran 1990):

1. Una fase sólida la cual es generalmente un substrato vegetal que contiene los nutrientes.
2. Una fase líquida unida a la matriz sólida donde ocurre la transferencia de masa.
3. Una fase gaseosa

Debido a las grandes diferencias en la especificidad del huésped y virulencia entre aislados, es importante identificar los rasgos que tienen un papel importante en la infectividad y virulencia. A pesar que algunos rasgos como velocidad de germinación, velocidad de crecimiento y producción de toxinas se han correlacionado positivamente

con la virulencia para algunas combinaciones huésped-hongo, en muchas otras no existe esta relación (Talaei-Hassanloui y col., 2006). Es por esto que en el desarrollo de agentes de biocontrol, es necesario encontrar métodos para su producción masiva (Pascual y col., 2000), siendo un prerrequisito para cualquier aplicación en el campo a gran escala. Sin embargo, la producción industrial de los hongos entomopatógenos permanece poco sofisticada (Arcas y col., 1999). También es necesario determinar las mejores condiciones de almacenamiento, además de comprobar la virulencia de los aislados producidos, porque ésta puede ser afectada por las condiciones ambientales durante la producción (Pascual y col., 2000; Holder y Kyhani, 2005).

La metodología empleada para la producción masiva de los hongos entomopatógenos afecta marcadamente su actividad bioinsecticida. Sin embargo, aspectos como las condiciones de cultivo y los requerimientos nutricionales de las cepas seleccionadas deben ser cuidadosamente evaluados, a través de estudios en el laboratorio antes de cualquier intento de evaluación en el campo (Arcas y col., 1999). La eficacia y supervivencia del hongo están relacionadas con características, que difieren entre conidios sumergidos y aéreos, como son tamaño o apariencia, junto con diferencias en la hidrofobicidad superficial de los conidios. (Pascual y col., 2000).

Los métodos más comunes para la producción masiva involucra fermentación en medio sólido (Feng y col., 2000) o un sistema de cultivo en dos etapas, en este último, se cultiva el inóculo en medio líquido y después se agrega a un substrato sólido para la producción masiva, en ambas técnicas el producto deseado son los conidios, por su gran virulencia y persistencia a condiciones ambientales adversas (Dorta y col., 1996; Arcas y col., 1999). En aplicaciones a gran escala la necesidad de cantidades importantes de conidios infecciosos ha promovido desde hace tiempo el desarrollo de sistemas de cultivo baratos (Dorta y col., 1996).

2.11.2. Ventajas y desventajas

La FMS se ha empleado como un método ventajoso para la producción masiva de los hongos, esto se debe principalmente a la elevada productividad, simplicidad en el desarrollo, bajos requerimientos de energía, generación de pocos desechos y facilidad en

la recuperación del producto (Ghildyal y col., 1992; Feng y col., 2000). Además es factible el empleo de condiciones no asépticas, uso de materiales crudos como substratos, menor espacio de fermentación, fácil control de los contaminantes y generalmente medios de fermentación más simples (Krishna, 2005). Aunado a lo anterior se destacan otras ventajas como la reducción en la represión catabólica y la inhibición por producto final, elevada concentración de producto en el medio, cambios en las características de las enzimas, como una elevada termoestabilidad de las enzimas producidas (Shankaranand y col., 1992; Rodríguez y Sanromán, 2006).

Dentro de las desventajas se pueden incluir la importancia crítica del contenido de humedad, el incremento en el calentamiento de los sólidos fermentados, la necesidad de grandes cantidades de inóculo, además del pretratamiento del substrato para facilitar el anclaje del microorganismo (Shankaranand y col., 1992). Por otro lado, a pesar de que los hongos filamentosos se adaptan para crecer sobre superficies sólidas, la mayoría de estudios fisiológicos y de biología molecular de estos organismos se lleva a cabo en medios líquidos. Una parte importante de esta contradicción radica en la ausencia de métodos para medir, *in situ* o *ex situ*, las variables importantes de crecimiento y funcionamiento de estos organismos, cuando se encuentran creciendo y produciendo metabolitos sobre dichas superficies (Viniestra-González y col., 2003; Raghavarao y col., 2003), adicionalmente, la fermentación líquida es usualmente más rápida y es más fácil controlar las propiedades físicas o químicas del sistema (Feng y col., 2000).

2.11.3. Factores ambientales

El crecimiento de cada aislado es influenciado por tipo y concentración de nutrientes, contenido de humedad, la actividad de agua del medio, temperatura, pH, suministro de aire, etc. (Feng y col., 2000; Krishna, 2005). Todos estos parámetros influyen sobre la conidiación debido a que afectan la fisiología del microorganismo, la germinación de las esporas, el crecimiento vegetativo, la síntesis enzimática y de metabolitos secundarios, sin embargo, existen diferencias importantes para cada especie, lo que hace difícil establecer una regla general que describa este efecto.

2.11.4. Actividad de agua (a_w)

El potencial de agua es la energía potencial del agua en función a la energía del agua pura libre bajo condiciones de referencia, cuantifica la tendencia del agua para moverse de un área a otra debido a osmosis, gravedad, presión mecánica, o tensión superficial. Es un concepto fundamental ampliamente aceptado para cuantificar el estado energético del agua en substratos orgánicos. En cualquier sistema, el agua fluye de potenciales elevados hacia potenciales menores y la disponibilidad de agua para procesos fisiológicos disminuye conforme el potencial se reduce. En sistemas de FMS, existen dos componentes involucrados en el potencial del agua: el potencial mátrico y el osmótico, el primero incluye los efectos de absorción y capilaridad, el segundo es determinado por la concentración y propiedades polares de los solutos. Los efectos de ambos están involucrados en el decremento de la actividad microbiana a través de la modificación de la difusión de los solutos y gases (Gervais y col., 1988).

El contenido de humedad juega un papel significativo en el rendimiento final de los conidios, pero la optimización de este parámetro puede ser compleja. Muchos hongos mitospóricos prefieren contenidos elevados de humedad; sin embargo, diferentes substratos varían en sus curvas de absorción de humedad y pueden alcanzar la máxima adsorción a diferentes niveles de contenido de humedad. Generalmente, los contenidos de humedad más usados, calculado como porcentaje de agua presente en un substrato húmedo sobre una base de peso, están en el intervalo de 35 a 60 % (Jenkins y col., 1998), dependiendo mucho de variaciones inevitables en procedimientos de cocción y autoclaveado (Arzumanov y col., 2005).

La actividad de agua puede interactuar con varios factores físicos y químicos que afectan el crecimiento fúngico (Arzumanov y col., 2005), esto se debe a que altera el potencial químico que existe entre el medio y el soluto intracelular, necesario para permitir el ingreso del agua a las células (Larroche, 1996). Asimismo, existe una relación cercana entre el contenido de humedad y la disponibilidad de oxígeno. Los incrementos en el contenido de humedad del substrato tienden a disminuir la disponibilidad de oxígeno debido a que los espacios interpartícula están llenos con agua y el aire es forzado a salir (Jenkins y col., 1998). Sin embargo, el control de este parámetro es difícil durante el proceso, ya que la disponibilidad de agua puede cambiar durante el curso de la

fermentación como resultado de las variaciones en el contenido de humedad, a causa de la evaporación causada por la generación de calor metabólico, el consumo de agua por la hidrólisis de los polisacáridos y el agua producida por el metabolismo de los carbohidratos (Feng y col., 2000).

Los conidios de *Metarhizium* producidos bajo un estrés osmótico elevado (cloruro de potasio o cloruro de sodio al 0.8 M), varían su virulencia, comparados con los producidos en Agar papa dextrosa con extracto de levadura. Sin embargo, la virulencia disminuyó cuando la concentración de sal se redujo a 0.6 M. Se ha reportado también, el incremento en la virulencia de los conidios producidos bajo estrés osmótico por la adición de cloruro de potasio 0.75 M o en un medio con glicerol, así como para conidios producidos a partir de micelio sumergido en un medio con elevada osmolaridad, con polietilenglicol (PEG) 200 sobre *Schistocerca americana* (Rangel y col., 2008).

Los conidios de los hongos entomopatógenos, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Isaria fumosoroseus* (*Paecilomyces fumosoroseus*) producidos en medios con baja actividad de agua o con una elevada concentración de glicerol, acumularon en mayor concentración polioles y trealosa, y a demás mostraron una mayor virulencia que los producidos en un medio convencional de Agar Sabouraud Dextrosa. Las elevadas concentraciones de polioles y trealosa se han relacionado con el incremento en la tolerancia al estrés. La hidrólisis de la trealosa es el evento principal durante la germinación temprana de los conidios, presumiblemente provee de glucosa para energía. La trealosa y los polioles sirven como reservas de energía fácilmente movilizables, para una rápida germinación, lo que explica al menos parcialmente, porqué los conidios producidos bajo una condición de cultivo tienen una mayor velocidad de germinación en relación con los producidos bajo otras cuando la germinación ocurre en un solo medio. En algunos casos, una elevada velocidad de germinación, se asocia con una elevada virulencia (Rangel y col., 2008).

2.11.5. Substratos y Nutrientes

Para una producción máxima en general, es esencial una buena relación área/volumen. Las partículas del substrato deben permanecer separadas después de la hidratación y esterilización, las que formen grumos cuando se les adiciona agua reducen esta relación,

limitando el espacio sobre el cual ocurre la esporulación. Un sustrato ideal no solo debe contener partículas con las dimensiones correctas, también debe mantener su integridad estructural durante la preparación del proceso de producción (Jenkins y col., 1998).

Existe una gran variedad de sustratos, nutritivos e inertes, disponibles para la producción de hongos entomopatógenos. Entre los que se encuentran trigo, avenas, harina de maíz-perlita, turba (Jones y col., 2004), arroz, cascarilla de arroz, salvado de trigo (Feng y col., 2000). También se han usado trigo sarraceno, soya macerada, mazorca de maíz, mijo, cebada, sorgo, papa, pan, harina de cáscara de cacahuate, vermiculita, tela, arcilla, y granos de arcilla. La elección del sustrato dependerá de un número de factores, que incluyen disponibilidad, costo y preferencia del aislado (Jenkins y col., 1998).

El sustrato comúnmente seleccionado para la producción de conidios fúngicos ha sido el arroz blanco, lo cual probablemente se deba a la combinación de factores que incluyen balance nutricional, bajo costo, disponibilidad en todo el mundo, características físicas como son tamaño y forma del grano, propiedades de hidratación e integridad estructural aun después de ser colonizado por el hongo (Jenkins y col., 1998). El arroz y sus subproductos de procesamiento son sustratos fácilmente disponibles y muy empleados para el cultivo de *M. anisopliae*. Sin embargo, cuando se emplea arroz entero, las partículas relativamente grandes limitan la disponibilidad de sustrato para el hongo; si se emplea un sustrato muy fino, es necesario introducir un texturizante para incrementar la disponibilidad de aire y agua. El uso de bagazo de caña junto con estos sustratos incrementa la disponibilidad de agua y da soporte al crecimiento fúngico (Arzumanov y col., 2005).

El empleo de la FMS asegura la compatibilidad de los agentes de biocontrol con las técnicas de formulación y aplicación de los conidios lipofílicos (hidrofóbicos). Existen hongos entomopatógenos, como *Metarhizium* que producen naturalmente estos conidios lipofílicos sobre sustratos sólidos. El micelio, las blastosporas y los conidios sumergidos pueden ser obtenidos por fermentación líquida, pero son hidrofílicos, no pueden ser suspendidos en aceites, además pierden viabilidad relativamente rápido durante el almacenamiento (Arzumanov y col., 2005).

Numerosos nutrientes pueden regular la esporulación mediante efectos metabólicos, estos incluyen fuentes de carbono y nitrógeno, minerales y vitaminas o cofactores. El carbono representa la fuente de energía disponible para el crecimiento del microorganismo. Puede ser un monosacárido como la glucosa o una molécula compleja como la celulosa o el almidón, otras fuentes de carbono incluyen sucrosa, lactosa, rafinosa, maltosa, celobiosa, extracto de malta, glicerol, etanol, acetato de potasio, etc. Las fuentes de nitrógeno que estimulan la conidiación fúngica incluyen tartrato de amonio, oxalato, sulfato, nitrato, nitrato de sodio, urea, peptonas y aminoácidos. Los minerales que mejoran la esporulación incluyen, Na^+ , Ca^{++} , Ni^+ , Cu^+ , Fe^{++} , Mn^{++} , K^+ , Zn^{++} , Mg^{++} , Mo^{++} , etc. También se ha reportado que algunos compuestos orgánicos como las combinaciones de tiamina, biotina y ácido fólico, tiamina y biotina y esteroides, mejoran la esporulación fúngica cuando se agregan al medio de cultivo. Además, de lo anterior algunos compuestos sintetizados por los microorganismos inducen la esporulación (Krishna, 2005).

2.11.6. Inóculo

En general el nivel del inóculo es importante en los procesos de fermentación microbiana, una concentración elevada del mismo aumenta el rendimiento de micelio y el número de esporas producidas, sin embargo, la densidad del inóculo no tiene una respuesta lineal en los procesos fermentativos (Feng y col., 2000). En la producción a gran escala de hifomicetos, se han reportado concentraciones del orden de 10^5 a 10^6 esporas/mL para el caso de la fermentación líquida (Khachatourians, 1991). En el caso de la fermentación en medio sólido se han reportado concentraciones finales de 1.3×10^{10} y 3.7×10^{10} conidios g^{-1} de materia seca inicial, para dos cepas de *B. bassiana* (Arcas y col., 1999). Tomando en consideración que el nivel requerido generalmente está alrededor de 10^{12} conidios por hectárea o mayores, es muy importante conocer el rendimiento del sistema de cultivo empleado para seleccionar las condiciones de cultivo apropiadas y/o el método más apropiado de producción (Dorta y col., 1996).

2.11.7. pH

Un factor importante en cualquier proceso de fermentación es el pH, el cual puede cambiar en respuesta a las actividades metabólicas. Las más obvias son la secreción de

ácidos orgánicos, que pueden causar la disminución de este parámetro, o la asimilación de ácidos orgánicos presentes en el medio, puede incrementar el pH y la hidrólisis de la urea lo que ocasionaría una alcalinización del medio. El cambio en el pH también puede ocurrir como consecuencia de la fuente de nitrógeno seleccionada así como de las características del crecimiento (Krishna, 2005).

2.11.8. Temperatura

Probablemente, sea la variable física más importante que afecta el desarrollo de la FMS, porque el crecimiento y la producción de enzimas o metabolitos son sensibles a esta variable. Como en el caso del pH, los hongos pueden crecer en un amplio intervalo de temperatura que esta comprendido entre los 20 y 55 °C, la temperatura óptima para el crecimiento puede ser distinta de la óptima para la formación de producto. El control de la temperatura en FMS es bastante difícil de conseguir, debido a que los enfriamientos convectivo y conductivo son inadecuados para la disipación de calor metabólico, debido a la poca conductividad térmica de la mayoría de los substratos sólidos, así como a la naturaleza predominantemente estática del proceso (Krishna, 2005).

2.11.9. Aireación y composición de la atmósfera

Todos los hongos mitospóricos (hongos que solo se le conoce su reproducción asexual) son aerobios y requieren la provisión de oxígeno para el crecimiento y la conidiación. Sin embargo, los diferentes hongos varían mucho en sus requerimientos de aireación (Jenkins y col., 1998). Por otra parte, la exposición de la hifa al aire se ha reconocido como el estímulo más poderoso en el inicio de la conidiogénesis en hongos filamentosos. (Roncal y Ugalde, 2003).

La aireación cumple con cuatro principales funciones en FMS, mantiene las condiciones aerobias, desabsorbe dióxido de carbono, regula la temperatura del substrato, y el nivel de humedad. La atmósfera gaseosa afecta significativamente el nivel relativo de producción de biomasa y la producción de enzimas. La FMS permite el libre acceso de oxígeno al substrato y no se observan limitaciones por oxígeno (Krishna, 2005). La transferencia de este gas hacia el microorganismo es el fenómeno de mayor importancia sobre el cual se sustenta la actividad microbiana, siendo la tasa de transferencia del

oxígeno hacia las células el factor limitante que determina la tasa de conversión biológica (Thibault y col., 2000). Lo anterior se debe a que en el metabolismo aeróbico, el oxígeno es el aceptor final en el transporte de electrones mediante un sistema de oxidasas en las mitocondrias de los hongos. También puede ser incorporado en la fosforilación a nivel de sustrato por una oxigenasa (Bajracharya y Mudgett, 1980).

Una hifa expuesta directamente al aire, desarrolla un estado hiperoxidante, caracterizado por el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en cantidades que sobrepasan la competencia celular para neutralizarlas. El estado hiperoxidante ocurre al inicio de los tres pasos morfogénicos durante la conidiación. Se propone que la diferenciación celular surge cuando la célula utiliza mecanismos tendientes a evitar el oxígeno, evitando el estado hiperoxidante (Toledo y col., 1994). Se ha reconocido inicialmente la aparición de cambios dramáticos en las propiedades de superficie de la hifa, inmediatamente después de su exposición al aire, estando involucrada la aparición de una vaina de proteínas de superficie activas alrededor de la hifa aérea, probablemente constituida por una familia de proteínas conocidas ahora como hidrofobinas (Roncal y Ugalde, 2003). En *Neurospora crassa* se ha propuesto que esto resulta en un estado hiperoxidante transitorio que podría disparar la conidiación. Sin embargo, algunos experimentos con varias especies de *Penicillium* han mostrado que la conidiación normalmente sucede bajo condiciones microaerófilas en una atmósfera enriquecida con nitrógeno, y que concentraciones elevadas de oxígeno no afectan significativamente la conidiación en este género (Roncal y Ugalde, 2003). También, es sabido que *M. anisopliae* var *acidum*, puede crecer y esporular exitosamente sin aireación forzada en pequeña escala (Arzumanov y col., 2005).

El crecimiento microbiano, generalmente es independiente de la concentración de oxígeno por encima de un valor mínimo, que depende de la especie fúngica, pero puede ser inhibitorio a elevadas concentraciones (Bajracharya y Mudgett, 1980). Generalmente, las presiones parciales de oxígeno cercanas a 1 atmósfera, inyectando oxígeno puro, afectan negativamente a los microorganismos aerobios, inhibiendo el crecimiento y disminuyendo los rendimientos celulares y de formación de producto (Han y Mudgett, 1992).

Una de las ventajas de los sistemas de FMS a gran escala es la posibilidad de airear constantemente el substrato. Se ha reportado que la aireación forzada es la clave para regular la producción óptima de esporas en sistemas con substratos sólidos. Sin embargo, en estos sistemas la aireación está unida al control de la temperatura y la humedad, lo que dificulta evaluar el efecto de incrementar el aporte de oxígeno (Desgranges y Duran 1990; Jenkins y col., 1998; Arzumanov y col., 2005). La aireación permite la transferencia de oxígeno y dióxido de carbono generado por el metabolismo, es por esto que en FMS, el área de la superficie interfacial por unidad de volumen del líquido, así como las presiones parciales de oxígeno y CO₂ en la fase gaseosa, deben ser tomados en cuenta por su efecto sobre el metabolismo fúngico (Desgranges y Duran, 1990). Sin embargo, la aireación forzada podría incrementar el costo del proceso y si no se diseña e implementa cuidadosamente, puede introducir complicaciones como contaminación y la desecación prematura del substrato (Jenkins y col., 1998).

Contrario a lo que sucede en las fermentaciones líquidas, hay menos reportes sobre, el efecto de la presión parcial de CO₂ (pCO₂). Sin embargo, los resultados muestran gran variabilidad de acuerdo al tipo de microorganismo usado y también de acuerdo al tipo de producción (biomasa, esporas, enzimas, ácidos orgánicos). Para aplicaciones industriales de este tipo de fermentación es importante conocer la sensibilidad del microorganismo a la pCO₂, para incrementar la productividad pero también para disminuir los costos de producción por ejemplo reciclando el gas (Desgranges y Duran, 1990).

Por otro lado, el dióxido de carbono producido en el metabolismo aeróbico provee un mecanismo para desasimilar carbono y obtener metabolitos intermedios (Bajracharya y Mudgett, 1980), su función en la regulación metabólica aún no es clara, mientras que en organismos autótrofos es la fuente primaria de carbono. En heterótrofos, también es un metabolito esencial y es incorporado por anaplerosis para abastecer de intermediarios en puntos de ramificación clave de la biosíntesis. La inhibición del producto con niveles elevados de dióxido de carbono se ha observado en la producción de penicilina, inopina y biomasa (Bajracharya y Mudgett, 1980). Esta inhibición se observa con valores de CO₂ por encima del 20% en *Monascus purpureus* (Han y Mudgett, 1992). Lo anterior sugiere que una atmósfera controlada puede ser una manera de regular el metabolismo primario y secundario en fermentaciones aeróbicas, y podría permitir la optimización de este tipo de

procesos con respecto a la formación de producto y el consumo de energía (Bajracharya y Mudgett, 1980).

De manera general, la producción de conidios tiende a disminuir en función del incremento de CO₂ en la atmósfera en fermentación sólida, depende del aislado en particular. Desgranges y Duran, (1990) reportaron la producción de conidios de *Trichoderma viride* TS en FMS con una concentración de CO₂ de 10% y la de dos cepas de *Aspergillus niger* con 20%. Sin embargo, no hay estudios de la influencia de la pCO₂ en hongos entomopatógenos y se desconoce si son tan tolerantes como otros hongos mencionados anteriormente.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

La población mundial está creciendo, una estimación conservadora, predice un incremento hasta alcanzar aproximadamente 10 mil millones de personas para el año 2050. Ante esto el mayor desafío que enfrenta el mundo es alimentar y proveer de un refugio a esta población que se incrementa con un ritmo exponencial. Más aun, es esencial proteger la salud humana, y asegurar las condiciones sociales y económicas que conlleve al pleno desarrollo del potencial humano. La agricultura debe tener un papel importante para conseguir estas metas, a través de mayores rendimientos en la producción de alimentos y de insumos naturales requeridos por la industria. Es por esto, que el desafío en las décadas venideras es alcanzar la máxima producción de alimentos y otros productos sin el futuro deterioro o destrucción ambiente (Edwards y Gatehouse, 2007).

Usualmente, el estrés constituye el principal factor en la limitación de la productividad, y puede ser clasificado como biótico (plagas, patógenos y malezas) o abióticos (limitantes físicas, como, temperatura, disponibilidad de agua, salinidad). Los insecticidas son efectivos lidiando con el problema inmediato del ataque a los cultivos por parte de los insectos, han sido responsables del incremento en los rendimientos de los cultivos que están sujetos a problemas serios de plagas, pero a largo plazo se han hecho aparentes severos retrocesos, por ejemplo los insecticidas no específicos son dañinos para los organismos no blanco, muchos de los cuales tienen papeles decisivos en el control de las poblaciones de los insectos. Otros problemas asociados con la elevada aplicación de los pesticidas incluyen acumulación de residuos tóxicos en los alimentos, con el subsecuente daño a la salud humana, esto aunado al hecho de que muchas plagas de insectos han desarrollado resistencia hacia estos compuestos (Edwards y Gatehouse, 2007).

Debido a los problemas ambientales y de resistencia de las plagas asociados con los pesticidas químicos, existe un interés creciente en el uso de hongos para el control de plagas de invertebrados, malezas y enfermedades de las plantas, lo que se ve reflejado por el número de productos comerciales disponibles o en desarrollo. Los hongos entomopatógenos tienen un papel clave en la regulación de las poblaciones de insectos,

ya que a diferencia de las bacterias y virus que tienen que ser ingeridos para causar la enfermedad, los hongos infectan al insecto mediante penetración directa de la cutícula, lo que provee la única manera práctica de biocontrol de insectos que se alimentan succionando los jugos de animales y plantas, así como de muchas plagas de coleópteros que no tienen enfermedades virales o bacterianas conocidas (St. Leger, 2007).

Robledo y col. (2005) desarrollaron una metodología para tratar de incrementar la virulencia de aislados de *Beauveria bassiana*, la cual consistió en realizar mutaciones sometiendo a radiación ultravioleta (UV) a 2 aislados silvestres del hongo (Bb 4 y Bb 88) proporcionados por el Colegio de Posgraduados (Instituto de Fitosanidad). El protocolo de mutagénesis se realizó según Loera y col. (1999). La selección de aislados mutantes se realizó en medios con quitina y 2 Desoxiglucosa. Se seleccionaron aquellos que no perdieron la capacidad de esporulación, secreción de enzimas hidrolíticas (halos de actividad), y que tuvieran una velocidad de crecimiento igual o mayor al aislado silvestre (Loera, 2005).

Núñez-Gaona (2004) mostró que una mezcla gaseosa O₂/CO₂ de 16/5 % tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con espuma de poliuretano como soporte inerte en reactores de columna.

Montesinos-Matías (2008), mostró una correlación entre la virulencia y la viabilidad, velocidad de extensión radial y densidad de conidios para aislados de *Beauveria bassiana*, siendo el orden de correlación: viabilidad de conidios, producción de conidios en caja Petri (densidad superficial) y velocidad radial. No se observó relación entre la virulencia y la viabilidad. El aislado Bb 885.2 produjo más del doble de conidios por larva infectada comparada con el aislado comercial.

4. JUSTIFICACION

El uso extendido de los hongos entomopatógenos es un proceso irreversible, de hecho la producción de conidios sobre cereales tiene una larga tradición en América Latina. En la década de 1970, las aplicaciones de *M. anisopliae* en cultivos de caña de maíz cubrieron un área de 100,000 hectáreas/año. En Cuba en 1994, el estado creó 220 centros para la producción de entomófagos y entomopatógenos, se obtuvieron 500 toneladas de *B. bassiana* que se aplicaron a 40,000 hectáreas. En Costa Rica la asociación de productores de caña de azúcar, produjeron más de 740 kg/año de *M. anisopliae* a finales de la década de 1990 (Grimm, 2001).

Los hongos entomopatógenos, incluso diferentes aislados de la misma especie, varían mucho en sus requerimientos de nutrientes, pH, actividad de agua, contenido de humedad del substrato, temperatura óptima tanto para el crecimiento como para la producción de conidios; también hay otras variables que inciden en la producción de conidios, estas son: luz, aireación y periodo de incubación. Todos estos parámetros deben ser rigurosamente investigados y optimizados para asegurar que se producen conidios en cantidades suficientes y de gran calidad (Jenkins y col., 1998).

De todos los aspectos de calidad de un agente de control biológico, el bioensayo es el más importante. Este puede resultar un proceso laborioso y costoso pero, es la única forma de validar la calidad del producto. Debido a la diversidad y variabilidad en el espectro de acción de los microorganismos utilizados para estos fines, e incluso de la especificidad de algunos de ellos sobre determinadas especies, es necesario tener insectos patrones para cada tipo de microorganismo y en algunos casos, también para diferentes cepas (Fernández-Larrea 2002). Uno de estos insectos es *Tenebrio molitor*, el cual ofrece la ventaja adicional de estar disponible todo el año, caso contrario de las plagas estacionales.

Por otro lado, el efecto de la composición de la atmósfera gaseosa, solo se ha vinculado al crecimiento de los microorganismos, a la producción de metabolitos secundarios y en menor grado a la producción de conidios. Sería importante relacionar la composición de la atmósfera gaseosa con parámetros de calidad, pues permitiría diseñar reactores para la

JUSTIFICACION

producción de conidios, disminuir o determinar los mejores tiempos de cultivo, y probablemente reducir gastos de operación, lo que permitiría a los pequeños productores ofrecer un producto de mejor calidad.

5. HIPÓTESIS

La modificación en la actividad de agua del sustrato, a niveles menores a 1, afectará positivamente el crecimiento y producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido.

La modificación en la composición de la atmósfera gaseosa en fermentación en medio sólido, tendrá efecto diferencial sobre el rendimiento de conidios de *Beauveria bassiana*, y sobre la calidad de los mismos.

6. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto de la actividad de agua y la composición de la atmósfera gaseosa sobre la producción de esporas de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido.

Específicos

- Conservar la cepa a largo plazo.
- Seleccionar las condiciones de cultivo y a_w para la fermentación en medio sólido.
- Seleccionar el soporte más adecuado para la producción de conidios de *Beauveria bassiana*.
- Determinar el efecto de variaciones del CO_2 y O_2 sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana*, en fermentación en medio sólido.
- Comparar la calidad de los conidios obtenidos de diferentes condiciones de cultivo, mediante la realización de bioensayos con larvas de *Tenebrio molitor*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Microorganismo

Se empleó la cepa de *Beauveria bassiana* Bb 885.2 perteneciente a la colección de cepas de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. Este aislado fue obtenido por un proceso de mutagénesis a partir del aislado silvestre Bb 88, el cual fue proporcionado por la Dra. Raquel Alatorre del Colegio de Posgraduados (Instituto de Fitosanidad). Para asegurar la homogeneidad del material biológico a partir de un cultivo monospórico, la mutante se sembró por estría en placas con medio Sabouraud dextrosa (SDA), al 4 % (p/v) con desoxicolato de sodio (1 g/L). El medio se esterilizó por calor húmedo (121 ° C y 15 psi) y se vertió en cajas de Petri. Las placas se incubaron a 30 °C, por 4 días, hasta identificar una colonia esporulada. La colonia se sembró en matraces Erlenmeyer con SDA, los cuales se incubaron a 30 °C hasta la esporulación completa, realizándose resiembras periódicas a partir de ellos para asegurar una fuente constante de inóculo fresco.

7.2. Actividad de agua (a_w)

Se empleó etilenglicol (ETG) como depresor de la a_w en concentraciones de 0 a 20 % (v/v), la curva estándar se construyó midiendo las soluciones de ETG en un higrómetro (acualab, Cx-2, Labsenscientific co, USA, 1952), graficando el valor de la a_w en función de la concentración de ETG.

En caja de Petri, a los medios que se describen más adelante se le agregó ETG (v/v) en concentraciones crecientes en el intervalo de 0 a 20 % con incrementos de 2%. Se usó etilenglicol debido a que no es tóxico ni metabolizable para los hongos (Montiel-González y col., 2004).

7.3. Método de conservación

La cepa se sembró por picadura en cajas de Petri con medio SDA, se incubó a 30 °C por 14 días, después se cosecharon los conidios con una solución de Tween 80 al 0.05%.

Posteriormente una parte de los conidios se sembraron en viales con el mismo medio, se incubaron a 30 °C hasta la esporulación y se refrigeraron a 4 °C por 20 días; paralelamente, el resto de los conidios se conservó en granos de Sílica gel, para tal efecto, se emplearon viales (35 x 11 mm), con 0.4g de Sílica gel, malla 60-200, se esterilizaron por calor húmedo (15 psi, 121° C, 15min). Los viales se secaron por calor seco a 60 °C durante 24 horas, posteriormente se colocaron en un desecador al vacío, durante 1 hora. Después se les adicionaron en condiciones de esterilidad 20 µL de la solución de conidios con una concentración entre 10⁶ y 10⁷ conidios/mL. Los viales se mantuvieron en un desecador al vacío a temperatura ambiente (Perkins, 1977). El método ya ha sido probado con éxito para conservar *Aspergillus niger* en el laboratorio (Loera y col., 1999). Después de lo cual, se inocularon cajas de Petri con medio SDA con conidios provenientes de ambos métodos de conservación, se incubaron a 30 °C por 14 días, midiéndose el diámetro de colonia cada 24 h. Al final del cultivo los conidios, se extrajeron y cuantificaron mediante cuenta al microscopio a 40X usando una cámara de Neubauer. Se determinaron el crecimiento radial, área de colonia y la densidad de conidios para cada método de conservación.

Para determinar el valor de la densidad de conidios (conidios/cm²), se midió el área final de las colonias empleando la siguiente ecuación:

$$A = \pi * r^2$$

Donde:

A: área de la colonia (cm²)

π : 3.1416

r: Radio de colonias (cm)

Posteriormente, se dividió la producción final de conidios por el área de colonia. Este valor se graficó en función de la a_w para cada concentración de ETG. Los ensayos se hicieron por duplicado

7.4. Cultivo en placa

7.4.1. Medio de cultivo a diferentes valores de a_w

Se emplearon por separado los medios SDA al 4 % (p/v), Agar Papa Dextrosa, un medio reportado por Alves y col. (2002), con la siguiente composición (g/L), KH_2PO_4 (0.36), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.05), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.6), KCl (1), glucosa (10), NaNO_3 (1.58), extracto de levadura (5) y agar (20). También se empleó un medio con quitina coloidal al 1 % (p/v) como fuente de nutrientes. Se les agregó concentraciones crecientes de etilenglicol en el intervalo de 0 a 10 % (v/v) para reducir la a_w , se empleó este intervalo debido a que con valores de a_w obtenidos con porcentajes de Etilenglicol por encima de 10 % ya no se observó crecimiento. Los medios se esterilizaron por calor húmedo (15 psi, 121 °C, 15 min) y se vertieron en cajas de Petri.

Las placas se inocularon por picadura empleando un palillo de madera estéril y se sellaron con Parafilm M^R, incubándose a 30 °C por 16 días. Cada día se midió el diámetro de las colonias empleando un Vernier, se hicieron recambios del Parafilm M^R para permitir el intercambio gaseoso, cada 2 días.

Después de 16 días para cada concentración de ETG se les determinó el crecimiento radial (cm/h), el rendimiento total de conidios (conidios/placa), y la densidad de conidios (conidios/cm²), como se describió anteriormente. Para determinar el crecimiento radial se graficó el radio de las colonias (cm) en función del tiempo (h), considerando a la pendiente de la línea de ajuste como la velocidad radial ($\mu\text{m/h}$).

Para determinar el rendimiento total de conidios, las colonias se cortaron en trozos pequeños, se colocaron en viales de 50 mL, a cada vial se le agregó un volumen (10 o 20 mL dependiendo del tamaño de la colonia) de una solución de Tween 80 al 0.05% (v/v), se agitaron por 2 minutos con un agitador magnético para suspender los conidios. Estos se cuantificaron empleando una cámara de Neubauer en un microscopio óptico a 40X. Para calcular el rendimiento final, primero se determinó la concentración de conidios por mililitro mediante la siguiente ecuación:

$$N=n*F*D$$

Donde:

N: número de conidios por mililitro.

n: promedio total de conidios en la cámara.

F: factor de dilución de la cámara. (25×10^4).

D: dilución empleada para el conteo.

Después se multiplicó N por el volumen total de la solución de Tween 80 agregada a cada vial.

7.4.2. Tiempo de inóculo

Se utilizó el medio reportado por Alves y col. (2002), con concentraciones de etilenglicol en el intervalo de 0 a 8 % y se esterilizaron por calor húmedo (15 psi, 121 °C, 15 min). El medio se inoculó por picadura con inóculos de 10, 20 y 30 días de edad y se incubaron a 30 °C por 16 días. Después de este periodo se les determinó crecimiento radial, rendimiento final y densidad de conidios, como se describió previa mente.

7.4.3. Tiempo de incubación

Se empleó el medio reportado por Alves y col. (2002) con las mismas concentraciones de ETG que para los experimentos anteriores, se esterilizaron por calor húmedo (15 psi, 121 °C, 15 min). El medio se sembró por picadura con inóculo del mismo tiempo y se incubaron a 30 °C. La mitad de las placas por 16 y el resto por 30 días. Después de cada periodo se determinó crecimiento radial, rendimiento total de conidios y densidad de conidios, empleando la metodología descrita anteriormente.

7.4.4. Temperatura

El aislado se sembró por picadura en cajas de Petri con el medio reportado por Alves y col. (2002), con salvado de trigo (10 g/L), de forma paralela, se sembró un medio, con salvado de trigo a la misma concentración y agar. A los dos medios se les agregaron cantidades crecientes de etilenglicol en el intervalo de 0 a 8% (v/v). La mitad cajas para cada medio se incubaron a 30° C y el resto a 28° C por 14 días, se midió el diámetro de

colonias cada 24 h. Al final del periodo de incubación los conidios se extrajeron y cuantificaron. Con esto se determinó el crecimiento radial así como la densidad de conidios.

7.4.5. Medio con rastrojo de maíz

La cepa se sembró por picadura en cajas de Petri con el medio reportado por Alves y col. (2002), con rastrojo de maíz (10 g/L) se esterilizó por calor húmedo (15 psi, 121 °C, 15 min). Al medio se le agregaron cantidades crecientes de ETG en el intervalo de 0 a 8% (v/v) y se incubó a 28 °C por 14 días. Al final del periodo de incubación, los conidios se extrajeron y se cuantificaron los mismos parámetros que en los experimentos anteriores.

7.5. Fermentación en medio sólido (FMS)

La FMS se llevó a cabo en botellas serológicas de 125 mL de capacidad a las cuales se les agregó 1 g de salvado de trigo, se esterilizaron por calor húmedo (15 psi, 121 °C) por 30 minutos y se les agregaron 2, 3 y 4 mL de agua estéril y caldo Dextrosa Sabouraud (CDS) al 4 % (p/v), hasta alcanzar valores de humedad de 66, 75 y 80 %, respectivamente. El intervalo de agua y caldo SDA seleccionado comprendió desde el mínimo para alcanzar un valor de $a_w = 1$ (66 %), hasta el máximo de 80 %. Se inocularon 4.8×10^7 conidios/g, todo lo anterior se realizó bajo condiciones asépticas, se incubaron a 28° C por 14 días. Después de este periodo, se extrajeron y cuantificaron los conidios. El rendimiento se reportó como conidios por gramo de substrato sólido inicial (conidios/gssi).

7.5.1. Mezcla de substratos

En botellas serológicas de la misma capacidad, se colocó 1g de diferentes mezclas de salvado de trigo y bagazo de caña molido. La composición de cada mezcla fue (p/p): 100/0, 75/25, 50/50, 25/75. De manera independiente se les agregó 1 mL de agua destilada a cada botella. Las botellas se esterilizaron de la misma manera como se describió anteriormente. La humedad de las botellas se ajustó a 66% ($a_w = 1$), adicionando 1 mL de CDS al 4 % (p/v), con lo cual el medio se diluyó 1:2, en condiciones asépticas, se inocularon con 4.8×10^7 conidios/g y se incubaron bajo las mismas

condiciones de los experimentos anteriores. Los conidios se extrajeron y cuantificaron de la misma manera como se describió con anterioridad.

7.5.2. Atmósfera normal

En botellas serológicas de 125 mL se colocó 1 g de salvado de trigo más 1 mL de agua destilada, se esterilizaron por calor húmedo, (15 psi, 121 °C, 30 min). El substrato se inoculó con la misma cantidad de conidios y se le ajustó el contenido de humedad a 66%, bajo condiciones asépticas. Las botellas se incubaron bajo las mismas condiciones (28 °C) y una atmósfera normal O₂/CO₂ 21/0 %. Cada día, por duplicado, se extrajeron los conidios, se cuantificaron como se describió con anterioridad y se les determinó el % de germinación, como medida de la viabilidad. Los rendimientos se ajustaron a un modelo, empleando la rutina Solver del software Excel (Microsoft Office). El modelo empleado fue:

Modelo Exponencial:

$$\frac{dy}{dt} = ke^{-kt}(y_{\max} - y_0)$$

Resolviendo para:

t = 0, y = y₀; para t → ∞, y → y_{max}

$$y = y_0 + (y_{\max} - y_0) * (1 - e^{-kt})$$

Donde:

y: Producción (conidios/gssi)

y₀: Inóculo (conidios/gssi)

y_{max}: Producción máxima (conidios/gssi)

k: Velocidad específica de producción (h⁻¹)

t: Tiempo (h)

7.5.3. Viabilidad

Se determinó sembrando por césped, por triplicado y bajo condiciones asépticas, 200 µL de una suspensión de conidios, en cajas de Petri con SDA al 4% (p/v) más extracto de levadura 0.5 g/L y desoxicolato de sodio 1 g/L, de manera que hubieran 300 conidios por caja. Previamente el pH del medio se ajustó a 6 empleando una solución de ácido clorhídrico 6 N. Las cajas se incubaron a 28 ° C por 4 días. Después de este periodo, se

contó el número de colonias presentes por caja. La viabilidad se calculó dividiendo el número de colonias presentes en cada caja entre el número inicial de conidios, reportándose como % de viabilidad.

7.5.4. Concentración de inóculo

En botellas serológicas de la misma capacidad se colocó 1 g de salvado de trigo más 1 mL de agua destilada, se esterilizaron por calor húmedo. Posteriormente se les agregó 1 mL de CDS al 4 % (p/v) ajustando el contenido de humedad a 66% bajo condiciones asépticas. El substrato se inoculó con 3 concentraciones de conidios (1×10^6 , 7×10^6 y 5×10^7 conidios/g). Las botellas se incubaron bajo las mismas condiciones. Cada día, por triplicado, se extrajeron los conidios, se cuantificaron como se describió con anterioridad. Al séptimo día se les determinó el % de germinación y la hidrofobicidad. Los valores de la cinética de producción de conidios se ajustaron al modelo exponencial, empleando la rutina Solver del software Excel (Microsoft Office).

7.5.5. Hidrofobicidad

Se determinó empleando el método de hidrofobicidad superficial propuesto Shah y col. (2007). El cual está basado en el método de partición de fases (Girardin y col., 1999). Los conidios se suspendieron en una solución de KNO_3 (0.1M) hasta una concentración final de 1×10^7 conidios/mL. La suspensión de conidios (6 mL), se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 2 mL de hexadecano, se agitó por 20 s y se dejó en reposo por 30 min, para permitir la separación de fases, después de lo cual se colectó la fase acuosa y se midió la absorbancia a 660 nm contra un testigo de la solución de KNO_3 . La hidrofobicidad de los conidios se calculó utilizando la relación siguiente:

$$H = 100 * \{1 - Ab/Am\}$$

Donde:

H: hidrofobicidad relativa (%)

Am: absorbancia de la suspensión de conidios en la solución de KNO_3 (nm)

Ab: absorbancia de la fase acuosa excluida del solvente orgánico (nm).

7.5.6. Atmósfera modificada

Se colocó 1 g de salvado de trigo en botellas serológicas de la misma capacidad, se le agregó 1 mL de agua destilada y se esterilizó bajo las mismas condiciones (15 psi, 121 °C, 30 min). El substrato se inoculó con 1×10^6 conidios/g, se le ajustó el contenido de humedad a 66% con agua destilada estéril más CDS, bajo condiciones asépticas. A las botellas se les colocó un septo de hule, se sellaron con Parafilm y se les inyectó, según el tratamiento, mezclas de O₂/CO₂ (21/0, 21/5, 16/5 y 26/0 %) hasta desplazar por completo el aire contenido en las mismas. Las botellas se incubaron por 10 días a 28 ° C. Cada día se extrajeron y cuantificaron los conidios por triplicado, empleando el mismo método descrito. Al resto de las botellas cada día, se les hizo recambio de atmósfera. Al séptimo día se les determinó el % de germinación y la hidrofobicidad, como se describió anteriormente. Los valores de la cinética se ajustaron al modelo exponencial mencionado anteriormente.

7.5.7. Extracción de conidios

Para las fermentaciones con los tres niveles de inóculo y las de atmósfera modificada, los conidios se extrajeron de la siguiente manera: A cada botella se le agregaron 20 mL de una solución de Tween 80 al 0.05 % (v/v), se agitaron por 10 min. empleando un agitador magnético, y se pasaron a través de un filtro de gasa. Posteriormente se filtraron al vacío empleando un papel filtro Whatman N° 1, el filtrado obtenido se diluyó (1:10 ó 1:100, dependiendo de la turbiedad). Los conidios se cuantificaron empleando una cámara de Neubauer en un microscopio óptico con un aumento de 40 X. La concentración de conidios se calculó de la misma forma que para los cultivos en placa.

7.5.8. pH

La medición de pH se realizó directamente en la suspensión obtenida de las muestras de las fermentaciones sólidas. Para realizar las mediciones se utilizó un potenciómetro digital Conductronic pH 120. El potenciómetro se calibró previamente con soluciones amortiguadoras de pH 4.0 y 7.0.

7.5.9. Bioensayos

Se determinó empleando el método propuesto por Matías-Montesinos. (2008), utilizando el estadio de larva de *Tenebrio molitor*. Se estandarizaron las soluciones de conidios a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Se seleccionaron las larvas más activas, sanas, melanizadas de un solo color y procurando el mismo tamaño para garantizar la homogeneidad del material biológico utilizado en el experimento. Cada grupo de 12 larvas fue sumergido en 30 ml de la suspensión de conidios por 15 segundos (Eken y col., 2006; Butt y col., 2000; Goettel e Inglis, 1997). La unidad experimental fue de 12 larvas en cada caja Petri y 4 repeticiones por tratamiento. En el tratamiento control, las larvas se sumergieron en una solución de Tween 80 al 0.05% (v/v) bajo las mismas condiciones.

Se agregó un poco de alimento esterilizado en cada caja. Después se pusieron en una caja de plástico transparente con papel filtro húmedo y sellado con Parafilm y se incubaron a 28 °C con un fotoperíodo de 12:12 h (luz/oscuridad). Se realizaron observaciones todos los días y se registró el número de larvas muertas, retirando los cadáveres de los insectos. Posteriormente, los cadáveres fueron colocados en cámaras húmedas por 5 días para promover la germinación de los conidios y el crecimiento del hongo, esto se realizó con el propósito de corroborar que la muerte del insecto fue debido al hongo y no por otras causas (Tefera y Pringle, 2003).

El tiempo letal 50 (TL₅₀) se calculó ajustando los datos experimentales del incremento en la mortalidad a una ecuación logística, la cual se muestra a continuación:

$$m(t) = \frac{m_{m\acute{a}xima}}{1 + Ce^{-\mu t}}$$

Donde:

μ : Velocidad máxima de mortalidad específica (d⁻¹)

m: Mortalidad (porcentaje de larvas muertas)

$m_{m\acute{a}xima}$: Mortalidad máxima (porcentaje máximo de larvas muertas)

$m_{m\acute{i}nimo}$: Mortalidad mínima (porcentaje de mortalidad al tiempo cero, estimada por el modelo)

t: Tiempo (días)

$$C : \frac{m_{\text{máxima}} - m_{\text{mínimo}}}{m_{\text{mínimo}}}$$

Los valores de la cinética se ajustaron, empleando la rutina Solver del software Excel (Microsoft Office).

7.5.10. Análisis estadístico

A todos los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza empleando el software estadístico NCSS, con un nivel de significancia (α) de 0.05 %.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Efecto de la concentración de etilenglicol sobre la actividad de agua (a_w) de los medios de cultivo

La disponibilidad de agua es uno de los factores ambientales más importantes y limitantes para el crecimiento microbiano. Los microorganismos pueden absorber agua si su potencial interno de agua es menor que el del ambiente. Para reducir el potencial interno, los microorganismos acumulan solutos compatibles (Pascual y col., 2002). Asimismo, la a_w y la temperatura son factores críticos que afectan el crecimiento y metabolismo de los hongos (Parra y col., 2004). Por otro lado, *B. bassiana* requiere de elevados valores de a_w para germinar (Devi y col., 2005). En el presente trabajo la a_w de todos los medios evaluados disminuyó de manera gradual en función del incremento de la concentración de etilenglicol (Fig. 8.1), ajustándose a un modelo lineal. Esta tendencia se observó para todos los medios, los cuales no mostraron diferencias en el intercepto y la pendiente (Tabla 8.1).

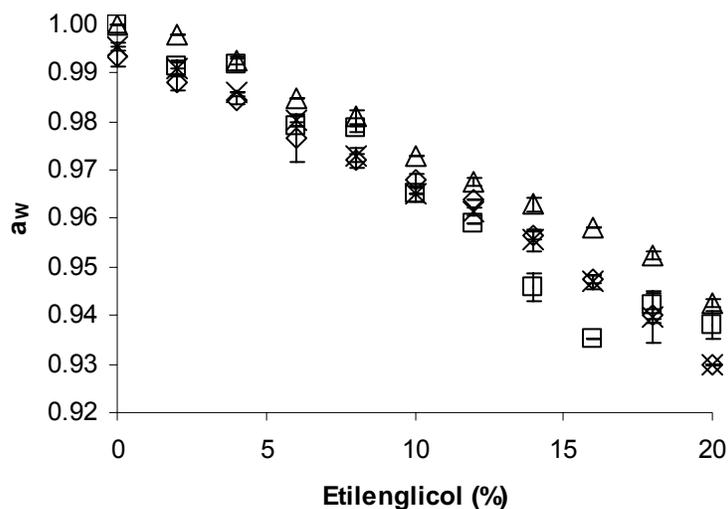


Figura 8.1. Efecto de la concentración de Etilenglicol sobre la actividad de agua Sabouraud Dextrosa al 4% (◇), Papa Dextrosa Agar (□), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (Δ), Quitina coloidal al 1% (X).

Tabla 8.1. Ecuaciones y coeficiente de correlación para el efecto de la concentración de etilenglicol sobre la a_w con diferentes medios. X = concentración de etilenglicol.

Medio de cultivo	Ecuación	R ²
Sabouraud dextrosa 4%	$a_w = -0.003x + 0.9959$	0.9817
Papa dextrosa agar	$a_w = -0.0034x + 1$	0.9487
Alves y col. (2002)	$a_w = -0.0029x + 1.0026$	0.9931
Quitina coloidal 1%	$a_w = -0.0032x + 0.9982$	0.9921

8.2. Método de conservación

En el desarrollo de cualquier investigación o de micoinsecticidas a nivel industrial, un factor determinante es la homogeneidad en la producción de esporas, lo cual se ve afectado por el método de conservación, que asegura la viabilidad del microorganismo por el mayor tiempo posible. El método más conveniente para preservar levaduras y hongos, así como bacterias, es la liofilización. Una de las ventajas que ofrece este método es la viabilidad a largo plazo del microorganismo. (Pascual y col., 2000). Sin embargo, la implementación del mismo es cara y laboriosa. Por lo que conviene buscar alternativas sencillas y económicas para la preservación de las cepas. También, el método de conservación afecta el metabolismo de los microorganismos conservados, siendo importante elegir el que menos influya sobre su fisiología.

En la Fig. 8.2 se muestra el efecto del método de conservación sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana*, la cual fue prácticamente igual (88 $\mu\text{m}/\text{h}$) para los dos métodos de conservación probados. En cuanto a la densidad de esporas (Fig. 8.3) no se observaron diferencias significativas ($t = 0.125$) entre los métodos de conservación, cuyos valores fueron 1.7×10^7 y 1.9×10^7 esporas/ cm^2 , a 4 °C y en Sílica gel, respectivamente. Lo anterior para tiempos de conservación menores a 1 mes, es decir, en este tiempo, cualquiera de los dos métodos evaluados es adecuado. Debido a que uno de los objetivos que se persiguieron en este trabajo fue conservar la cepa el mayor tiempo, con la menor manipulación posible, se seleccionó en un principio el método de conservación en Sílica gel, por las ventajas que ofrecía (Berlanga-Padilla y Hernández-Velásquez, 2003). Sin

embargo, después de 7 meses de conservación con este método la cepa presentó un crecimiento levaduriforme aunado a una disminución en la producción de conidios, lo que coincidió con lo reportado por López-Lastra y col. (2002), quienes mostraron que el método de Sílica gel resultó ser el menos adecuado para la conservación a largo plazo de aislados de *Metarhizium anisopliae* y *Lecanicillium lecanii*. En contraste, los mejores resultados, para estos dos aislados se obtuvieron cuando se conservaron en agua desionizada y en aceite mineral, difiriendo con lo reportado por Berlanga-Padilla y Hernández-Velásquez (2003). Con base en esta evidencia, se conservó la cepa en agua desionizada a 4 °C, durante el trabajo experimental.

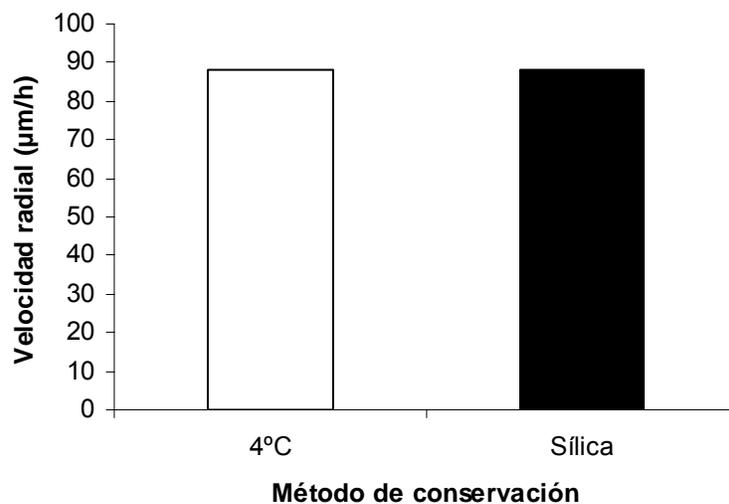


Figura 8.2. Efecto del método de conservación sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana*, (□), conservación a 4 °C (■), conservación en Sílica gel.

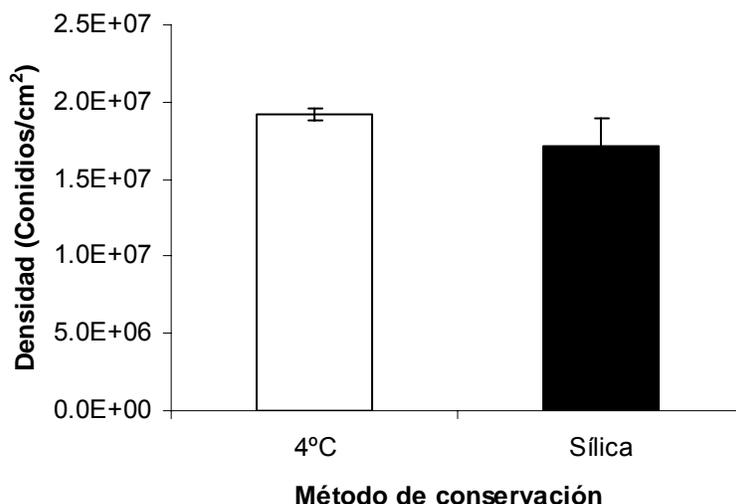


Figura 8.3. Efecto del método de conservación sobre la densidad de conidios de *Beauveria bassiana*, (□), conservación a 4 °C (■), conservación en Sílica gel.

8.3. Cultivo en placa

Una vez seleccionado el método de conservación para la cepa de *Beauveria bassiana*, se evaluó el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y producción de conidios. El crecimiento de los hongos filamentosos puede ser evaluado de manera directa con base en el crecimiento lineal, biomasa fresca o seca, DNA, glucosamina, a la cantidad de algunos constituyentes del micelio, o de manera indirecta con base en las actividades metabólicas, como la actividad respiratoria (consumo de O₂ y liberación de CO₂), formación de productos (ácidos orgánicos o pigmentos), consumo de substrato o actividades enzimáticas específicas (Braga y col., 1999). Asimismo, la virulencia de los conidios de *B. bassiana* esta en función de las condiciones ambientales a las cuales se obtuvieron (Arcas y col., 1999).

8.3.1. Efecto de la composición del medio de cultivo y la actividad de agua (a_w) sobre el crecimiento y esporulación

Los conidios se producen en la etapa final del crecimiento. Pero no se conoce un factor universal que desencadene la conidiación en los hongos, sin embargo, el tipo de nutrientes así como la cantidad disponible de los mismos presentes en el medio, pueden

tener un efecto importante sobre el crecimiento, conidiación y morfología de los hongos entomopatógenos (Kamp y Bidochka, 2002). Tanto la cantidad como la calidad de las esporas pueden ser controladas, mediante la manipulación de los nutrientes presentes en el medio. Lo anterior se ha demostrado para *Colletotrichum truncatum*, para el cual la concentración de carbono y la relación carbono nitrógeno (C:N), influyeron de manera significativa sobre el número de esporas producidas, así como sobre la morfología y eficiencia en el control de malezas (Agosin y col., 1997). Por otro lado, en la producción de lipasas por parte del género *Penicillium*, los mejores resultados se obtuvieron con fuentes de nitrógeno orgánico o con una combinación de fuentes orgánicas e inorgánicas (Lima y col., 2003). Aunado a esto, la actividad de agua es un factor determinante para el crecimiento y esporulación de los hongos filamentosos (Gervais y col., 1988).

8.3.1.1 Velocidad de extensión radial (V_r)

En la Fig. 8.4 se muestra la velocidad de extensión radial para *Beauveria bassiana*, con los medios empleados en función de la a_w , se observó una disminución gradual de la V_r , en función de la disminución de la a_w para todos los medios estudiados. Este comportamiento concuerda con lo reportado para *Trichoderma viride* TS y *Penicillium roqueforti*. (Gervais y col., 1988), *Fusarium* (Santamarina y col., 2003), *Trichoderma* (Kredics y col., 2004) y *Penicillium verrucosum* (Cairns-Fuller y col., 2005). Esta respuesta se atribuye a que con valores reducidos de a_w , cuando se coloca la célula en condiciones de potencial de agua menor al óptimo, la célula adapta su potencial de agua interno, para prevenir la salida pasiva de agua, sintetizando solutos compatibles como azúcares y polioles (Gervais y col., 1988). La mayor V_r se obtuvo con valores de $a_w = 0.998$ y fue prácticamente el mismo valor independientemente del medio, 79, 76, 79, 75 μ /h, para Sabouraud Dextrosa al 4%, Papa Dextrosa Agar, Medio Sintético y Quitina coloidal al 1%, respectivamente. Comparando los valores de V_r en el mínimo valor de a_w , 0.973, se observó que la mayor V_r (21 μ m/h), se obtuvo con Sabouraud Dextrosa al 4%, observándose también disminuciones de 52, 57 y 80 % para los medios Papa Dextrosa Agar, Medio Sintético y Quitina coloidal al 1%, respectivamente. También, se observó que los mayores valores de V_r , se obtuvieron con el medio Sabouraud Dextrosa al 4%, independientemente de la a_w . El valor mínimo de a_w al cual se observa crecimiento

(0.973), es mayor al mínimo reportado (0.85) para *Penicillium verrucosum* (Cairns-Fuller y col., 2005).

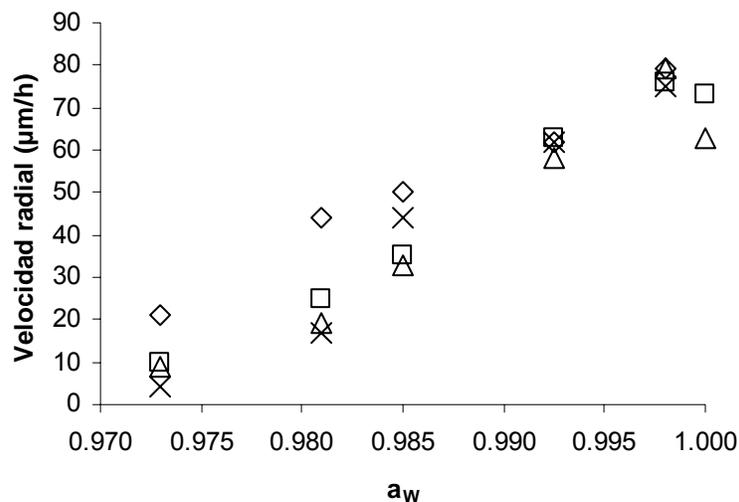


Figura 8.4. Efecto de la actividad de agua sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana*, en los medios Sabouraud Dextrosa al 4% (◇), Papa Dextrosa Agar (□), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (Δ), Quitina coloidal al 1% (X).

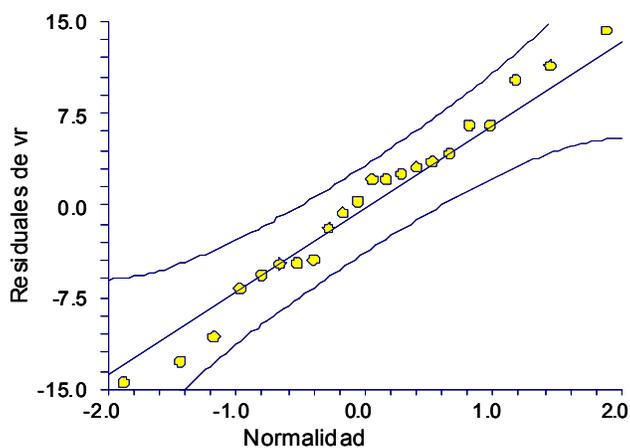


Figura 8.5. Grafica de residuos para la v_r de los diferentes medios evaluados.

En la Figura 8.5 se observa que los residuos de la variable independiente, que es la velocidad de extensión radial de *Beauveria bassiana* en diferentes medios de cultivo (Fig

8.4), se encuentran delimitados en un intervalo de $-1\sigma \pm 1\sigma$, por lo que podemos decir que el supuesto de normalidad se cumple con un nivel de significancia $\alpha < 0.0001$ Además de que los residuos se ajustan a una línea recta y se mantienen contenidos dentro del intervalo de confianza para un modelo de regresión lineal.

8.3.1.2 Producción de conidios

En la Fig. 8.6 se muestra la producción de conidios en función de la a_w para los medios evaluados. De manera general, se observó que la producción de conidios disminuyó en función de la a_w , independientemente del medio. Obteniéndose la mayor producción de conidios con valores de a_w elevados (0.99 a 1) para todos los medios. También, se observó que para intervalos similares de a_w las diferencias en la producción de conidios fueron de hasta un orden de magnitud entre los medios. La máxima producción (3.6×10^9 conidios/caja) se obtuvo con el medio Sabouraud dextrosa al 4% a una $a_w = 0.994$.

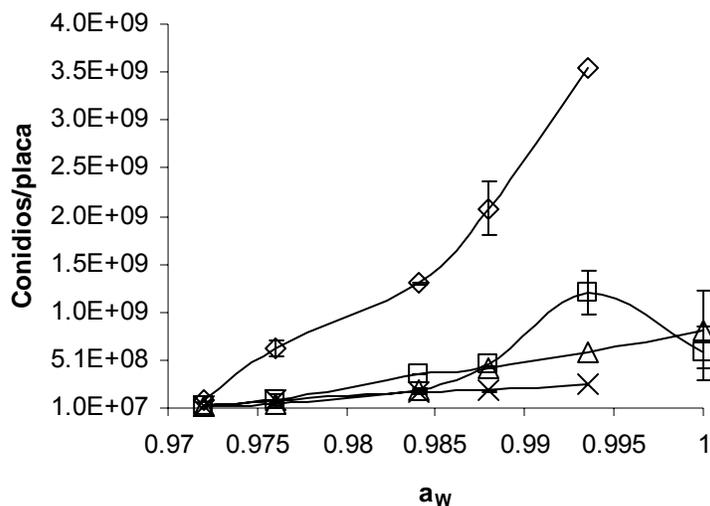


Figura 8.6. Efecto de la actividad de agua sobre la producción de conidios de *B. bassiana*, en función de la actividad de agua, con los medios Sabouraud Dextrosa al 4% (◇), Papa Dextrosa Agar (□), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (△), Quitina coloidal al 1% (X).

Comparando la producción de conidios en los extremos de a_w para cada medio (Tabla 8.2), se observó que el medio con quitina coloidal fue el que mostró menor variación entre

estos extremos, ya que la producción de conidios disminuyó 7 veces, en comparación con el medio Sabouraud, en el cual hubo una disminución de hasta 35 veces. Esto concuerda con lo reportado por Kamp y Bidochka (2002), quienes reportan un crecimiento disperso y una pobre producción de conidios para *B. bassiana* cuando crece en medios con una fuente de nitrógeno simple. Este comportamiento, la reducción en los rendimientos de conidios en función de la a_w , coincide con lo reportado en la literatura para *Penicillium roquefortii* (Larroche y col., 1992).

Tabla 8.2. Producción total de conidios (conidios/placa) en los valores extremos de actividad de agua con los medios evaluados.

Medio	a_w	Conidios/placa	Factor de disminución
Sabouraud 4%	0.994	3.6×10^9	
	0.972	1×10^8	35
PDA	1	5.8×10^8	
	0.979	9.3×10^7	15
Medio sintético	1	8.2×10^8	
	0.973	3×10^7	27
Quitina 1%	0.996	2.6×10^8	
	0.972	3.5×10^7	7

8.3.1.3 Densidad de conidios

De manera general la densidad de conidios disminuyó al decrecer la a_w , sin embargo, con los valores mínimos evaluados, se incrementó, obteniéndose los mayores valores en estas a_w . La máxima densidad (6.9×10^8 conidios/cm²) se obtuvo con el medio con quitina coloidal al 1 % y una $a_w = 0.973$ (Fig. 8.7). Comparando las densidades obtenidas para los medios Sabouraud y PDA, 1.5×10^8 y 2.6×10^7 conidios/cm², para las $a_w = 0.994$ y 1 respectivamente, se observó que la densidad de conidios obtenidos en el medio Sabouraud fue un orden de magnitud mayor de lo reportado por Kamp y Bidochka (2002), mientras la densidad alcanzada en PDA fue del mismo orden de magnitud, comparada con los resultados de estos autores. Sin embargo, existe una discrepancia con ellos, ya que reportaron una densidad de conidios mayor para *B. bassiana* cuando creció sobre

PDA que cuando lo hizo sobre Sabouraud, Esta diferencia podría relacionarse a una particularidad de la cepa empleada en este trabajo.

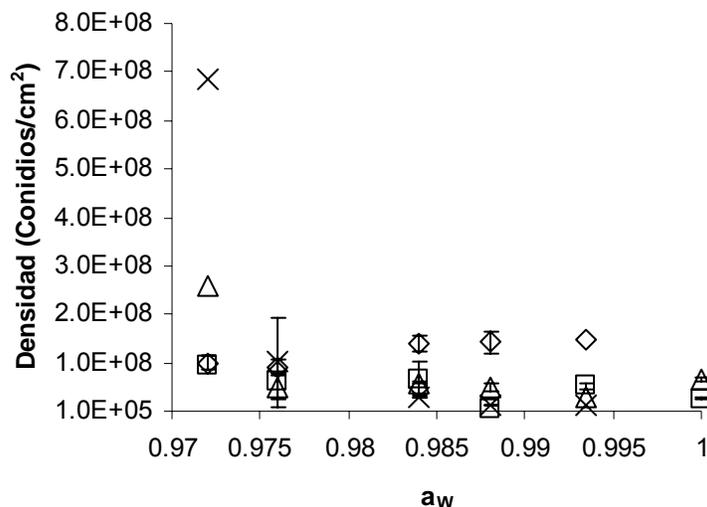


Figura 8.7. Densidad de conidios de *Beauveria bassiana* en función de la actividad de agua, Medios: Sabouraud Dextrosa al 4% (◇), Papa Dextrosa Agar (□), Medio Sintético (Alves y col., 2002) (△), Quitina coloidal al 1% (X).

La composición del medio de cultivo tuvo un efecto determinante sobre los parámetros evaluados, obteniéndose los mejores resultados con los medios complejos. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Kamp y Bidochka (2002), quienes mostraron que *B. bassiana* creció mejor sobre medios de cultivo con fuentes de nitrógeno complejas. Además según Iskandarov y col., (2006), la cantidad de esporas germinadas de *B. bassiana*, junto con el tiempo de germinación y la patogenicidad, se afectaron con las sales inorgánicas presentes en el medio de cultivo, encontrando los mejores resultados con los medios que contenían ioduro de potasio.

8.3.2. Efecto del tiempo de inóculo y a_w sobre el crecimiento y esporulación

Después de evaluar el efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y producción de conidios de *Beauveria bassiana*. Se evaluó el tiempo de inóculo considerando los mismos parámetros, con la finalidad de determinar la relación entre el tiempo del inóculo y la producción de conidios.

8.3.2.1 Velocidad de extensión radial (V_r)

Los máximos valores de V_r (80 y 79 $\mu\text{m/h}$), se obtuvieron con un inóculo de 10 días y valores de $a_w = 1$ y 0.998, respectivamente (Fig. 8.8). Comparando los valores de V_r entre los tiempos de inóculo se observó que los mayores valores se obtienen con el inóculo de 10 días de edad, independientemente de la a_w , excepto para los valores 0.985 y 0.981, en los cuales la mayor V_r se obtuvo con un inóculo de 20 días. Comparando las V_r obtenidas con inóculos de 10 y 30 días en los valores de $a_w = 1$ y 0.998 se observó una disminución de 46 y 56 %, respectivamente. Haciendo la misma comparación en los valores mínimos de a_w (0.985 y 0.981), se observó un cambio en el comportamiento de la cepa (*Bb* 885.2), debido a que la mayor V_r (29 $\mu\text{m/h}$), se obtuvo con inóculos de 20 días a una $a_w = 0.985$, y disminuyó 55 % con $a_w = 0.981$. La velocidad de extensión radial (V_r), disminuyó al decrecer la a_w , independientemente de la antigüedad del inóculo. Estos resultados muestran, la influencia del tiempo de inóculo y la a_w en el crecimiento de *B. bassiana*, lo cual tiene una repercusión para recomendaciones prácticas en sistemas de producción.

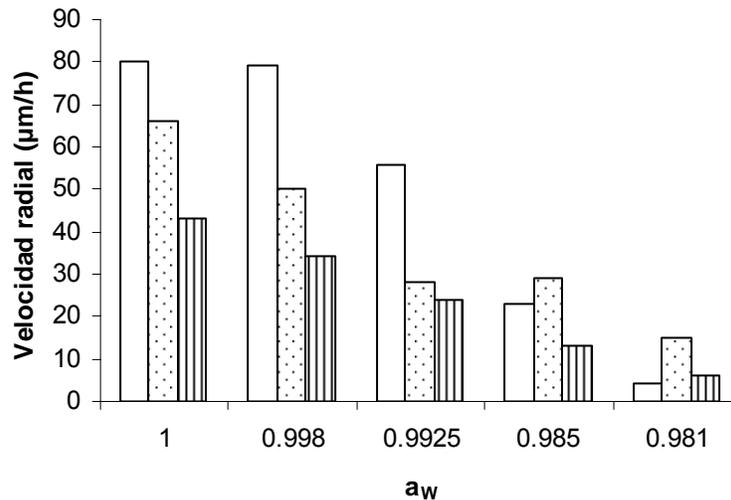


Figura 8.8. Efecto de la actividad de agua y el tiempo de inóculo sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana* (□) 10 días, (◻) 20 días, (▨) 30 días.

8.3.2.2 Densidad de conidios

La densidad de conidios mostró que con valores elevados de a_w (1 y 0.998), las máximas densidades, 1.2 y 1×10^8 conidios/cm² se obtuvieron con inóculos de 10 días (Fig. 8.9), para el resto de valores de a_w , las mayores densidades se obtuvieron con inóculos de 20 días. El comportamiento que se observó para los inóculos de 10 días, fue la disminución en la densidad de conidios en función de la a_w , no se observó un comportamiento definido para las otras dos edades del inóculo. Por otro lado, comparando las densidades de conidios en los valores extremos de a_w , para las edades de inóculo evaluadas, se observaron disminuciones de 82 y 29 % para las edades de 10 y 30 días respectivamente, y un incremento de 58 % para los intervalos de edad restante. Asimismo, la densidad de conidios obtenida con el inóculo de 30 días mostró la menor variación dentro de este intervalo de a_w . Esto puede relacionarse con cambios en la composición de los conidios a lo largo del tiempo. En conidios de mayor edad pueden acumularse osmolitos que incrementen su tolerancia a a_w reducidas. Por otro lado, comparando las densidades obtenidas con los inóculos de 10 y 30 días, con valores de $a_w = 1$ y 0.998, se observaron disminuciones de 48 y 64 %, respectivamente. Con base en los resultados obtenidos se seleccionó un tiempo de inóculo de 10 días, para los siguientes experimentos.

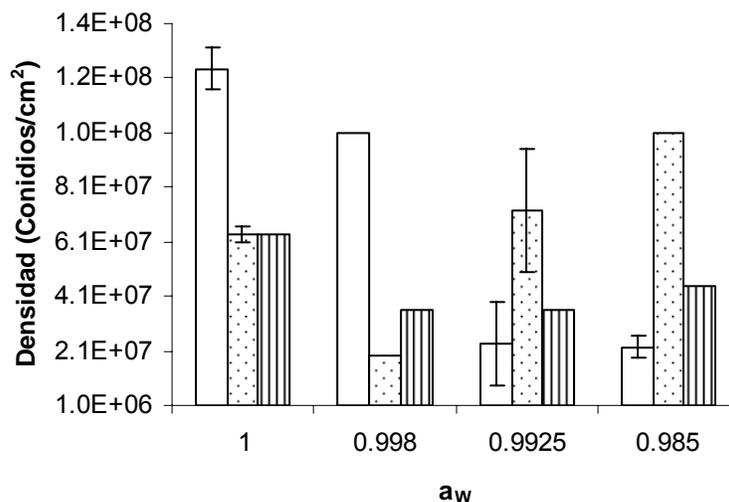


Figura 8.9. Efecto del tiempo de inóculo y la a_w sobre la densidad de conidios de *Beauveria bassiana* en un medio sintético (Alves y col., 2002), (□) 10 días, (◻) 20 días, (▨) 30 días.

8.3.3. Efecto del tiempo de incubación y a_w sobre el crecimiento y esporulación de *Beauveria bassiana*

Los experimentos anteriores se realizaron con cultivos con un periodo de incubación de 16 días, sin embargo, al término de este periodo, la cepa no invadió por completo las placas, sugiriendo que si se incrementaba el tiempo de incubación la cepa seguiría creciendo, por lo que, se evaluó el efecto del tiempo de incubación.

8.3.3.1 Productividad de conidios.

En la Fig. 8.10 se muestra el efecto de la a_w y el tiempo de incubación sobre la productividad de conidios. El máximo valor (9×10^7 conidios/placa/día) se obtuvo con un tiempo de incubación de 30 días cuando $a_w = 1$, representando un incremento de 23 % con respecto al tiempo de 16 d y la misma a_w . Al evaluar la producción de conidios (conidios/placa) en los valores mínimo y máximo de a_w , se observó una disminución de 95 y 89 % para 16 y 30 días de incubación, respectivamente. Por otro lado, comparando la productividad (conidios/placa/día) entre los dos tiempos de incubación en los valores máximo y mínimo de a_w , se observó un incremento de 23 % y 3 veces respectivamente, para 30 días de incubación. Asimismo, la productividad disminuyó en función de la a_w independientemente del tiempo de incubación, obteniéndose mayores valores con un periodo de incubación de 30 días.

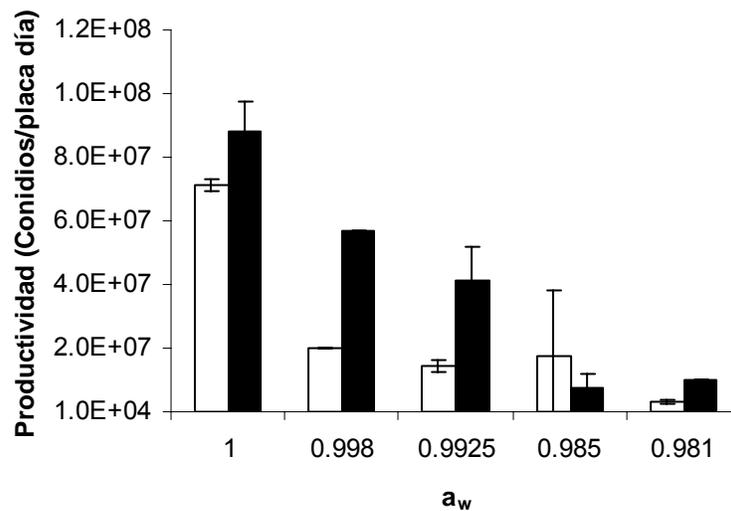


Figura 8.10. Efecto de la actividad de agua y el tiempo de incubación sobre la productividad de *Beauveria bassiana*, en un medio definido (Alves y col., 2002), (□) 16 días, (■) 30 días.

8.3.3.2 Densidad de conidios

La densidad de conidios en función del tiempo de incubación y la a_w , no mostró un comportamiento definido para el periodo de incubación de 16 días. Para el periodo de incubación de 30 días, se observó que la densidad de conidios disminuyó en función de la a_w , excepto para el valor de 0.981 en el cual se obtuvo un incremento de 33 % con respecto al valor anterior (Fig. 8.11). La máxima densidad (6.7×10^7 conidios/cm²) se obtuvo con un tiempo de incubación de 30 días a una $a_w = 1$. Comparando los valores extremos de a_w para los tiempos de incubación se observó un decremento de 16 y 52 % para 16 y 30 días, respectivamente. Por otro lado, comparando las densidades obtenidas para los periodos de incubación para cada valor de a_w , se observaron incrementos de 18, 1 y 67 %, para 30 días, con valores de actividad de agua = 1, 0.998 y 0.993, y decrementos de 49 y 32 % para el resto de los valores. A pesar que con el mayor tiempo de incubación se obtuvieron las mayores productividades y no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que se seleccionó un tiempo de incubación de 16 días para el resto de los experimentos.

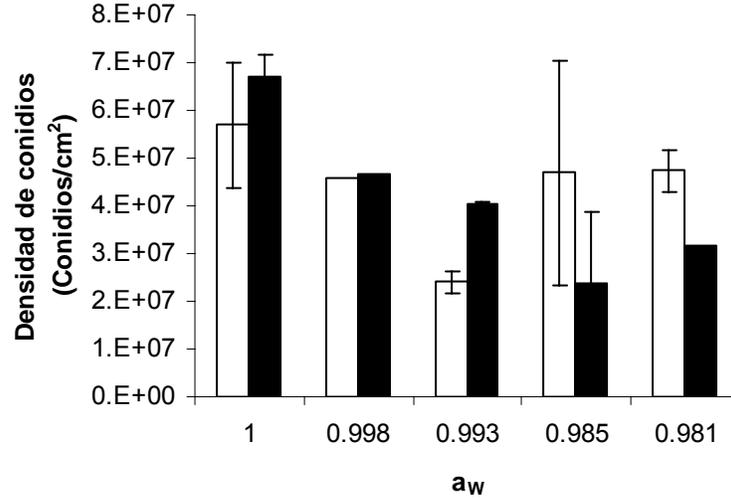


Figura 8.11. Efecto del tiempo de incubación y la actividad de agua sobre la densidad de esporas de *Beauveria bassiana*, en un medio definido (Alves y col., 2002), (□) 16 días, (■) 30 días.

8.3.4. Efecto de la presencia de sales inorgánicas en el medio de cultivo y la a_w sobre el crecimiento y conidiación de *B. bassiana*

Los principales substratos para la producción de conidios de hongos entomopatógenos por fermentación en medio sólido son los subproductos agrícolas, uno de estos es el salvado de trigo, por esta razón y considerando la importancia que tienen los componentes del medio de cultivo sobre el crecimiento y conidiación de los hongos entomopatógenos (Kamp y Bidochka 2002), se evaluó el efecto de la presencia de sales inorgánicas en el medio de cultivo sobre el crecimiento y conidiación de *B. bassiana*, empleando salvado de trigo como fuente de carbono y las sales del medio reportado por Alves y col. (2002).

8.3.4.1 Velocidad de extensión radial (V_r)

El efecto de la presencia de sales inorgánicas en el medio de cultivo y la a_w se muestra en la Fig. 8.12. Comparando las V_r en los extremos de a_w , se observó una disminución del 83 y 77 % para los medios con sales inorgánicas y sin ellas, respectivamente. Asimismo, comparando las V_r entre los dos medios en los valores máximo y mínimo de a_w , se observó un incremento de 7 y 30 % para el medio con sales, respectivamente. La máxima

V_r (98 $\mu\text{m/h}$) se obtuvo en un medio con sales inorgánicas. La V_r disminuyó en función de la a_w , independientemente del medio.

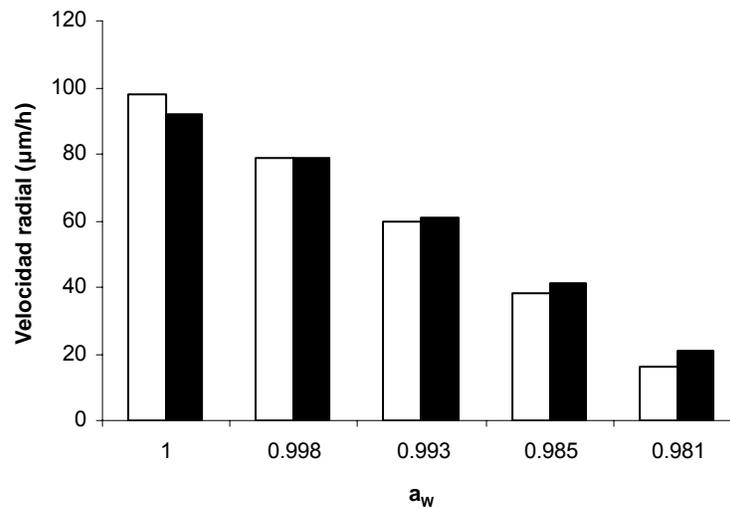


Figura 8.12. Efecto las sales del medio y la actividad de agua sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana* medio con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (■).

Macroscópicamente, se observó un mayor crecimiento con los valores elevados de a_w , independientemente de los medios. También se observaron colonias más definidas y con micelio compacto en los medios adicionados con sales inorgánicas, en contraste con el crecimiento pobre y disperso observado en los medios sin sales inorgánicas (Figs 8.13 y 8.14). Este comportamiento concordó con lo reportado para *Beauveria bassiana* por Kamp y Bidochka (2002), quienes atribuyen este comportamiento a la presencia de sales y de fuentes de nitrógeno complejas, entre las que incluyen a la peptona.

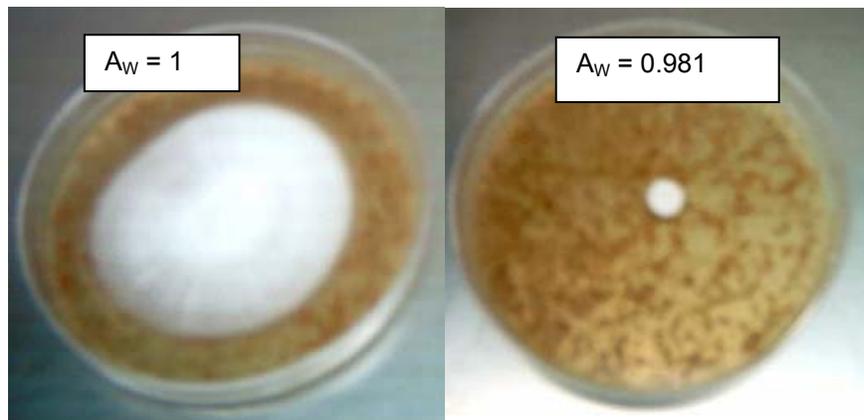


Figura 8.13. Crecimiento de *Beauveria bassiana* en un medio con salvado de trigo y sales inorgánicas en los valores extremos de a_w .

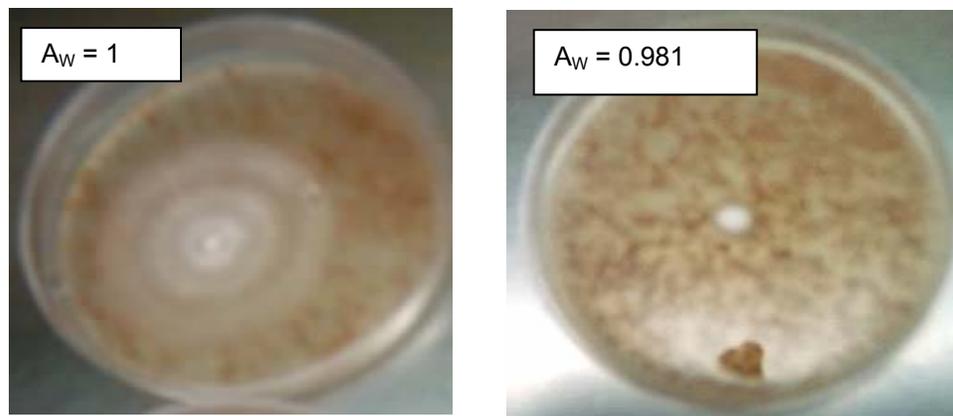


Figura 8.14. Crecimiento de *Beauveria bassiana* en un medio con salvado de trigo sin sales inorgánicas en los valores extremos de a_w .

8.3.4.2 Densidad de conidios

La densidad de conidios (Fig. 8.15) permaneció prácticamente constante para los dos medios en el intervalo de a_w evaluado, excepto para el valor mínimo (0.981), con el cual se obtuvo la máxima densidad de conidios (6.9×10^7 conidios/cm²) en un medio con sales inorgánicas, este valor fue 3 veces mayor (2.3×10^7 conidios/cm²) con respecto al valor obtenido para el mismo medio en el valor máximo de a_w . Los resultados mostraron que las sales inorgánicas presentes en el medio, no afectaron de manera sensible la densidad

de conidios de *B. bassiana*, en el intervalo de a_w evaluado, con excepción del valor mínimo.

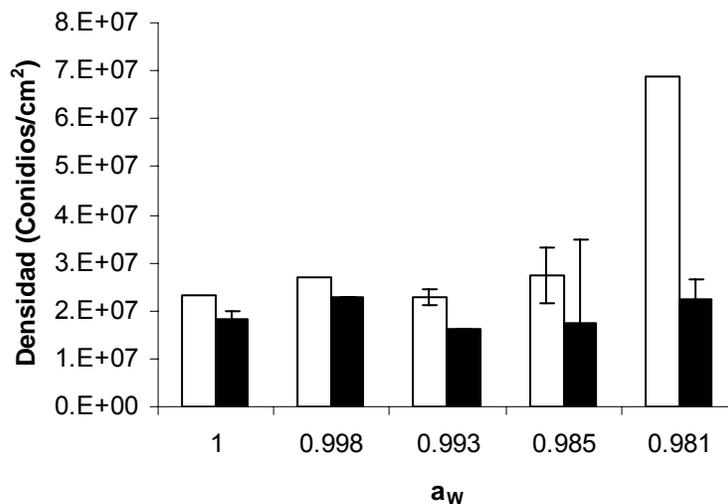


Figura 8.15. Efecto de la composición del medio y la actividad de agua sobre la densidad de conidios medio, con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (■).

8.3.5. Efecto de la temperatura y la a_w sobre el crecimiento y conidiación de *Beauveria bassiana*

La influencia de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento fúngico tiene una gran importancia para comprender la ecología de las diferentes especies, tanto en su comportamiento individual como en sus relaciones ínterespecíficas (Santamarina y col., 2003). *B. bassiana* crece y produce conidios en un intervalo amplio de temperatura comprendido entre 8 y 35° C (Kamp y Bidochka, 2002; Fernández y col., 2008), variando el valor óptimo dependiendo de cada aislado en particular. En este trabajo se evaluaron dos valores de temperatura: 28 y 30 °C elegidos con base a que *Beauveria bassiana* crece en un intervalo amplio de temperatura, de 8 a 35 °C, con un límite máximo de 37 °C (Fernández y col., 2008). A continuación, se muestran los resultados de velocidad de extensión radial (V_r) y densidad de conidios (ρ), para la temperatura de incubación de 30° C en los medios, con salvado de trigo, con y sin sales inorgánicas.

8.3.5.1 Temperatura 28 °C

En la prueba donde se midió el efecto de incubar los medios a 28 °C se evaluó también, el efecto del rastrojo de maíz molido como fuente de carbono con sales inorgánicas y con agar únicamente (Fig. 8.17). La mayor V_r y densidad de conidios se alcanzaron con los medios con sales inorgánicas; los mayores valores de V_r se obtuvieron a $a_w = 1$ y $a_w = 0.998$, lo cual correspondió con lo reportado en la literatura para otros hongos (Gervais y col., 1988). El comportamiento observado para los medios con rastrojo de maíz fue que la V_r disminuyó proporcionalmente con la a_w , obteniéndose la mayor V_r (77 $\mu\text{m}/\text{h}$), en el medio con $a_w = 1$, valor que fue prácticamente igual al obtenido con los medios Sabouraud Dextrosa al 4%, PDA, medio sintético, y medio con quitina coloidal al 1 % (Fig 8.4). También fue similar al obtenido con un inóculo de 10 días, y fue 14 y 18% menor en comparación al obtenido con los medios con salvado de trigo y sales inorgánicas incubados a 30 y 28 °C, respectivamente, y disminuyó 80 % con el valor mínimo de a_w . Macroscópicamente se observó un crecimiento mayor, junto con un micelio compacto y denso, en valores de a_w altos, en el extremo de a_w se observó el mismo crecimiento denso y compacto pero el diámetro de las colonias fue mucho menor (Fig. 8.16).

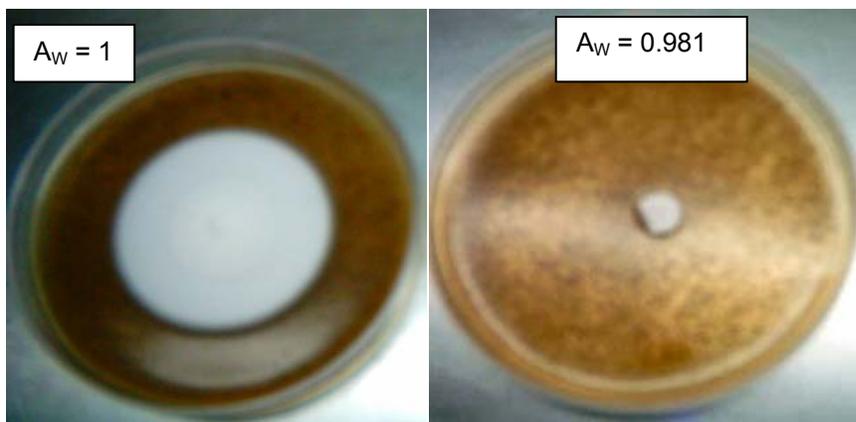


Figura 8.16. Crecimiento de *Beauveria bassiana* en un medio con rastrojo de maíz como fuente de carbono y sales inorgánicas en los valores extremos de a_w .

De manera general los menores valores de V_r se obtuvieron con los medios que contenían rastrojo de maíz como fuente de carbono, independientemente de la a_w . Comparando la

mayor V_r para los tres medios ($a_w = 1$), se observó una disminución de 15 y 6% del medio con rastrojo de maíz en comparación con los medios con salvado de trigo con sales y sin sales inorgánicas respectivamente (Fig. 8.16).

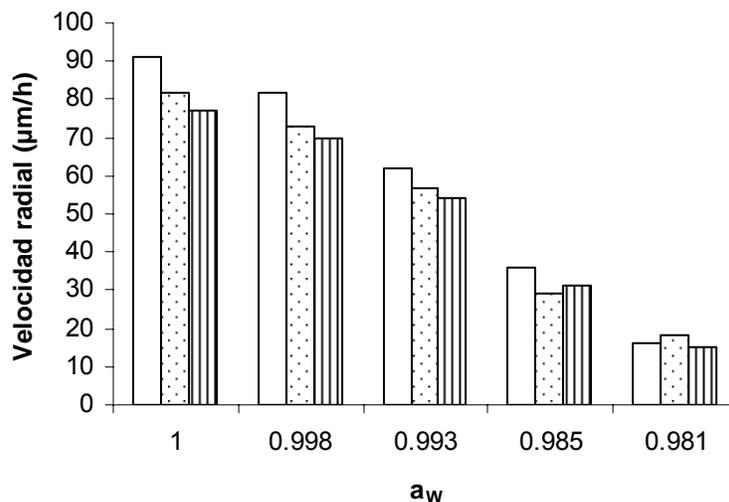


Figura 8.17. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana* incubada a 28 °C, medio con salvado de trigo al 1% y agar con sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (▤), medio con rastrojo de maíz al 1% (▨).

La densidad de conidios para los medios con rastrojo de maíz (Fig. 8.18), se incrementó proporcionalmente a la disminución de la a_w , obteniéndose el máximo valor (7.7×10^7 conidios/cm²) con una $a_w = 0.981$. Este valor fue 72 % mayor con respecto a los medios con salvado de trigo y sales inorgánicas, 60 % mayor al obtenido con el medio sintético, y 9% menor al obtenido con los medios con quitina coloidal al 1%.. La densidad de conidios se incrementó 2 veces cuando la a_w se redujo de 1 a 0.981.

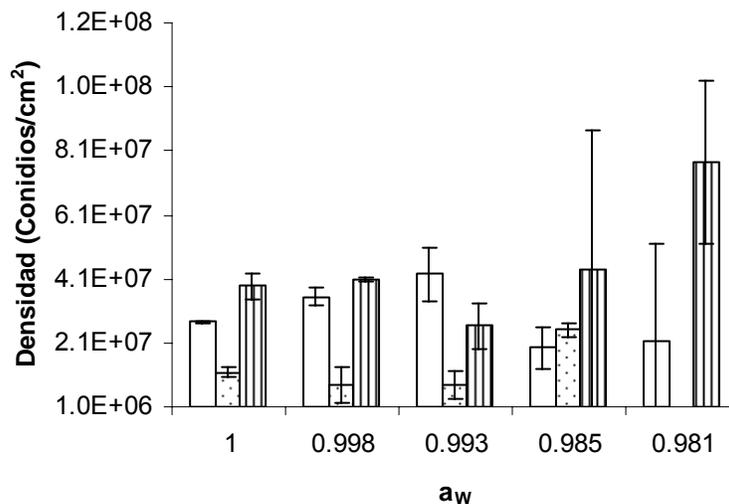


Figura 8.18. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la densidad de conidios de *Beauveria bassiana* incubada a 28° C. medio con salvado de trigo al 1% y sales (□) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales (▨), medio con rastrojo de maíz al 1% (▧).

Con la temperatura de incubación de 28 °C se obtuvieron los mayores valores de crecimiento radial y densidad de conidios, en comparación con 30 °C, coincidiendo con lo reportado por Tefera y Pringle (2003). Estos autores reportaron un mayor crecimiento y geminación de *M. anisopliae* a 25 °C, que a 30 °C. Asimismo *B. bassiana* tuvo una mayor velocidad de germinación alrededor de los 25 °C (Tefera y Pringle 2003; Talaei-Hassanloui y col., 2006). Con respecto a la actividad de agua, el mejor crecimiento de *B. bassiana* con elevados valores de a_w , corresponde con lo reportado por Fargues y Luz., (2000), quienes mostraron que la velocidad de germinación de *B. bassiana* dependió fuertemente de las condiciones de humedad y en menor medida de la temperatura.

8.3.5.2 Temperatura 30 °C

La máxima V_r , 88 $\mu\text{m/h}$ se obtuvo con un medio con sales inorgánicas y con valores de a_w de 1 (Fig. 8.19), y representó un incremento del 14 % en comparación a la obtenida con el medio sin sales inorgánicas a la misma a_w . Este valor de V_r , fue mayor al reportado para los productos comerciales Mycotal (*Lecanicillium muscarium*), 24 $\mu\text{m/h}$, Vertalec (*Lecanicillium longisporum*), 23 $\mu\text{m/h}$, así como para 12 aislados monospóricos de

Lecanicillium muscarium y tres de *Lecanicillium pissodis* (Kope y col., 2008). También fue en promedio 19 % mayor a lo reportado para 6 cepas de *B. bassiana* (Fargues y col., 1997). Sin embargo, los valores obtenidos en este trabajo fueron 23 y 35 % menor a lo reportado por Ekesi y col. (1999) para dos cepas de *B. bassiana* y en promedio 57 % menor a lo reportado por Fargues y col. (1997) para 53 cepas del mismo hongo. Comparando las velocidades en los extremos de a_w , se observó, una disminución del 86% para el medio con sales inorgánicas y de 80% para el medio sin sales inorgánicas. La velocidad radial disminuyó en función de la a_w , independientemente del medio de cultivo, de manera similar a los resultados obtenidos a 28 °C.

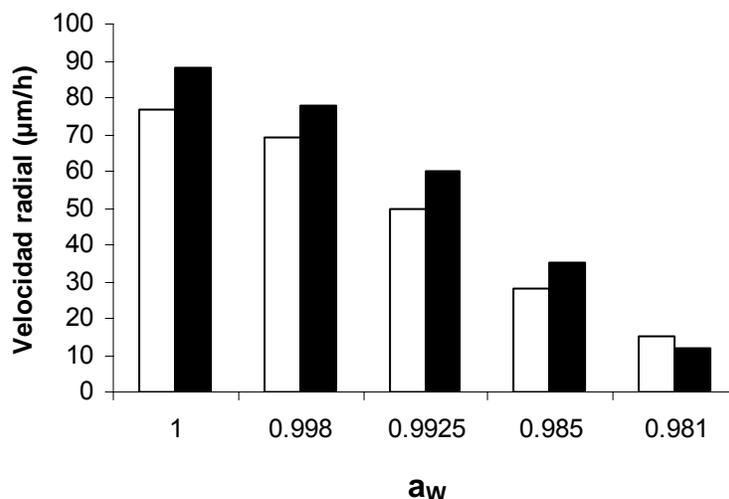


Figura 8.19. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la velocidad radial de *Beauveria bassiana* incubada a 30° C. Medio con salvado de trigo al 1% y sales inorgánicas (■) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales inorgánicas (□).

En cuanto a la densidad de conidios se observó (Fig. 8.20) un incremento inversamente proporcional a la disminución de a_w , independientemente del medio utilizado, la mayor densidad (9.6×10^7 conidios/cm²), se obtuvo con un medio con sales inorgánicas y una $a_w = 0.981$ y representó un incremento de 16 % con respecto a la $a_w = 1$ para el mismo medio. También se observó de manera consistente que el medio con sales inorgánicas

mostró las mayores densidades independientemente del valor de a_w , evidenciando la necesidad de *B. bassiana* por los medios complejos para crecer y producir conidios.

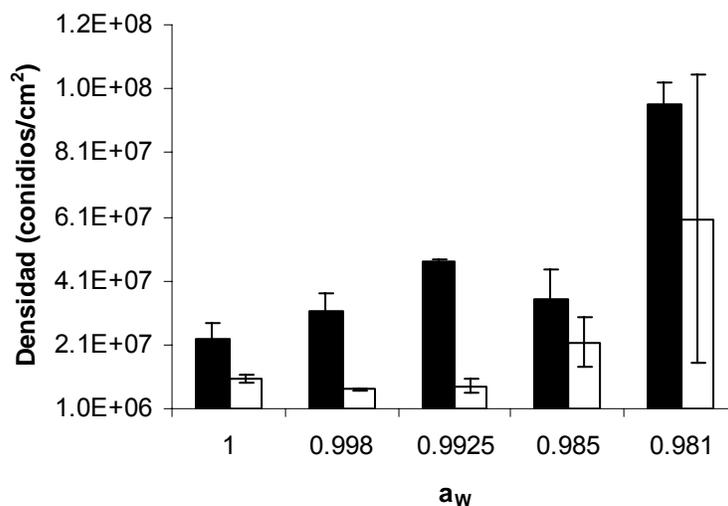


Figura 8.20. Efecto de la actividad de agua y el medio de cultivo sobre la densidad de conidios de *Beauveria bassiana* incubada a 30° C. medio con salvado de trigo al 1% y sales inorgánicas (■) medio con salvado de trigo al 1% y agar sin sales inorgánicas (□).

El uso de salvado de trigo es recomendable debido a que es de manipulación más sencilla que el salvado de maíz o arroz, debido a su bajo contenido de almidón y la rápida absorción de agua (Cavalcante y col., 2008). Asimismo, contiene proteínas, aminoácidos, sales minerales, bioestimuladores y diferentes polisacáridos (Grajek, 1994). Debido a esto y a los resultados obtenidos en las secciones anteriores se determinó emplear salvado de trigo para los experimentos subsecuentes.

8.4. Fermentación en medio sólido (FMS)

8.4.1. Humedad

Los principales substratos para FMS son los subproductos agrícolas, ajustando la humedad entre 50 y 80 %. Con valores de humedad por debajo, se dificulta la difusión de nutrientes hacia el microorganismo, y el crecimiento es mínimo, en contraste con

contenidos de humedad mayores, se dificulta la difusión de oxígeno en el medio, se incrementa la formación de micelio aéreo y se favorece la contaminación por crecimiento bacteriano (Lonsane y col., 1985; Liu y Tzeng, 1999; Pandey, 2003).

El rendimiento de conidios en función de la a_w se muestra en la Fig. 8.21, el valor de a_w con el cual se obtuvo el máximo rendimiento, fue similar al reportado para la producción de conidios de *Lecanicillium lecani* sobre tres substratos, salvado de trigo, remolacha y una mezcla de ambos (Grajek, 1994). El máximo rendimiento de conidios (1.15×10^{10} conidios/gssi), se obtuvo con un contenido de humedad de 66%, y representó un incremento de 71 y 84 % con respecto a los valores de humedad de 75 y 80 %, respectivamente. El porcentaje de humedad al cual se obtuvo el mayor rendimiento de conidios fue 25 % mayor al reportado para la producción de conidios de *Lecanicillium lecani*, empleando salvado de trigo como substrato, y 12 % menor en comparación con los valores reportados para *L. lecani*, creciendo sobre remolacha o una mezcla de remolacha y salvado de trigo (Grajek, 1994). Se observó que la concentración de conidios disminuyó progresivamente en función del incremento del contenido de humedad en el soporte, con una $a_w = 1$.

El máximo rendimiento de conidios alcanzado coincidió con lo reportado para la producción de hongos entomopatógenos con otros substratos agro industriales (Glare, 2004); fue incluso mayor al reportado para la producción de *Lecanicillium lecani* empleando arroz cocido como substrato (Feng y col., 2000), y similar al reportado para *Beauveria bassiana* en un reactor con aireación forzada, empleando una mezcla de harina de papa con bagazo de caña como substrato (Santa y col., 2004). Sin embargo, el tiempo requerido fue menor (6 días), en comparación con lo mencionado en estos trabajos (1 o 2 semanas).

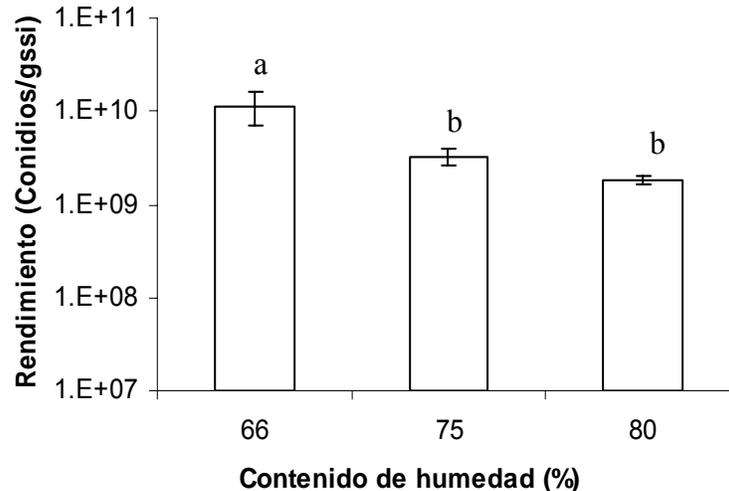


Figura 8.21. Efecto del contenido de humedad del soporte sobre el rendimiento de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido. Las medias con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha= 0.05$) entre ellas.

El análisis de varianza, mostró diferencias significativas ($\alpha= 0.05$), únicamente para la concentración de conidios obtenida con un 66% de humedad. Los resultados resaltaron la importancia del contenido de humedad del sustrato sobre la producción de conidios de *B. bassiana*.

8.4.2. Mezclas de sustratos

Conforme la densidad de empaque aumenta, disminuye el espacio disponible para el crecimiento del hongo e interfiere con la transferencia de los gases (Kang y col., 2005). Este problema se soluciona mezclando sustratos en diferentes proporciones, en donde uno puede ser inerte para el hongo y sirve solo como texturizante. En el presente trabajo se probó al bagazo de caña como texturizante, mezclado con el salvado de trigo, y su efecto en el rendimiento de conidios.

En la Fig. 8.22 se presentan los rendimientos de conidios en función de las mezclas de sustratos evaluadas. El máximo rendimiento (1.15×10^{10} conidios/gssi) se obtuvo con el medio que únicamente contenía salvado de trigo, disminuyendo en función de la

reducción del mismo en las mezclas. El rendimiento obtenido con la mezcla salvado/bagazo 70/30 % (6.65×10^9 conidios/gssi), representó una disminución del 42% con respecto a los rendimientos de los medios sin bagazo. Este resultado fue superior a los reportado, por Feng y col., (2002) para *Lecanicillium lecanii* (1.5×10^9 esporas/g substrato), empleando arroz o fibra de arroz como substrato. También, el resultado del presente trabajo fue mejor a lo reportado por Kang y col., (2005) para *B. bassiana* (4.9×10^8 conidios/g substrato), con una mezcla de salvado de trigo y paja de arroz (70/30%), pero cuando agregaron 10% de polipropileno a la mezcla y la airearon el rendimiento se elevó hasta 1.2×10^{10} conidios/g. Solo se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) para las mezclas con la mayor proporción de salvado de trigo (100/0).

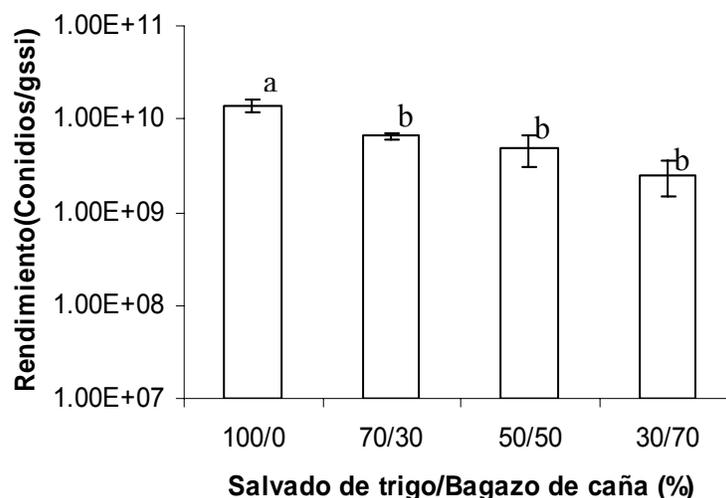


Figura 8.22. Efecto del bagazo de caña como texturizante sobre el rendimiento de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido. Los tratamientos con la misma letra no difieren significativamente ($\alpha = 0.05$).

La disminución en el rendimiento de conidios, proporcional a la disminución de salvado de trigo en las mezclas, pudo deberse a que el hongo no cuente con la maquinaria enzimática para asimilar substratos del tipo del bagazo de caña, lo cual coincide con el hecho de no observarse crecimiento en los medios que solo contenían bagazo de caña.

También, podría atribuirse a problemas difusionales relacionados con el tamaño de partícula, o bien que este soporte nutritivamente sea pobre para la producción de los conidios. Por otro lado, los rendimientos reales (conidios/ g Salvado) no se modificaron sustancialmente, y no se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre substratos (Tabla 8.3), lo que indicaría que este aislado tiene preferencia por el salvado de trigo, lo cual coincidiría con lo reportado por Cavalcante y col., (2008) para *Trichoderma*, quienes crecieron a este hongo sobre arroz, salvado de maíz y salvado de trigo y obtuvieron los mayores rendimientos de esporas con salvado de trigo.

Tabla 8.3. Rendimientos reales (conidios/g Salvado).

g Salvado en la mezcla	Rendimiento (conidios/gssi)	Rendimiento real (conidios/g Salvado)	Desviación estándar
1	1.15×10^{10}	1.15×10^{10}	4.45×10^9
0.7	6.65×10^9	9.50×10^9	7.07×10^8
0.5	4.90×10^9	9.80×10^9	3.68×10^9
0.3	2.50×10^9	8.33×10^9	3.30×10^9

Con base en los resultados anteriores se decidió emplear salvado de trigo únicamente como substrato, con un contenido de humedad de 66% y una actividad de agua de 1, incubado a 28 °C y con un tiempo de inóculo de 10 días, ya que estos parámetros mostraron los mejores rendimientos.

8.4.3. Efecto de la concentración de inóculo

El inóculo inicial fue un factor determinante para obtener rendimientos elevados, (Feng y col., 2000). En la Fig. 8.23 se presenta la cinética de producción de conidios a partir de tres inóculos (1×10^6 , 7×10^6 , 5×10^7 conidios/gssi). Se observó que independientemente del inóculo se alcanzaron rendimientos de conidios similares, tal como lo reporta De Cal y col., (2002), quienes encontraron rendimientos similares de *Penicillium frequentans*, cultivado sobre vermiculita, independientemente del nivel de inóculo, variando únicamente, el tiempo en que esto sucede (285, 232 y 148 h respectivamente). Por otro

lado, la calidad de los conidios es importante puesto que se convierten en los propágulos infectivos. En este sentido, la viabilidad para ambas fermentaciones en el punto donde se alcanzan concentraciones de 1×10^{10} conidios/gssi, fueron de 77.5 (+/- 4.9) 61 (+/- 8.4) y 54 (+/- 1) % respectivamente, estos valores representaron un incremento de 44, 29 y 20 %, con respecto a los reportados para *Lecanicillium lecanii* crecido sobre salvado de trigo (Grajek, 1994) y están dentro del intervalo (60-90%) reportado para *M. anisopliae* (Grimm, 2001). Cabe mencionar que el mínimo valor reportado para formulaciones de *M. anisopliae* es de 90 % (Arcas y col., 1999; Grimm, 2001; Batta, 2007), así como, también esta alejado del % de germinación (90%) después de 90 días de almacenamiento de *Penicillium frequentans* cultivado sobre soporte inerte (De Cal y Col., 2002). Comparando los rendimientos máximos alcanzados con inóculos de 1×10^6 y 5×10^7 conidios/gssi, se observó que con la concentración menor se obtiene prácticamente el mismo rendimiento (1.62×10^{10} y 1.55×10^{10} conidios/gssi, respectivamente), sin embargo, el tiempo al cual sucede esto difiere considerablemente (285 y 148 h, respectivamente).

8.4.4. Modelo

Los datos experimentales para los diferentes niveles de inóculo se ajustaron a un modelo exponencial para los inóculos de 1×10^6 , 7×10^6 y 5×10^7 conidios/gssi. Después de este ajuste se calculo el tiempo en el cual se alcanzó un rendimiento de 1×10^{10} conidios/gssi, definido como t_{10} , y que es una función del nivel de inóculo. En la siguiente tabla (8.4) se presenta la validación del modelo, en ella se observa que todos los valores de F son mayores a uno, lo que significa que los datos experimentales pueden ser explicados por el modelo propuesto.

Tabla 8.4. Validación del modelo exponencial

Nivel de inóculo (conidios/gssi)	Coefficiente de correlación (R^2)	Valor F	Nivel de significancia (α)
1×10^6	0.74	27.04	0.001
7×10^6	0.90	23.65	0.001
5×10^7	0.90	35.46	< 0.001

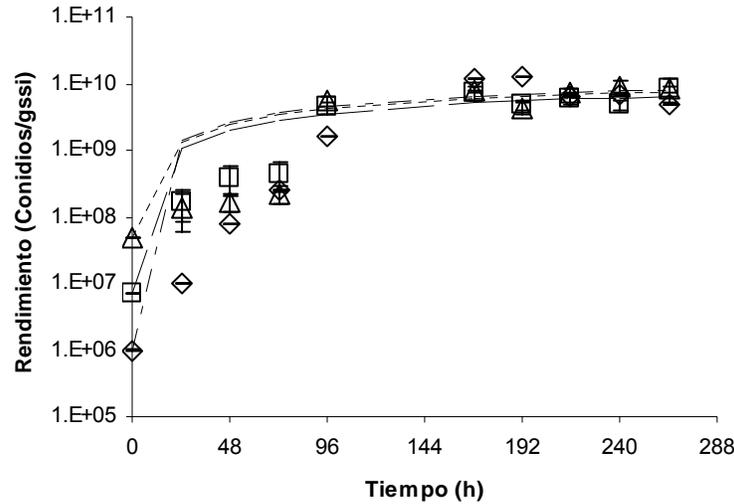


Figura 8.23. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* en función del inóculo, ajustado a un modelo exponencial. (\diamond): 1×10^6 conidios/gssi, (\square): 7×10^6 conidios/gssi, (Δ): 5×10^7 conidios/gssi. Líneas discontinuas: ajuste del modelo exponencial.

Después de ajustar los datos al modelo exponencial se observó una reducción en el tiempo al cual se alcanzaron rendimientos de 1×10^{10} (t_{10}); por ejemplo, t_{10} fue de 285 h con el inóculo más bajo (1×10^6 conidios/gssi) sin embargo, este valor se redujo 20 y 50 % para los otros dos inóculos, esto es que los valores de t_{10} fueron 232 y 148 h con los inóculos 7×10^6 y 5×10^7 conidios/gssi, respectivamente. Cabe destacar que concentraciones de 10^7 conidios son comúnmente recomendadas como inóculos en los cultivos de hongos entomopatógenos (Dalla-Santa y col., 2004; Dalla-Santa y col., 2005; Arzumanov y col., 2005). Este resultado sugiere que t_{10} puede ser un criterio adecuado para definir el mejor tiempo de cosecha para todo un lote, lo cual reduciría los costos de mantenimiento y de proceso relacionados con la producción de conidios por los hongos entomopatógenos.

La velocidad específica de producción de conidios (k), no mostró un comportamiento definido (Tabla 8.5), el mayor valor $4.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, se obtuvo con el inóculo intermedio (7×10^6 conidios/gssi); además de que cuando la concentración de inóculo pasó de 1×10^6 a 5×10^7 conidios/gssi, el valor de k no tuvo variaciones importantes. Estos resultados

indicarían, que el incremento en la concentración de inóculo tuvo un efecto más acentuado sobre t_{10} que sobre la velocidad específica de producción.

Tabla 8.5. Valores de la velocidad específica de producción de conidios (k) para diferentes niveles de inóculo.

Nivel de inóculo (conidios/gssi)	$k \times 10^{-3}$ (1/h)
1×10^6	3.85
7×10^6	4.83
5×10^7	3.94

En cuanto al comportamiento del pH, este parámetro mostró una disminución en las primeras 48 horas de fermentación, alcanzando valores cercanos a 4, incrementándose de manera gradual a partir de las 96 h, hasta alcanzar valores de 7.5 después de las 150 h (Fig. 8.24), el cual permaneció prácticamente constante durante el resto de la fermentación. La disminución en el pH en las primeras horas de fermentación se podría atribuir a la generación de ácidos orgánicos durante el crecimiento de *B. bassiana*; mientras que el incremento hacia el final de la fermentación se podría atribuir a una hidrólisis de proteínas, la producción de algún compuesto alcalino o de proteasas (St. Leger y col., 1999). Este comportamiento se observó independientemente de la concentración de inóculo.

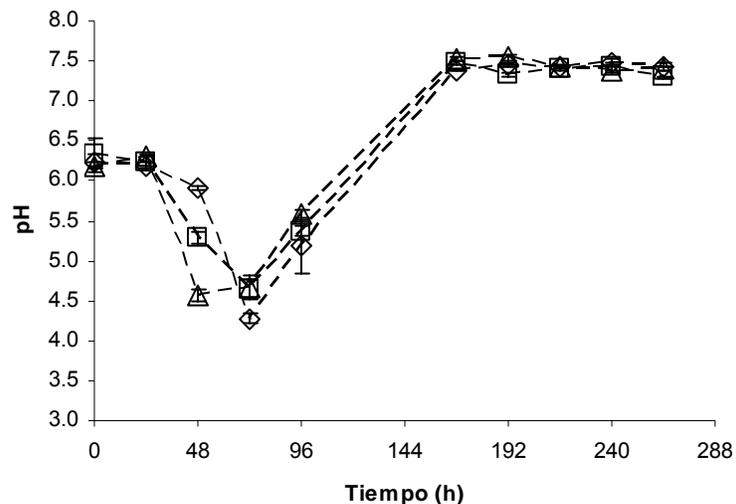


Figura 8.24. Evolución del pH durante la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido. (◇): 1×10^6 conidios/gssi, (□): 7×10^6 conidios/gssi, (Δ): 5×10^7 conidios/gssi.

Los resultados mostraron que independientemente del nivel de inóculo los rendimientos obtenidos fueron prácticamente los mismos (1×10^{10} conidios/gssi), variando únicamente el tiempo al cual sucedía esto, también mostraron que los mejores valores de viabilidad se obtuvieron con los inóculos menores. Debido a esto se decidió emplear un inóculo de 1×10^6 conidios/gssi en los siguientes experimentos del trabajo.

8.5. Atmósfera modificada

Bajo condiciones naturales, los hongos, están sujetos constantemente a estrés físico y químico. Factores externos como la privación de nutrientes, luz, temperatura, radiación ionizante, cambios en la composición gaseosa y presión osmótica del medio, así como el daño mecánico, pueden inducir estrés oxidativo en las células fúngicas y disparar el proceso de citodiferenciación (Belozerskaya y Gessler 2006; 2007). El estrés oxidativo, puede ser definido funcionalmente como un exceso de prooxidantes en la célula con una concomitante alteración en la homeostasis redox a favor de los oxidantes. Este desbalance puede ser debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o a una deficiencia en el sistema antioxidante, cualquier factor interno o externo,

que influya sobre el balance entre la formación intracelular de ROS y los sistemas antioxidantes (Bai y col., 2003). La respuesta al estrés oxidativo, inducida por los factores externos, provoca la formación de radicales de oxígeno, es inestable y seguida por cambios profundos en el metabolismo celular, lo cual puede eventualmente conducir a la muerte celular. El crecimiento se detiene y se observan cambios morfogénéticos en varios estadios de desarrollo de la célula, lo cual es asociado principalmente con la adaptación de la célula a las nuevas condiciones, mediante la disminución de la concentración endógena de oxígeno (Belozerskaya y Gessler 2006).

La diferenciación celular como una respuesta al estrés oxidativo, está basada en la detección de glutamina sintetasa, glutamato deshidrogenasa y otras proteínas oxidadas, así como la oxidación del NAD(P)H y glutatión durante la diferenciación sexual de *Neurospora crassa*; de acuerdo con esta idea, el crecimiento y los estados diferenciados son condiciones estables en los cuales los bajos niveles de ROS, se mantienen por un balance entre la generación de ROS (mitocondria y NOX) y su eliminación (antioxidantes y enzimas). Un cambio entre esos dos estados ocurre, cuando se produce un incremento transiente en los niveles de ROS, mas allá de la capacidad celular de neutralizarlas (Aguirre y col., 2005). Lo anterior concuerda con la teoría general de la diferenciación de la célula eucarionte, que postula que este fenómeno es iniciado por un estado hiperoxidante (estado de estrés oxidativo), el cual induce a las células a restringir la entrada de oxígeno molecular. Esta afirmación es plausible, ya que la gran diversidad microbiana parece seguir los mismos principios generales de controlarlo o evitalo (Georgiou y col., 2006).

Asimismo, un requisito físico para la esporulación en varios hongos es la exposición a una interfase aire-agua, por ejemplo *N. crassa* y *A. nidulans* que no esporulan en medio líquido, solo lo hacen cuando crecen en la superficie del substrato. Se desconoce como persiben estos factores, pero parece ser que el estatus redox y así la concentración de especies reactivas de oxígeno en la célula cambia con la exposición al aire (Fischer y. Kües 2006). También es conocido que el O₂ puede tener efectos tóxicos sobre los microorganismos aeróbicos con presiones parciales ligeramente más elevadas que las del aire 21 % (159 mm Hg) (Bai y col., 2003).

Por otro lado, el papel que el CO₂ cumple en el metabolismo microbiano no es otro que el de substrato biosintético en reacciones de carboxilación o de un producto metabólico proveniente de las reacciones de descarboxilación (durante la producción de etanol o en el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Las reacciones de carboxilación son particularmente importantes para la gluconeogénesis durante el crecimiento sobre substratos con un bajo número de carbono (etanol, acetato) y para la síntesis de precursores biosintéticos particulares, amino ácidos y ácidos nucleicos. La remoción excesiva del CO₂ del medio ocasiona bajos niveles de este gas en el medio intracelular, resultando en la disminución del crecimiento y en formas morfológicamente aberrantes (elongación celular, cesación de la replicación) (Jones y Greenfield 1982).

8.5.1. Cinética de crecimiento atmósfera normal

La cepa (Bb 885.2) presentó una fase exponencial de alrededor de 100 h (Fig. 8.25), después de la cual alcanzó los rendimientos máximos, permaneciendo prácticamente constantes después de este punto. Este comportamiento difiere de lo reportado para *Lecanicillium lecanii*, el cual mostró una fase lag de aproximadamente 48 h en fermentación líquida (Feng y col., 2000), pero coincidió con lo reportado por Braga y col. (1999) para *Metarhizium anisopliae*, el cual explicaron por la presencia en el medio de cultivo o la liberación de algún inductor (péptido, aminoácido o una combinación de aminoácidos), debido a la hidrólisis de la peptona caseína, el cual, redujo considerablemente el trabajo de biosíntesis, reduciendo la duración de la fase e incrementando la velocidad de crecimiento en los medios que contenían caseína.

El máximo rendimiento alcanzado fue de 1×10^{10} conidios/gssi, en este sentido en la tabla 8.6 se presenta una lista comparativa de los rendimientos para diferentes hongos sobre diferentes substratos. El valor obtenido en este trabajo se encuentra entre los mayores rendimientos reportados para los hongos entomopatógenos, por otro lado, el tiempo en cual se alcanzó este rendimiento con un inóculo de 5×10^7 (6 días), fue la mitad al reportado para la producción de conidios de *B. bassiana* en fermentación sólida, con un inóculo similar (Santa y col., 2004).

Tabla 8.6. Rendimientos de hongos empleados en el control biológico, con diferentes sustratos.

Cepa	Substrato	Rendimiento conidios/gs	Referencia
<i>Trichoderma harzianum</i>	Yuca	1.0×10^{10}	Roussos y col., (1991)
<i>B. bassiana</i>	Cascarilla de arroz	$3.7 \text{ y } 1.3 \times 10^{10}$	Arcas y col., (1999)
<i>Metarhizium spp</i>	Arroz	1.5×10^9	Cherry y col., (1999)
<i>B. bassiana</i>	Arroz	5×10^9	Grimm, (2001)
<i>M. anisopliae</i>	Arroz	8×10^8	Grimm, (2001)
<i>M. flavoviride</i>	Arroz	1.5×10^9	Jenkins y col., (1998)
<i>B. bassiana</i>	Arcilla impregnada	$1.5 \text{ y } 2.5 \times 10^9$	Desgranges y col., (1993)
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Salvado de trigo	3.0×10^9	Grajek, (1994)
<i>L. lecanii</i>	Remolacha	1.6×10^9	Grajek, (1994)
<i>L. lecanii</i>	Salvado de trigo remolacha	3.2×10^9	Grajek, (1994)
<i>Coniothyrium minitans</i>	Avena	5.1×10^9	Jones y col., (2004)
<i>C. minitans</i>	Cañamo	8.1×10^9	Jones y col., (2004)
<i>C. minitans</i>	Cañamo	9.2×10^9	Jones y col., (2004)
<i>C. minitans</i>	Cañamo	6.4×10^9	Jones y col., (2004)
<i>T.harzianum.</i>	Salvado de Trigo	28.30×10^8	Calvacante y col., (2008)
<i>T.viride</i>	Salvado de Trigo	24.10×10^8	Calvacante y col., (2008)
<i>T. koningii</i>	Salvado de Trigo	8.85×10^8	Calvacante y col., (2008)
<i>T. polysporum</i>	Salvado de Trigo	6.50×10^8	Calvacante y col., (2008)
<i>B. bassiana</i>	Residuos de papa y bagazo de caña	1.07×10^{10}	Santa y col., (2004)

8.5.2. Cinética de crecimiento atmósfera modificada

El incremento en la respiración de los microorganismos podría favorecer la generación de ROS. Una manera sencilla de lograr esto en fermentación líquida es inyectar aire enriquecido con oxígeno dentro del reactor. Así se incrementa el flujo de electrones mediante la cadena respiratoria en la mitocondria, esto si hay suficiente carbono en el sustrato (Bai y col., 2003).

En una serie de experimentos para producir conidios en este trabajo, la atmósfera se modificó después de 72 h, una vez que el micelio invadió el soporte (Fig. 8.26). La producción de conidios mostró comportamientos distintos para todas las atmósferas evaluadas (21/0, 26/0, 21/5, 16/5 %), por un lado con la mezcla O₂/CO₂ (26/0 %) se obtuvieron rendimientos similares (1×10^{10} conidios/gssi) a los obtenidos con una atmósfera normal (21/0 %). Está reportado en la literatura que el estrés oxidativo desencadena los procesos de diferenciación en los hongos (Belozerskaya y Gessler 2006; 2007; Aguirre y col., 2005; Georgiou y col., 2006; Hansberg y col., 1993), con base en esta información se esperaría que el tratamiento con la atmósfera enriquecida con O₂, mostrara los mayores rendimientos o el tiempo en el cual se alcanzaran estos se redujera en comparación de la atmósfera normal, sin embargo estos dos parámetros (tiempo y rendimiento) fueron similares entre ambos tratamientos, lo que indica que *B. bassiana*, no logró limitar la entrada del oxígeno ambiental en este tratamiento (26/0 %), alcanzando un estado diferenciado, ya que este estado es una condición fisiológica que le permite a la célula mantener su estabilidad mediante la limitación de la entrada de O₂ ambiental. Un estado diferenciado terminal, es aquel que le permite a la célula limitar más la entrada de oxígeno ambiental bajo condiciones naturales, algunos estados diferenciados intermedios (esclerocios, agregados celulares) son muy estables pero no son estados diferenciados terminales, porque no pueden germinar. Estos estados diferenciados son estables y es por esto que exhiben crecimiento. Sin embargo, solo pueden producir una cantidad limitada de energía, la cual es parcialmente utilizada para mantener la restricción de O₂ externo. Debido a esto, la célula puede morir o autolisar parcialmente sus sistemas o agregados, para proveer substratos para el crecimiento o diferenciación (Georgiou y col., 2006). Este fenómeno se observó como la desaparición del micelio en este tratamiento hacia el final de la fermentación (Fig. 8.25).

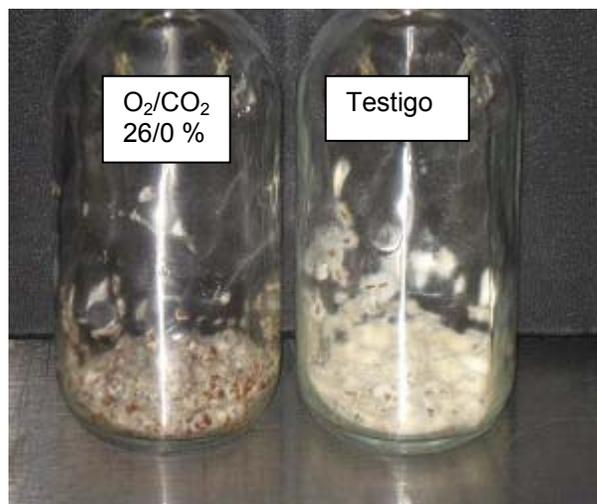


Figura 8.25. Comparación del crecimiento de *Beauveria bassiana* después de 10 días de fermentación con una mezcla gaseosa O₂/CO₂ 26/0 %.

Se ha comprobado la inhibición del metabolismo a elevados niveles de dióxido de carbono (pCO₂ por arriba de 0.05 a 0.1 atm), la extensión de la inhibición está en función de la temperatura y presión, con el decremento de la temperatura y el incremento en la presión, incrementan la solubilidad del gas en el medio de fermentación, incrementando la inhibición. La cual es más acentuada en la presencia de solutos como glucosa y etanol, en un medio complejo más que en uno simple, se requiere una concentración menor de CO₂ para inhibir el crecimiento y la actividad metabólica (Jones y Greenfield 1982).

Para las mezclas gaseosas, 21/5 %, 16/5 % se observó, que el rendimiento de conidios, permanece prácticamente constante después de la modificación de la atmósfera. La máxima producción de conidios para la mezcla 21/5 % (1.4×10^9 conidios/gssi) fue de un orden de magnitud menor (1×10^{10} conidios/gssi) al observado con una atmósfera normal y con la mezcla 26/0 %, y de aproximadamente dos órdenes de magnitud (5.8×10^8 conidios/gssi) para la de 16/5 %. La reducción en la producción de conidios en función del incremento de la concentración de CO₂ en la mezcla gaseosa, difiere con lo reportado por Desgranges y Durand (1990), quienes reportan que el incremento en la pCO₂ involucra un descenso rápido en la conidiación, de hecho con un valor de 2 % de CO₂, la conidiación de *T. viride* TS prácticamente se inhibió. Sin embargo, las cepas de *Aspergillus* mostraron diferente sensibilidad, principalmente para *Aspergillus niger* S5 la conidiación se

incrementó aproximadamente 17 % con 2 % de CO₂, las cuales mostraron conidiación con 10 y 20% de CO₂, en la atmósfera gaseosa en FMS, y con lo encontrado en trabajos previos para una cepa de *Aspergillus niger* la cual creció y conidió con una atmósfera gaseosa O₂/CO₂ de 16/5 % (Nuñez-Gaona 2004). También difiere de lo reportado por Han y Nout (2000) y por Soccol y col. (1994), quienes reportan un efecto estimulante para el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* con una concentración de este gas de 5-10 %. La esporulación *Penicillium sp* se inhibe con valores de pCO₂ de 0.05 a 0.2 atm, pero el crecimiento generalmente no se ve afectado en este intervalo (Jones y Greenfield 1982), lo cual concuerda en parte con los resultados de este trabajo, ya que el crecimiento de *B. bassiana* sí se vió afectado por el incremento de CO₂ en la atmósfera. La concentración de CO₂ empleada en este trabajo, 5 %, es similar a la concentración inhibitoria (7.5 %) para el crecimiento de *Aspergillus niger* en cultivo continuo (McIntyre y McNeil 1997).

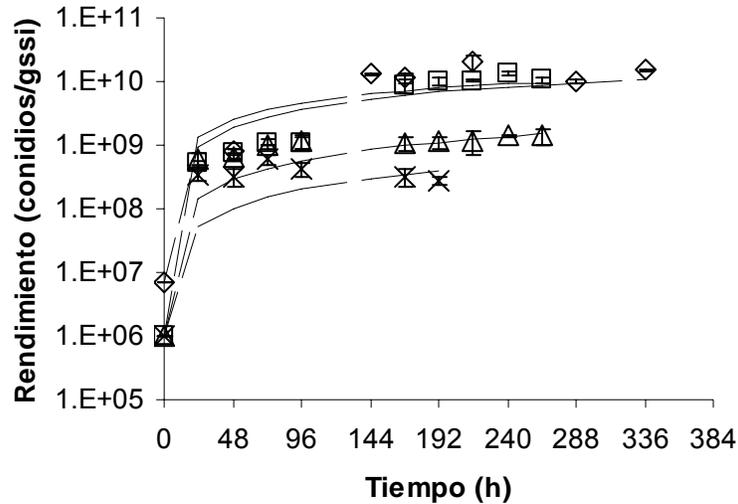


Figura 8.26. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido con atmósfera modificada O₂/CO₂ (%), (◇): 21/0, (□): 26/0, (Δ): 21/5, (X): 16/5 Líneas discontinuas: ajuste del modelo exponencial.

Después de ajustar los datos al modelo exponencial se calculó la velocidad específica de producción de conidios (**k**), la cual se incrementó aproximadamente cuatro veces con respecto al valor de la atmosfera normal (21/0 % O₂/CO₂), cuando la atmósfera se

enriqueció con O₂ (Tabla 8.7). En contraste, cuando se aumentó la concentración de CO₂ en la mezcla gaseosa, el valor de **k** disminuyó de 54 y 84 % para las mezclas de O₂/CO₂ 21/5 y 16/5, respectivamente, lo que es una medida cuantitativa del efecto tóxico por CO₂ sobre la velocidad específica de producción de conidios para *B. bassiana*.

Tabla 8.7. Velocidad específica de producción de conidios (**k**) para distintas mezclas gaseosas.

Atmósfera O ₂ /CO ₂ (%)	k x 10 ⁻³ (1/h)
21/0	1.33
26/0	3.83
21/5	0.61
16/5	0.21

Macroscópicamente se observó, para las mezclas con CO₂, una disminución en la cantidad de micelio en función del tiempo, desapareciendo prácticamente hacia el final de la fermentación en la mezcla 16/5 % (Fig. 8.27). En cuanto a la viabilidad se pudo observar que este parámetro también se vió afectado por la atmósfera, ya que los valores más elevados de viabilidad se obtuvieron antes de la aplicación de la mezcla gaseosa, asimismo no se observó un comportamiento definido en este parámetro. Los valores de viabilidad obtenidos en los puntos de mayor rendimiento fueron de 73, 58, 44, y 39 % para las mezclas O₂/CO₂ (%) 21/0, 26/0, 21/5 y 16/5, respectivamente.

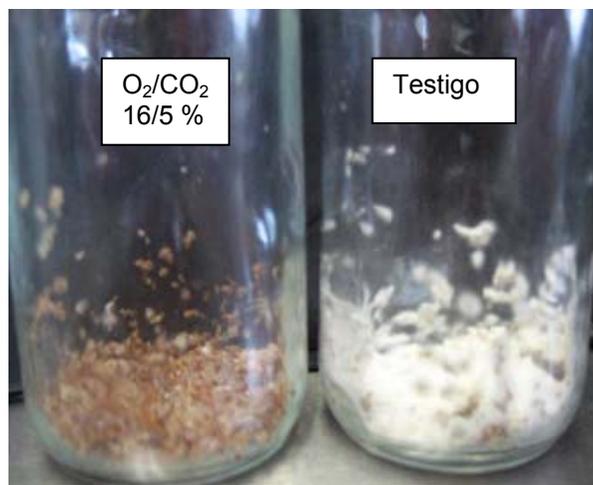


Figura 8.27. Comparación del crecimiento de *Beauveria bassiana* entre el tratamiento y el testigo después de 10 días de fermentación con una mezcla gaseosa O₂/CO₂ 16/5 %.

El comportamiento observado cuando se incrementó la concentración de CO₂ en la atmósfera gaseosa fue la interrupción del crecimiento y la posterior lisis celular, lo cual se atribuye a los efectos del CO₂ sobre la membrana celular, ya que se ha reportado que causa la disminución en las tasas de crecimiento por alterar la fluidez de la membrana y afecta los mecanismos de transporte de la misma, dando como resultado la disminución en la velocidad de asimilación del sustrato. Con niveles elevados de CO₂ se presenta el fenómeno de aletargamiento (dormancy), que es un proceso que tiene su sitio primario de acción en la fase lipídica de la membrana, la absorción de un agente aletargante en la membrana biológica causa una región hidrofóbica que se expande más allá de un tamaño crítico, lo cual puede alterar la actividad funcional de las proteínas y causa cambios en la fluidez de la membrana (McIntyre y McNeil 1997). Este fenómeno puede ser de dos tipos: el aletargamiento constitutivo, que es un estado reversible de hipometabolismo, el cual resulta de la presencia de auto-inhibidores, barreras para la penetración de nutrientes o bloqueos metabólicos; y el aletargamiento exógeno, el cual puede manifestarse y mantenerse por un medio insuficiente, estos dos tipos pueden ser similares fisiológica y bioquímicamente. La evidencia sugiere que el CO₂ indirectamente inhibe la actividad de la succínico deshidrogenasa induciendo un bloqueo metabólico y manteniendo el aletargamiento de las esporas de *Agaricus* (Dahlberg y Van Etten 1982). También, la reducción en la biomasa de *P. chrysogenum* se atribuyó a la presencia de formas morfológicas alteradas (hifas hinchadas), que se presentaron con niveles elevados de CO₂, lo cual se atribuyó a los efectos del CO₂ sobre las propiedades de transporte de las membranas celulares. En la célula el CO₂ se disuelve en el medio acuoso para formar ácido carbónico (H₂CO₃), este proceso puede neutralizar la carga de la membrana interna, causando así la disrupción de la misma, también puede causar cambios en el pH intracelular, pudiendo ser suficiente para alterar el equilibrio enzimático interno (McIntyre y McNeil 1997).

Para las atmósferas estudiadas, el valor del pH disminuyó de manera gradual dentro de las primeras 96 h (Fig. 8.28), el comportamiento fue similar al observado en las fermentaciones con atmósfera normal, sin embargo, dependiendo de la composición de la mezcla gaseosa fue la pendiente y los valores de pH alcanzados. La pendiente más pronunciada y el menor valor de pH (4.32) se obtuvieron con la mezcla de 26 % de oxígeno sin CO₂, mientras que la mezcla que presentó la menor pendiente fue la que

contenía la mayor concentración de CO₂. Este comportamiento puede deberse a que con un incremento en la concentración de O₂ en la atmósfera se estimuló la producción de ácidos orgánicos.

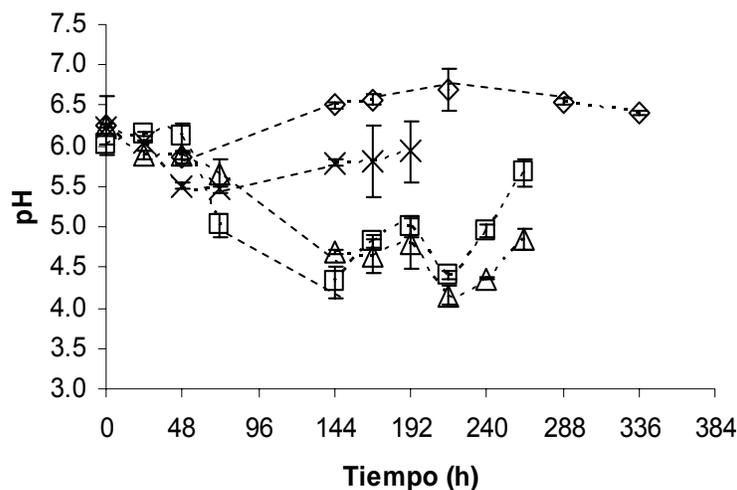


Figura 8.28. Evolución del pH durante la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido con atmósfera modificada O₂/CO₂ (%), (◇): 21/0, (□): 26/0, (Δ): 21/5, (X): 16/5.

Se observó que la producción de conidios de *B.bassiana* obtenidos por FMS con salvado de trigo fue muy sensible al incremento de O₂ y CO₂ en la atmósfera gaseosa. Las mezclas gaseosas evaluadas resultaron tóxicas para el hongo, debido a que después de su aplicación se detuvo el crecimiento y se observó destrucción del micelio, la cual fue más acentuada en los tratamientos con mayor porcentaje de CO₂. Con base en los resultados obtenidos se evaluó la virulencia de los conidios producidos con las distintas atmósferas, buscando obtener una correlación entre este parámetro y la modificación de la atmósfera gaseosa.

8.6. Bioensayos

En esta etapa, el aislado se probó sobre larvas de *Tenebrio molitor*, siguiendo la metodología propuesta por Montesinos-Matías (2008). Los parámetros medidos fueron:

mortalidad máxima, tiempo letal 50 (TL₅₀), y velocidad específica de muerte (Tabla 8.8). En la Fig. 8.29 se muestra la mortalidad para las mismas larvas bajo las mismas condiciones, se observó que la mortalidad máxima alcanzada fue de 52 % ± 4.8, con un tiempo letal 50 (TL₅₀) de 16.9 d ± 3.8, asimismo estos valores mostraron una buena correlación con el modelo empleado. El valor de mortalidad máxima fue 46 % menor al reportado para el mismo aislado por Montesinos, (2008), esta diferencia en la mortalidad se puede atribuir a la diferencia en los medios de cultivo, o a la virtual pérdida de virulencia de la cepa, asimismo el TL₅₀ mostró un incremento de 11 días con respecto a lo reportado por el mismo autor, siendo mayor al tiempo máximo reportado (8.9 d) para *B. bassiana* sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Safavi y col., 2007).

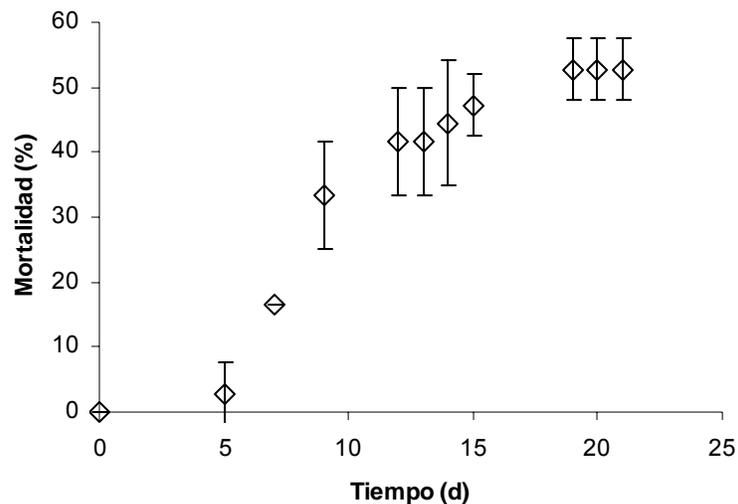


Figura 8.29. Curva de mortalidad para larvas de *Tenebrio molitor* tratadas con conidios de *Beauveria bassiana* cultivados en FMS bajo una atmósfera normal.

Tabla 8.8. Resumen de parámetros para el bioensayo con larvas de *Tenebrio molitor* tratadas con conidios de *Beauveria bassiana* cultivados en una atmosfera normal.

Parámetro	Valor
Mortalidad máxima (%)	52.8 ± 4.8
Velocidad específica de muerte (d ⁻¹)	0.15 ± 0.04
TL ₅₀	16.9 ± 3.8

RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de viabilidad e hidrofobicidad de los conidios al inicio del bioensayo fueron $79.7 \% \pm 6.12$, y $87 \% \pm 0.79$, estos valores fueron mayores a los reportados para el mismo aislado (68 y 82 %, respectivamente) por Montesinos, (2008). Estos resultados, implicarían que la virulencia de este aislado en particular fue independiente de la hidrofobicidad relativa y del porcentaje de germinación y se vio afectado por el medio de cultivo puesto que en el trabajo previo de Montesinos-Matias (2008) los conidios se obtuvieron a partir de un medio de Agar Maltosa Sabouraud al 2% mas 3 % de avena en un tiempo de cultivo de 10 días

La modificación de la atmósfera tuvo un efecto negativo sobre la virulencia de los conidios de *B. bassiana*, puesto que para ningún tratamiento se alcanzó como mínimo el 50 % de mortalidad, los valores obtenidos fueron del orden del 20 % o menores. Los valores de hidrofobicidad relativa y de viabilidad se muestran en la Tabla 8.9. Se observó que no existió alguna correlación entre la hidrofobicidad y la viabilidad, pues aun cuando se obtuvieron prácticamente los mismos valores de hidrofobicidad para las mezclas de O₂/CO₂ 26/0, 21/5, la viabilidad tuvo una reducción de 7 %. Los menores valores de hidrofobicidad se obtuvieron con la mezcla que contenía la mayor concentración de CO₂, explicando en parte la disminución en la mortalidad comparada con la de los conidios obtenidos con atmósfera normal. Solo se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre las mezclas con mayor concentración de CO₂ y la atmósfera normal.

Tabla 8.9. Hidrofobicidad relativa (%) y viabilidad (%) para los conidios de *Beauveria bassiana* obtenidos por FMS con distintas atmosferas. La desviacion estándar se muestra entre paréntesis.

Distintas letras difieren significativamente ($\alpha = 0.05$)

Mezcla O ₂ /CO ₂ (%)	Hidrofobicidad relativa (%)	Viabilidad (%)
21/0	87 (0.79) a	79 (6.12) a
26/0	70.6 (2.57) b	73.4 (2.16) a
21/5	70.2 (3.84) b	66.2 (0.02) a
16/5	31.1 (5.21) c	23.6 (0.88) b

La viabilidad y virulencia disminuyeron en función del incremento del CO₂ en la mezcla gaseosa, obteniéndose los valores mínimos de viabilidad (23 %), con la mezcla 16/5 %

O₂/CO₂. Esto aunado al hecho de los pobres rendimientos y la destrucción del micelio (Fig. 8.26), en las mezclas con CO₂ indica que el incremento del gas en la mezcla tiene un efecto tóxico para este aislado, contrario a lo reportado para otros hongos patógenos para los cuales la presencia de CO₂ en la atmósfera es un requisito para su esporulación y virulencia (Bahn y Mühlischlegel 2006). Por otro lado, la reducción de la virulencia cuando se incrementó el contenido de O₂ en la mezcla gaseosa implicaría que el hongo no tolera incrementos de esta magnitud (5 %) de este gas en la atmósfera. Con respecto a la viabilidad, el incremento de O₂, no tuvo efecto sobre este parámetro. Para la viabilidad, solo se observaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$), para las mezclas con mayor concentración de CO₂.

9. CONCLUSIONES

- El método de conservación en agua desionizada a 4 °C tuvo un efecto positivo a largo plazo sobre la viabilidad de los conidios de este hongo.
- Se demostró la sensibilidad del aislado de *Beauveria bassiana* 885.2 hacia la composición de los medios de cultivo y la actividad de agua en caja de Petri, obteniéndose las mejores velocidades radiales, rendimientos de conidios y crecimiento en los medios con fuentes de nitrógeno complejas. En cuanto a la actividad de agua, el hongo creció y produjo la mayor cantidad de conidios con valores elevados (cerca de 1).
- Los mejores rendimientos de conidios de *Beauveria bassiana* se obtuvieron con salvado de trigo y sales minerales como sustrato con un contenido de humedad de 66%, disminuyendo con contenidos de humedad por encima o por debajo de este valor.
- El uso de texturizante (bagazo de caña) no tuvo efecto en los rendimientos de conidios por gramo de salvado de trigo. Sin embargo, el rendimiento sí disminuyó con respecto al peso de sustrato inicial (salvado de trigo más bagazo de caña).
- Los máximos rendimientos de conidios (1×10^{10} conidios/gssi) se obtuvieron en fermentaciones con una atmósfera normal, fueron similares a lo reportado en la literatura y se obtuvieron en un tiempo de 285 h.
- El incremento en la concentración de CO₂ en la mezcla gaseosa tuvo un efecto adverso sobre el crecimiento y rendimientos de conidios del hongo en el sistema de fermentación.
- La modificación de la atmósfera afectó de manera negativa la viabilidad de los conidios producidos.
- La modificación de la atmósfera gaseosa tuvo un efecto negativo en la virulencia de los conidios de *Beauveria bassiana* sobre larvas de *Tenebrio molitor*.
- A diferencia de otros reportes, no se encontró relación entre la hidrofobicidad relativa de los conidios y su virulencia.

10. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten formular las siguientes recomendaciones, encaminadas a orientar los trabajos futuros:

- El análisis de la sensibilidad del aislado silvestre, hacia la composición de la atmósfera gaseosa, permitiría tener un marco de referencia para sistemas de producción a mayor escala.
- La evaluación de concentraciones de CO₂ presentes en la mezcla gaseosa en el intervalo de 0 a 5 % permitirán precisar el umbral de sensibilidad del hongo.
- La evaluación de diferentes substratos y mezclas de ellos permitiría una selección del substrato que asegurara una buena cantidad y calidad de los conidios.
- La evaluación de la sensibilidad del aislado hacia la composición de la atmósfera gaseosa, inmediatamente después de su reactivación u obtención del cultivo monospórico, permitirá descartar el efecto del método de conservación sobre ella.
- De la misma manera, el análisis del incremento en la concentración de O₂ de la mezcla gaseosa en el intervalo de 21 a 26 % ayudaría a precisar el efecto de este gas sobre el crecimiento y producción de conidios de *Beauveria bassiana*.
- En otro estudio sería importante probar otro tipo de reactor con las condiciones de cultivo del trabajo, con el fin de descartar un efecto del reactor sobre el crecimiento y conidiación del hongo.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Agosin E., Volpe D., Munoz G., San Martin R., Crawford A. 1997. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* World. Journal of Microbiology and Biotechnology **13**: 225-232.
2. Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. Trends in Microbiology. **13** (3): 111-118.
3. 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.
4. Arcas, J. A.; Díaz, B. M.; Lecuona, R. E. 1999. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. Journal of Biotechnology **67**: 151-158.
5. Arthurs, S.; Thomas, M. B. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. Journal of Invertebrate Pathology. **78**:59-65.
6. Arzumanov, T., Jenkins N., Roussos, S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochemistry **40**: 1037-1042.
7. Bahn, Y., S., Mühlischlegel, F., A. 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. Current Opinion in Microbiology **9**: 572-578.
8. Bai, Z., L., Harvey, M., McNeil, B. 2003. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. Critical Reviews in Biotechnology. **23**(4): 267-302.
9. Bajracharya, R., Mudgett, R. E. 1980. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. Biotechnology and Bioengineering, **32**: 2219-2235.
10. Barranco-Florido, Alatorre-Rosas, R.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniestra-González, G.; Saucedo-Castañeda, G. 2002. Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. Enzyme and Microbial Technology. **30**: 910-915.
11. Barrera, J., F. 2007. Introducción, filosofía y alcance del control biológico, pp. 1-18. En: Rodríguez-del-Bosque L., A., Arredondo-Bernal H., C. (eds.). Teoría y Aplicación del Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 303 p.
12. Batta, Y., A. 2007. Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdale* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Journal of Applied Microbiology **103**:1406-1414.
13. Belozerskaya, T., A., Gessler, N., N. 2006. Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. Microbiology. **75**(4): 427-431.
14. Belozerskaya, T., A., Gessler, N., N. 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. Applied Biochemistry and Microbiology. **43**(5): 506-515.
15. Berlanga-Padilla, A. M., Hernández-Velázquez V. M. 2003. Conservación de hongos entomopatógenos en gel de sílice. Ficha técnica CB-23. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. México.
16. Bidochka, M. J.; Low, N. H.; Khachatourians, G. G. 1990. Carbohydrate storage in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology **56** (10): 3186-3190.
17. Bidochka, M. J., ST Leger, R. J., Joshi, L., Roberts, D. W. 1995. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. Mycological Research **99** (4): 403-406.
18. Bieliková, L.; Landa, Z.; Osborne, L. S.; Curn, V. 2002. Characterization and identification of entomopathogenic and mycoparasitic fungi using RAPD-PCR technique. Plant Protection Science **38** (1): 1-12.

19. Bosch, A., Yantorno, O. 1999. Microcycle conidiation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* bals. (vuill.). *Process Biochemistry* **34**: 707-716.
20. 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** (7): 1795-1805.
21. Braga, G. U. L.; Destéfano, R. H. R.; Messias, C. 1999. Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. **74**:112-119.
22. Brownbridge, M., Costa, S., Jaronski, S. T. 2001. Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **77**:280-283.
23. Bustillo, A. E., Bernal, M. G., Benavides, P., Chaves, B. 1999. Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) Populations Emerging from Fallen Coffee Berries. *The Florida Entomologist* **82** (4): 491-498.
24. 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,: CAB International Publishing, UK 141-195.
25. Butt, T., M., Jackson, C., Magan, N. 2001. Fungal biological control agents: progress, problems and potential. En: *Fungi as biocontrol agents*: Butt, TM Jackson, C, Magan, N (Eds). CAB International Publishing, UK 1- 8.
26. Butt, T., M., Wang, C., Shah, F., A., Hall, R. 2006. Degeneration of entomogenous fungi En: *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*: Eilenberg, J., Hokkanen, H.,M.,T. (eds.) Springer Holanda 213-226.
27. Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 1215-1221.
28. Cavalcante, R., S., Lima, H., L., S., Pinto, G., A., S., Gava, C., A., T., Rodrigues, S. 2008. Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technol* **1**:100-104.
29. Charnley, A., K., Collins, S., A. 2007. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control. En: *Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Edition The Mycota IV. Kubicek, C., P., Druzhinina, I., S. (Eds.) Springer-Holanda. 159-187.
30. Cherry, A., J., Jenkins, N., E., Heviefio, G., Bteman, R., Lomer, C., J. 1999. Operational and economic analysis of a West African pilot-scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium ssp* for use as mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology* **9**: 35-51.
31. Chi, V., T., B., Hung, P., Q., Nhan, N., T., Thanh, N., D., Hong, T., T., B., Loc, N., T. 2005. Economic performance by using bio-insecticides and chemical insecticides to control rice insect pests. *Omonrice* **13**: 63-68.
32. Clarkson, J., M., Charnley, A., K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* **4** (5): 197-203.
33. Crespo, R., Juárez, M., P., Cafferata, L., F., R. 2000. Biochemical Interaction between Entomopathogenous Fungi and their insect-host-likehydrocarbons. *Mycologia*. **92** (3): 528-536.
34. Cullen, R., Warner, K., D., Jonsson, M., Wratten, S., D. 2008. Economics and adoption of conservation biological control. *Biological Control* **45**: 272-280.
35. Dahlberg, K., R., Van Etten, J., L. 1982. Physiology and biochemistry of fungal sporulation. *Annual Review of Phytopathology*. **20**:281-30.
36. De Cal, A., Larena, I., Guijarro, B., Melgarejo, P. 2002. Mass production of conidia of *Penicillium frequentans*, a biocontrol agent against brown rot of stone fruits. *Biocontrol Science and Technology* **12**: 715-725.

37. De Faria, M. R., Wraight, S., P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control* **43**: 237-256.
38. Desgranges, C., Durand, A. 1990. Effect of pCO₂ on growth, conidiation, and enzyme production in solid-state culture on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* TS. *Enzyme and Microbial Technology*. **12**: 546-551.
39. Desgranges, C., Vergoignan, C., Lereec, A., Riba, G., Durand, A. 1993. Use of solid state fermentation to produce *Beauveria bassiana* for the biological control of European corn borer. *Biotechnology Advances*. **11**(3): 577-587.
40. Devi, K., U., Sridevi, V., Mohan, CH., M., Padmavathi, J. 2005. Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of Invertebrate Pathology* **88**: 181-189.
41. Dorta, B., Ertola R., J., Arcas, J., A. 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **19**: 434-439.
42. Edwards, M., G., Gatehouse, A., M., R. 2007. Biotechnology in crop protection: towards sustainable insect control. En: Vurro, M. Gressel, J. (Eds.). *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. Springer Holanda 1-23.
43. Eken, C., Tozlu, G., Dane, E., Çoruh, S., Demirci E. 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae). *Mycopathologia* **162**: 69-71.
44. Ekesi, S., Maniania, N., K., Ampong –Nyarko, K. 1999. Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology* **9**: 177-185.
45. Eilenberg, J. 2006. Concepts and visions of biological control. En *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*. Eilenberg, J., Hokkanen H., M., T. (eds.). Springer. Holanda 1–11.
46. Fang, W., Pei, Y., Bidochka, M., J. 2007. A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. **153**: 1017-1025.
47. Fargues, J., Luz, C. 2000. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **75**: 202-211.
48. Fargues, J., Goettel, M., S, Smits, N., Ouedraogo, A., Rougier, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* **89** (3): 383-392.
49. Feng, K., C, Liu, L., Tzeng M., Y. 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, **23**: 25-29.
50. Feng, K., C., Liu, L., Tzeng M., Y. 2002. Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**: 217-224.
51. Fernandez, S., Groden, E., Vandenberg, J., D., Furlong M., J. 2001. The effect of mode of exposure to *Beauveria bassiana* on conidia acquisition and host mortality of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **77**: 217-226.
52. Fernandes, E., K., K., Rangel D., E., N., Moraes, A., M., L., Bittencourt, V., R., E., P., Roberts D., W. 2008. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology* **98**: 69-78.
53. Fernández-Larrea, O. 2002. Control de calidad de los insecticidas microbianos. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)*. **65**:120-122.

54. Ferron, P.; Fargues, J.; Riba, G. 1991. Fungi as microbial insecticides against pests. En Handbook of applied mycology Vol. 2 Arora D., K., Ajello, L., K., Mukerji, G (eds). Dekker New York 665-706.
55. Fischer, R., Kues, U. 2006. Asexual sporulation in mycelial fungi. En The Mycota I Growth, differentiation and sexuality. Fischer, R., Kues, U. (eds) Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 263-292.
56. Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual Review of Phytopathology. **43**:337-59.
57. Fuguet, R., Vey, A. 2004. Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria spp.*: in vivo studies. Journal of invertebrate pathology, **85**: 152-167.
58. Furlong, M., J., Groden, E. 2003. Starvation induced stress and the susceptibility of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* to infection by *Beauveria bassiana*. Journal of invertebrate pathology, **83**: 127-138.
59. Fuxa, J., R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. Annual review in entomology **32**: 225-251.
60. Georgiou, C., D., Patsoukis, N., Papapostolou, I., Zervoudakis, G. 2006. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. Integrative and Comparative Biology. **46**(6): 691-712.
61. Girardin, H., Paris, S., Rault J., Bellon-Fontaine M. N., Latge, J. P. 1999 The role of the rodlet structure on the physiochemical properties of *Aspergillus conidia*. Letters in Applied Microbiology 29: 364–369.
62. Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M. 1988. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnology and Bioengineering, **31**: 457-463.
63. Gervais P., Marechal P., A, Molin P. 1996. Water relations of solid state fermentation. Journal of Scientific and Industrial Research **55**: 343-357.
64. Gerrard, J., G., Joyce, S., A., Clarke, D., J., French-Constant, R. H., Nimmo, G., R., Looke, D., F., M., Feil, E., J., Pearce, L., Waterfield, N., R. 2006. Nematode Symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. Emerging Infectious Diseases **12** (10): 1562-1564
65. Ghildyal, N., P., Ramakrishna, M., B., Lonsane, K., Karanth, N., G. 1992. Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors-effect on yields and productivities. Bioprocess Engineering **8**: 67-72.
66. Gillespie A., T., Crawford E. 1986. Effect of water activity on conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces spp.* and *Verticillium lecanii*. En: Samson R. A, Vlaskovic J., M., Peters D., (Eds). Fundamental and applied aspects of invertebrate pathology. Wageningen: Society of Invertebrate Pathology, p. 254.
67. Glare, T., R.; Milner R., J. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. En Handbook of applied mycology Vol. 2 Arora, D., K., Ajello, L., Mukerji, K., G. (Eds). Dekker New York 547-612.
68. Glare, T., R., 2004. Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. En Handbook of fungal biotechnology Vol. 21 Arora, D., K. (Ed). Dekker New York 79-90.
69. Goettel, M., S, Inglis, D., G. 1997. Fungi: hyphomycetes. En: Manual of Techniques in Insect Pathology. Lacey L., A. (Ed). Academic Press, INC California USA. 213-249.
70. Grajek, W. 1994. Sporogenesis of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* in solid-state cultures. Folia Microbiologica. **39** (1): 29-32.
71. Grajek, W., Gervais, P. 1987. Effect of the sugar-beet pulp water activity on the solid-state culture of *Trichoderma viride* TS. Applied Microbiology and Biotechnology. **26**:537-541.
72. Grant, W. D. 2004. Life at low water activity. Philosophical Transactions: Biological Sciences **359** (1448) 1249-1267.
73. Grimm, C. 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. Crop Protection **20**: 623-630.

74. Han, B., Z., Nout, R., M., J. 2000. Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of tempe fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology **16**: 853-858.
75. Han, O., Mudgett, R., E. 1992. Effects of oxygen and carbon dioxide partial pressures on *Monascus* growth and pigment production in solid state fermentations. Biotechnology Progress, **8** 5-10.
76. Hansberg, W., De Groot, H., Sies, H. 1993. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. Free Radical Biology and Medicine. **14**: 287-293.
77. Henke, M., O., De Hoog, G., S., Gross, U., Zimmerman, G., Kraemer, D., Weig, M. 2002. Human deep tissue infection with an entomopathogenic *Beauveria* species. Journal of Clinical Microbiology. **40**: 2698-2702.
78. Holder, D., J., Keyhani, N., O. 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. Applied and Environmental Microbiology. **71** (9) 5260-5266.
79. Ignoffo, C., M. 1992. Environmental factors affecting persistence of entomopathogens. The Florida Entomologist. **75** (4): 516-525.
80. Iskandarov, U., S., Guzalova, A., G., Davranov, K., D. 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Applied Biochemistry and Microbiology **42**(1): 72-76.
81. Jarrold S., L., Moore D., Potter U., Charnley, A., K. 2007. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. Mycological Research **3**: 240-249.
82. Jenkins, N., E., Heviefio, G., Langewald J., Cherry, A., J., Lomer, C., J. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. Biocontrol News and Information. **19** (1) 21N-31N.
83. Ji, G., H., Wei, L., F., He, Y., Q., Wua, Y., P, Bai, X., H. 2008. Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-1. Biological Control **45**: 288-296.
84. Jones, R., P., Greenfield, P., F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Enzyme and Microbial Technology. **4**: 210-223.
85. Jones, E., E., Weber, F., J., Oostra, J., Rinzema, A., Meada, A., Whipps, J. M. 2004. Conidial quality of the biocontrol agent *Coniothyrium minitans* produced by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. Enzyme and Microbial Technology **34**: 196-207.
86. Kamp, A., M, Bidochka, M., J. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. Letters in Applied Microbiology, **35**: 74-77.
87. 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.
88. Kasha, A., Brownbridge, M., Parker, B., L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Guo, M., Lee, F., Hata, T. 2008. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research **112**: 583-591.
89. Kaya, H., K., Lacey, L., A. 2007. Introduction to microbial control. En. Lacey L., A., Kaya H., K. (eds.). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Springer Holanda 3-7.
90. Khachatourians, G., G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi En Handbook of Applied Mycology Vol. 2 Arora, D., K., Ajello, L., Mukerji, K., G. (Eds). Dekker New York. 613-664.
91. Knudsen, G., R., Eschen, D., J., Dandurand, L., M., Wang, Z., G. 1991. Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi. Applied and Environmental Microbiology. **57**(10): 2864-2867.
92. Kredics, L., Manczinger, L., Antal, Z., Péntzes, Z., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. 2004. *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme

- activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Journal of Applied Microbiology. **96**: 491-498.
93. Kope, H., H., Alfaro, R., I., Lavalée R. 2008. Effects of temperature and water activity on *Lecanicillium spp.* conidia germination and growth, and mycosis of *Pissodes strobe*. BioControl **53**:489-500.
94. Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems, an overview. Critical Review in Biotechnology **25**: 1-30.
95. Larroche, C. 1996. Microbial growth and sporulation behaviour in solid state fermentation. Journal of Scientific and Industrial Research, **55**: 408-423.
96. Larroche, C., Theodore, M., Gros, J., B. 1992. Growth and sporulation behaviour of *Penicillium roquefortii* in solid substrate fermentation: effect of the hydric parameters of the medium. Applied Microbiology and Biotechnology. **38**: 183-187.
97. Lima, M., G., V., Krieger N., Sarquis, M., I., M., Mitchell, D., A, Ramos, L., P., Fontana, J., D. 2003. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. Food Technology and Biotechnology **41** (2): 105-110.
98. Liu B., L., Tzeng Y., M. 1999. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae*. Biotechnology Letters **21**: 657-661.
99. Loera, O., Aguirre, J., Viniegra-González, G. 1999. Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* pectinase overproducing mutants. Enzyme and Microbial Technology. **25**: 103-108.
100. Loera, O. 2005. Mejoramiento de aislados de *Beauveria bassiana*. Simposium en el XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Mérida, Yucatán.
101. Lonsane, B., K., Ghildyal, N., P., Budiatman, S., Ramakrishna, S., V. 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology. **7**: 258-265.
102. López-Lastra, C., C., Hajek, A., E., Humber, R., A. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Canadian Journal of botany, **80** 1126-1130.
103. Lord, J., C. 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology, **89**: 19-29.
104. McIntyre, M., McNeil, B. 1997. Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* A60. Enzyme and Microbial Technology. **21**: 479-483.
105. Mierzejewski, K., Reardon, R., C., Thistle, H., Dubois, N., R. 2007. Conventional application equipment: aerial application. En: Lacey, L., A., Kaya, H., K. (eds.). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Springer Holanda 99-126.
106. Montesinos-Matías, R. 2008. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa México.
107. Montiel-González, A., M., Viniegra-González, G., Fernández, F., J., Loera, O. 2004. Effect of water activity on invertase production by improved diploids strains of *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, **39**: 2085-2090.
108. Nuñez-Gaona, O. 2004. Producción de invertasa por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa México.
109. Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R., Loera O. 2005. Effect of water activity on grown and conidia production in *Beauveria bassiana*. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control. Guanajuato, Gto México.
110. Núñez-Gaona O., Saucedo G., Alatorre-Rosas R., Loera O. 2006. Efecto del nivel de inóculo sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación den medio sólido. XXIX Congreso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima México.

111. Ownley, B., H., Griffin, M., R., Klingeman, W., E, Gwinn, K. D., Moulton, J. K., Pereira, R., M. 2008. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* **98**: 267-270.
112. Pandey, A. 2003. Solid state fermentation. *Biochemical engineering journal*, **13**: 81-84.
113. Parra R., Aldred, D., Archer D., B, Magan, N. 2004. Water activity, solute and temperature modify growth and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strains. *Enzyme and Microbial Technology*. **35**: 232-237.
114. Pascual, S., De Cal, A., Magan, N., Melgarejo, P. 2000. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*. **89**: 847-853.
115. Perkins D., 1977. Details for preparin silica gel stock. *Neurospora newsletter* **24**: 16-17.
116. Rahardjo, Y., S., P., Tramper, J., Rinzema, A. 2006. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances* **24**: 161-179.
117. Raghavarao, K., S., M., S., Ranganathan, T., V., Karanth, N., G. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **13**: 127-135.
118. Rangel, D., E., N., Alston, D., G., Roberts, D., W. 2008. Effects of physical and nutritional stress conditions during culture on conidial germination speed, adhesion to host cuticle, and virulence of *Metarhizium anisopliae*, an entomopathogenic fungus. *Mycological Research*. **112** (11): 1355-1361
119. Robledo M., Alatorre-Rosas R., Viniegra-González G, Loera O. 2005. Effects of improved *Beauveria bassiana* strains toward *Sphenarium purpuracens* (ORTHOPTERA: ACRIDIDAE). *International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control*. Guanajuato, Gto México.
120. Rodriguez, S., Sanromán M. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. *Journal of Food Engineering* **76**: 291-302.
121. Roncal, T., Ugalde, U. 2003. Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*. **154** 539-546.
122. Roussos, S., Olmos, A., Raimbault, M., Saucedo-Castañeda, G., Lonsane B., K. 1991. Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnology Techniques* **5** (6): 415-420.
123. Safavi S., A., Shah F., A., Pakdel A., K., Rasoulia G., R., Bandani A., R., Butt R., M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* **270**: 116-123.
124. Sahebani, N., Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry* **40** (8): 2016-2020.
125. Santa, H. S., Sousa, N., J., Brand, D., Santa, O., R, Pandey, A., Sobotka, M., Paca, J., Soccol, C., R. 2004. Conidia production of *Beauveria* sp. by solid state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiologica* **49** (4) 418-422.
126. Santamarina, M., P., Roselló, J., Barceló, S., Marín, S. 2003. Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. *Revista Iberoamericana de Micología* **20**: 154-159.
127. Shah, F., A., Allen, N., Wright, C., J., Butt, T., M. 2007. Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters* **276**: 60-66.
128. Shankaranand, V., S., Ramesh, M., V., Lonsane, B., K. 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochemistry* **27**: 33-36.
129. Soccol, C., R., Raimbault, M., Pinheiro, L., I. 1994. Effect of CO₂ concentration on the micelium growth of *Rhizopus* species. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. **37**(1): 203-210.

130. St. Leger, R., J. 2007. *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interactions En: M. Vurro and J. Gressel (eds.). Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. Springer Holanda 179–204.
131. St Leger, R., J., Nelson, J., O. Steven, E., S. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology. 145: 2691-2699.
132. Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-Pakdel, A., Goettel, M., Mozaffari, J. 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. Biocontrol Science and Technology. **16**(5): 525-534.
133. Tefera, T., Pringle K. 2003. Germination, radial growth, and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates and their virulence to *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae) at different temperatures. Biocontrol Science and Technology. **13** (7): 699-704.
134. Thibault, J., Pouliot, K., Agosin, E., Pérez-Correa, R. 2000. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and KLa in solid-state fermentation. Process Biochemistry, **36**: 9-18.
135. Toledo, I., Aguirre, J., Hansberg, W. 1994. Enzyme inactivation related to hyperoxidant state during conidiation of *Neurospora crassa*. Microbiology, **140**:2391-2397.
136. Vega, F., E., Posada, F., Aime, C., M, Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S., A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control **46** (1): 72-82.
137. 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.
138. Vurro, M. 2007. Benefits and risks of using fungal toxins in biological control En: Vurro, M., Gressel, J. (eds.). Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. Springer Holanda 53-74.
139. Warner, K., D, Getz, C. 2008. A socio-economic analysis of the North American commercial natural enemy industry and implications for augmentative biological control. Biological Control **45**: 1-10.
140. Wiencek, K., M., Klapes, N., A, Foegeding, P., M. 1990. Hydrophobicity of *Bacillus* and *Clostridium* Spores. Applied and Environmental Microbiology. **56**(9): 2600-2605.
141. Wraight, S., P., Inglis, G., D., Goettel, M., S. 2007. Fungi En: Lacey, L. A. and Kaya, H. K. (eds.). Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Springer Holanda 223-248.
142. Xiao, Y., Tang, S. 2008. The effect of initial density and parasitoid intergenerational survival rate on classical biological control. Chaos, Solitons and Fractals **37**: 1048-1058.
143. Ying, S., H., Feng, M., G. 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. Journal of Applied Microbiology. **97**: 323-331.

ANEXO

Trabajos presentados

Núñez Gaona Oscar, Saucedo Castañeda Gerardo, Alatorre Rosas Raquel, Loera Corral Octavio. Effect of water activity on grown and conidia production in *Beauveria bassiana*. International workshop on microbial biotechnology and biological control: microorganisms as friendly tools. Guanajuato, Guanajuato, México. Junio, 27-30, 2005.

Núñez Gaona Oscar, Saucedo Castañeda Gerardo, Alatorre Rosas Raquel, Loera Corral Octavio. Efecto del contenido de humedad y composición del substrato sobre el crecimiento y producción de conidios de *Beauveria bassiana*. First international workshop of biotechnology. Zempoala, Hidalgo, México. Noviembre, 21-25, 2005.

Núñez Gaona Oscar, Saucedo Castañeda Gerardo, Alatorre Rosas Raquel, Loera Corral Octavio. Efecto de la actividad de agua sobre el crecimiento y producción de conidios de *Beauveria bassiana*. First international workshop of biotechnology. Zempoala, Hidalgo, México. Noviembre, 21-25, 2005.

Núñez Gaona Oscar, Saucedo Castañeda Gerardo, Alatorre Rosas Raquel, Loera Corral Octavio. Efecto de la concentración del inoculo inicial sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en fermentación en medio sólido. XXIX congreso nacional de control biológico. Manzanillo, Colima, México. Noviembre, 9-10, 2006.

Núñez Gaona Oscar, Saucedo Castañeda Gerardo, Alatorre Rosas Raquel, Loera Corral Octavio. Influencia de la composición de la atmósfera sobre la producción de conidios de *Beauveria bassiana* en cultivo sólido. Second international workshop on biotechnology and second international meeting on alternative energies. Pachuca, Hidalgo, México. Noviembre, 7-9, 2007.

Publicaciones

Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., Loera, O. Moisture content and inoculum effects on growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. Trabajo aceptado para su publicación en el Brazilian Archives of Biology and Technology (Artículo anexado)

Moisture content and inoculum effects on growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran.

Oscar Nuñez-Gaona¹, Gerardo Saucedo-Castañeda¹, Raquel Alatorre-Rosas² and Octavio Loera^{1*}

¹ Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. de Biotecnología, 09340, Mexico D.F., Mexico.

² Colegio de Posgraduados, Instituto de Fitosanidad, Montecillo, 56230, Edo. de Mexico. Mexico.

ABSTRACT

Proper knowledge of moisture influence and water activity (a_w) is required for the optimal production of conidia by *Beauveria bassiana*, especially when using alternative substrates and texturisers such as wheat bran (WB) and sugar cane bagasse (SCB), respectively. The highest growth rate of *B. bassiana* 885.2 on WB media was obtained at $a_w=1.0$, with no detected growth at $a_w < 0.97$. Solid state fermentation (SSF) using WB (66% moisture; $a_w=1.0$) achieved a maximal yield of 1.18×10^{10} conidia per gram of dry substrate (gds). This yield decreased one order of magnitude with greater moisture contents or the addition of SCB as a texturiser. In SSF using WB (66% humidity), the time to obtain a yield of 1×10^{10} conidia/gds, referred to as t_{10} , could be predicted using a model considering common inoculum levels and maximal yields. For instance, t_{10} was 285 h with an inoculum of 1×10^6 conidia/gds; however, t_{10} was reduced to 232 h and 148, for inocula of 7×10^6 and 5×10^7 conidia/gds, respectively. Estimation of t_{10} values allows both comparison between cultures and prediction of harvesting times in production processes. Values for hydrophobicity were within 90 and 92%, whereas viability averages were around 70% for all cultures

Key words: *Beauveria bassiana*; wheat bran; water activity; texturiser; conidial yields.

INTRODUCTION

Organic farming requires practical and suitable approaches to substitute chemical pesticides used in crop fields worldwide. Biological control is considered an important part of integral pest management (IPM), which also is an environmental friendly alternative (Fuxa 1987). *Beauveria bassiana* is widely extended in nature; this fungus has the potential to control a wide range of insect pests. Additionally, it is innocuous for human and other mammals (Fuxa 1987; Arcas *et al.* 1999). Interest for industrial production has increased over the past few years, in fact there are commercial products based on conidiospores of this fungus (Fuguest & Vey 2004).

In order to produce conidia of entomopathogenic fungi at industrial level, there are two main methods, Submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SSF); however in SmF, entomopathogenic fungi mainly produces

blastospores and conidia yields are low (Feng *et al.* 2000). Conversely, in SSF growth of microorganisms is achieved over solid supports with substantially low levels of water (Pandey 2003). There are some key factors affecting growth and conidial production in SSF and it is important to know their influence in the processes. Some of these main factors are temperature, pH, substrate (type and concentration), and moisture content (Barranco-Florido *et al.* 2002; Larroche 1996; Arzumanov *et al.* 2005).

The aim of this work was to evaluate the effect of moisture content and inoculum size on growth and conidia production by *Beauveria bassiana* using wheat bran as a substrate. Sugar cane bagasse as a texturiser was also analyzed in those cultures. Also a criterion is proposed based on times for reaching suitable conidial yields, which could be relevant for the prediction of harvesting times and for proper culture comparison.

* Author for correspondence (O. Loera): loera@xanum.uam.mx

1 MATERIALS & METHODS

2
3 **Microorganism propagation.** The strain
4 *Beauveria bassiana* 885.2 was propagated on 4
5 % (w/v) Dextrose Sabouraud Agar (DSA).
6 This strain belongs to the *Universidad*
7 *Autonoma Metropolitana* culture collection.
8 Conidia were harvested after cultivation for 7
9 to 10 days at 28 ± 0.5 °C, stirring the culture
10 with a 0.05% (v/v) aqueous solution of Tween
11 80 during 10 min. For both conidial density
12 and radial extension rate assays, conidia were
13 point inoculated by triplicate in the center of
14 Petri dishes containing wheat bran 10 % (w/v)
15 as the only nutrient source plus agar (15 g/L).
16 This medium was also supplemented either
17 with components of a synthetic medium (Alves
18 *et al.* 2002) or standard 4 % (w/v) Dextrose
19 Sabouraud broth diluted (1:2) previously.
20 Ethylene glycol (0 to 20%) was used as a water
21 activity (a_w) depressor in these media
22 (Montiel-González *et al.* 2004), which allowed
23 the modification of a_w values within a range of
24 1.0 to 0.93. Water activity was evaluated using
25 a hygrometer (Acualab, Cx-2, Labsenscientific
26 Co, USA, 1952). All media were sterilized at
27 15 PSI and 121°C for 15 min. Incubation was
28 kept at 28 ± 0.5 °C for 14 days then conidia
29 were harvested and counted.
30 **Solid state fermentations.** One gram of wheat
31 bran was placed in 75 mL serological bottles.
32 Moisture was adjusted to 66, 75 and 80 % by
33 adding 2, 3 and 4 mL of distilled water,
34 respectively. Half of the proper amount of
35 water for routine experiments was added prior
36 to sterilization; the rest of water was added
37 afterwards, containing conidial inoculum and
38 Dextrose Sabouraud broth as described earlier.
39 Three bottles for each moisture were
40 inoculated with a final concentration of 5×10^7
41 conidia per gram of initial dry substrate (gds).
42 Incubation was kept at 28 ± 0.5 °C for 14 days.
43 After this period conidia were harvested and
44 counted using a Neubauer chamber in an
45 optical microscopy at 40X.
46 **Substrate Mixtures.** Mixtures of wheat bran
47 and sugar cane bagasse were prepared in the
48 following proportions (w/w): 100/0, 70/30,
49 50/50, 30/70. Humidity was adjusted to 66% in
50 vials containing one gram of these mixtures

51 prior to sterilization and inoculation as
52 described above. Conidial production was
53 determined after 14 days from sample
54 triplicates for every mixture.

55 **Inoculum level.** One gram of wheat bran was
56 managed as mentioned above. Three levels of
57 inoculation were assayed: 1×10^6 , 6×10^6 and
58 5×10^7 conidia/gds. Bottles were incubated at
59 28 °C for up to 18 days; every 24 h conidial
60 yields were determined as described above for
61 three independent bottles from each treatment.
62 Results were adjusted to the best fit to the
63 exponential model described below by the
64 Solver routine (Excel, Microsoft) adjusting
65 values for y_{max} and k . Then, the time value (h)
66 for achieving a level of 1×10^{10} conidia/gds
67 was calculated, this value was referred to as t_{10} .
68 The exponential model was the following:

$$69 \frac{dy}{dt} = ke^{-kt}(y_{max} - y_0), \text{ resolving for:}$$

70 $t = 0, y = y_0$; and for $t \rightarrow \infty, y \rightarrow y_{max}$, the
71 corresponding equation is as follows:

$$72 y = y_0 + (y_{max} - y_0) * (1 - e^{-kt})$$

73 Where:

74 y_0 : Initial inoculum (conidia/gds).

75 y_{max} : Maximal yield (conidia/gds).

76 y : Yield at time "t" (conidia/gds).

77 t : Time (h).

78 k : Specific production rate (1/h).

79
80
81 **Hydrophobicity.** This parameter was
82 determined by the phase exclusion method
83 (Boucias *et al.* 1988; Jeffs & Khachatourians,
84 1997). Fresh harvested conidia suspension was
85 centrifuged at 8000g during 30 min; conidial
86 pellet were then washed twice with deionized
87 water at 50 °C before suspension in acetate
88 buffer (0.1M, pH 6.0). This was mixed with
89 equal toluene volumes and refrigerated
90 overnight. Then aqueous phase was excluded
91 from organic phase and was measured at 600
92 nm using the same acetate buffer as a blank.
93 Hydrophobicity was calculated using following
94 equation:

$$95 H = \frac{(A_0 - A_m)}{A_0} * 100$$

96 Where:

97 **H**: Conidia hydrophobicity (%)

98 **A₀**: Blank absorbance

1 A_m : Aqueous phase absorbance

2

3 **Viability.** Analysis of viability were carried
4 out in Petri dishes by triplicate with SDA (4%)
5 medium containing yeast extract (1 g/L) and
6 sodium deoxycolate (1 g/L) which made
7 colonies more compact for easy counting; pH
8 was adjusted to 6 using HCl (1 N) solution.
9 Petri dishes were inoculated with 200 μ L of
10 conidial suspension from a proper dilution in
11 order to have 300 conidia per plate. Plates
12 were incubated at 28 ± 0.5 °C for 3 days and
13 then number of colonies was counted. The
14 conidia viability was calculated using
15 following equation:

$$16 V = (n / 300) * 100$$

17 Where:

18 **V:** Conidia viability (%)

19 **n:** Colony number

20

21 **Statistics Analysis.** Conidia production as
22 well as every measured variable were
23 tested using one way ANOVA analysis by
24 means of NCSS statistic software with a
25 significant coefficient $\alpha = 0.05$.

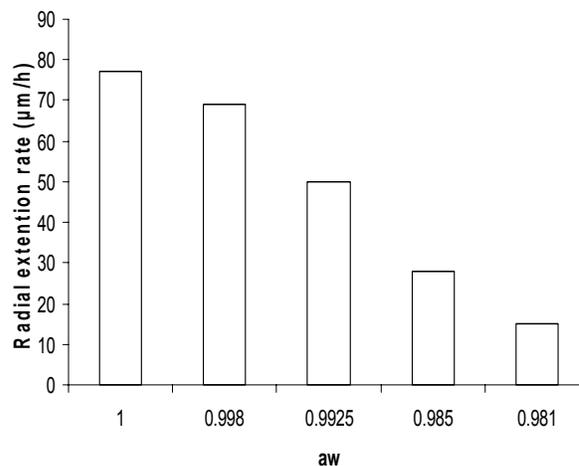
26

27 RESULTS & DISCUSSION

28

29 **Effect of water activity.** Wheat bran could
30 support the growth of *B. bassiana* when used
31 as the only nutrient in the medium. Radial
32 extension rate was considered as an estimation
33 of the fungal ability to colonize the substrate
34 on which it is growing. Values for radial
35 extension rate markedly enhanced (between 10
36 and 15%) after addition of liquid media
37 reported by Alves *et al.* (2002) or a standard
38 Dextrose Sabouraud broth. This behavior was
39 similar to that reported by Kamp & Bidochka
40 (2002) who found better growth for *B.*
41 *bassiana* in more complex media. Our *B.*
42 *bassiana* strain was very sensitive to variation
43 in water activity (a_w) since radial extension rate
44 decreased from 77 μ m/h (at $a_w = 1.0$) down to
45 15 μ m/h (at $a_w = 0.981$) in sole wheat bran
46 medium (Fig. 1), with no detectable growth at
47 a_w values lower than 0.97 for all analysed
48 media. These findings are in accordance to
49 Gervais *et al.* (1988) who worked with other
50 filamentous fungi such *Penicillium roqueforti*

51 and *Trichoderma viride* and described that a
52 value of a_w close to 1.0 was the best for fungal
53 growth. Nevertheless, for some *Aspergillus*
54 strains able to grow in solid fermentations, a
55 reduction of a_w from 0.995 down to 0.965 had a
56 much less marked effect on specific growth
57 rate (Loera & Viniegra-González, 1998;
58 Montiel-González *et al.* 2004).



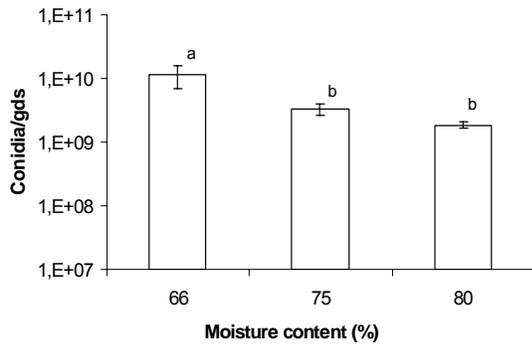
59

60 **Fig. 1.** Effect of water activity (a_w) on *B. bassiana*
61 radial extension rate (μ m/h) grown on wheat bran
62 agar medium with Ethylene glycol as depressor.
63 Results showed are means of triplicates and
64 observed variations were within 12% of means
65 values.

66

67 **Moisture content.** Solid state fermentation
68 allows the manipulation of a_w values in order
69 to adjust this parameter to particular
70 requirements by fungal strain as mentioned
71 above; our *Beauveria bassiana* strain showed
72 the better growth at $a_w=1.0$. In order to
73 analyzed conidial yields at $a_w=1.0$, moisture
74 content was assayed at three levels in wheat
75 bran medium: 66% (minimum value to assure
76 $a_w=1.0$), 75% and 80%. Effect of culture
77 moisture on conidial yields is showed in the
78 Fig. 2. Conidial yield decreased one order of
79 magnitude when moisture content increased
80 from 66 % to 80 %, with values of 1.18 ± 0.34
81 ($\times 10^{10}$) conidia/gds and 1.85 ± 0.21 ($\times 10^9$)
82 conidia/gds, respectively. This finding could
83 be related to the fact that when water content is
84 raised in the substrate, pores are filled and
85 oxygen mass transfer coefficient diminishes
86 (Pandey 2003; Durand *et al.* 1988). The best

1 relative humidity (66%) found in this study
 2 was similar to those values reported for conidia
 3 production by *Beauveria bassiana* in other
 4 media. These reported media include mixtures
 5 of waste potatoes residues and sugar cane
 6 bagasse (60-40%) (Dalla-Santa *et al.* 2004;
 7 Dalla-Santa *et al.* 2005), or wheat bran and rice
 8 straw 7:3 (w/w) (Kang *et al.* 2005).



27 **Fig. 2.** Effect of moisture content ($a_w = 1$) on
 28 *Beauveria bassiana* conidial yields (conidia/gds) in
 29 SSF with wheat bran as substratum. Columns with
 30 different letters showed significant differences ($P <$
 31 0.05).

33 **Substrate mixtures.** Sugar cane bagasse can
 34 function as a texturiser by increasing porosity
 35 and mass transfer during SSF. Table 1 shows
 36 the effect of this texturiser in mixtures with
 37 wheat bran on conidial yield. Reductions in
 38 conidial yields were proportional to the amount
 39 of sugar cane bagasse added to every mixture;
 40 in fact, in the mixture with the highest amount
 41 of sugar cane bagasse (70%) production was
 42 $2.6 \pm 0.9 (x 10^9)$ conidia/gds, which represent a
 43 reduction of 77% compared to that production
 44 with no addition of sugar cane bagasse.

46 **Table 1.** Effect of substrate mixtures between
 47 wheat bran (WB) and sugar cane bagasse (SCB) on
 48 conidial yields (conidia/gds). Yields results are also
 49 presented in terms of WB alone. Different letters
 50 mean significant differences ($P < 0.05$)

WB / SCB	Total yield	Yield on WB
----------	-------------	-------------

(%)	(x 10 ⁹)	(x 10 ⁹)
100 / 0	11.5 ± 0.44 a	11.5 ± 0.44 a
70 / 30	6.65 ± 0.49 b	9.50 ± 0.70 a
50 / 50	4.90 ± 1.84 b	9.80 ± 3.68 a
30 / 70	2.60 ± 0.99 b	8.33 ± 3.30 a

51
 52 However, when yield was referred to as
 53 conidia per gram of wheat bran, independently
 54 to the amount of texturiser, yields did not
 55 present significant differences among
 56 mixtures, with average production close to $1 \times$
 57 10^{10} conidia/gds (Table 1). This behavior was
 58 similar to a report by Arzumanov *et al.* (2005),
 59 who describe that in SSF using ground rice and
 60 sugar cane bagasse (50:50), *Metarhizium*
 61 *anisopliae* grew almost exclusively on rice
 62 particles, and the yield of conidia per gram of
 63 total dry matter was lower than that obtained in
 64 SSF with only rice as a substrate.

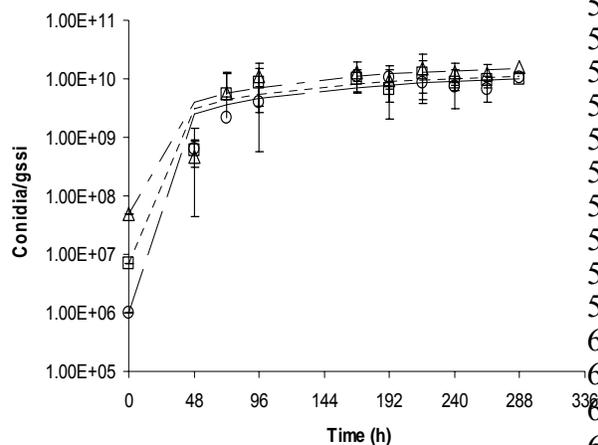
65 **Inoculum levels.** It is convenient for SSF
 66 systems to know the effect of inoculum size on
 67 the final values for any relevant parameter.
 68 Figure 3 shows that maximal conidia levels
 69 were $1.08 \pm 0.19 (x 10^{10})$, $1.20 \pm 0.82 (x 10^{10})$
 70 and $1.53 \pm 1.10 (x 10^{10})$ conidia/gds for
 71 inoculum sizes of 1×10^6 , 7×10^6 and 5×10^7
 72 conidia/gds, respectively. After adjusting data
 73 to the exponential model there was a reduction
 74 in time at which a level of 1×10^{10} conidia/gds
 75 is achieved, referred to as t_{10} , as a function of
 76 inoculum levels with the specific production
 77 rate values (k) shown in Table 2.

79 **Table 2.** Values for k according to different
 80 inoculum levels

Inoculum level (Conidia/gds)	$k \times 10^{-3} (1/h)$
1×10^6	3.85
7×10^6	4.83
5×10^7	3.94

81
 82 For instance, t_{10} was 285 h using the lowest
 83 inoculum (1×10^6 conidia/gds); however, this
 84 value could be reduced 20% and 50% for

1 higher inocula, since values for t_{10} were 232 h
 2 and 148 h using 7×10^6 or 5×10^7 conidia/gds,
 3 respectively. A level of 10^7 conidia/gds is
 4 commonly recommended as inoculum in
 5 cultures of entomophogenic fungi (Dalla-Santa
 6 *et al.* 2004; Dalla-Santa *et al.* 2005;
 7 Arzumanov *et al.* 2005). This result suggests
 8 that t_{10} can be an appropriate criterion to define
 9 the harvest time for an entire batch, which in
 10 turn may reduce maintenance and costs in
 11 processes related to conidia production by
 12 entomophogenic fungi.



13
 14
 15 **Fig. 3** Inoculum size (conidia/gds) effect on conidia
 16 production by *Beauveria bassiana* in SSF with
 17 wheat bran as substratum: \circ , 1×10^6 ; \square , 7×10^6 ; Δ ,
 18 5×10^7 . Solid lines: data best fit to model.

19
 20 **Hydrophobicity and viability.** In order to
 21 ensure compatibility of biocontrol agents with
 22 formulation and application techniques, it is
 23 necessary to produce lipophilic (hydrophobic)
 24 conidia which suspend easily in oils
 25 (Arzumanov *et al.* 2005). Also the attachment
 26 of conidia of the entomopathogenic fungi to
 27 host insects represents the initial event in the
 28 establishment of mycosis; this conidium-
 29 cuticle interaction may involve a complex of
 30 specific (e.g., glycoprotein) and nonspecific
 31 (e.g., electrostatic or hydrophobic) recognition
 32 mechanisms (Boucias *et al.* 1988). Thus,
 33 hydrophobicity as well as viability are related
 34 to quality of conidia for entomopathogenic
 35 fungi (Alavo & Accodji 2004; Talaei-
 36 Hassanlouei *et al.* 2006) and these parameters
 37 were not significantly affected as a function of

38 inocula size when determined at 7 days of
 39 culture. Values for hydrophobicity were within
 40 90 and 92%, whereas viability averages were
 41 around 70% for all cultures

42 CONCLUDING REMARKS

43
 44
 45 As concluding remarks it can be stated that
 46 *Beauveria bassiana* is a very sensitive fungus
 47 in terms of a_w variations, highest values of
 48 extension growth rate were obtained at $a_w =$
 49 1.0, with no detected growth at a_w lower than
 50 0.97. In SSF, $a_w = 1.0$ could be reached with a
 51 moisture content of 66% and any increase in
 52 moisture affected negatively conidia
 53 production using wheat bran. The use sugar
 54 cane baggase as a texturiser in SSF was not
 55 suitable for the production of conidia.
 56 Inoculum size can reduce times at which
 57 maximal conidial production are achieved with
 58 no effect on variables related to conidia
 59 quality; this finding could be relevant for
 60 prediction of harvesting times using a
 61 parameter such t_{10} described in this study.

62 RESUMO

63 ACKNOWLEDGEMENTS

64
 65 This work was financially supported by the
 66 Mexican Science and Technology Council
 67 (CONACyT, SEP-2003-C02-42931) and the
 68 Universidad Autónoma Metropolitana. O.
 69 Nuñez-Gaona held a scholarship from
 70 CONACyT (Registration number 7751).

71 REFERENCES

- 72
 73
 74 Alavo TBC, Accodji M. (2004). The
 75 entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*
 76 (*Deuteromycetes, Moniliaceae*). The proteins
 77 hydrophobins and the biological control of
 78 Aphids (*Homoptera, Aphididae*): literature
 79 review. *Arch Phytopathol Plant Protect.*, **37**, 201-
 80 204
 81
 82 Alves SB, Rossi LS, Lopes RB, Tamai MA, Pereira
 83 R.M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on
 84 agar medium and its pathogenicity against
 85 *Diatraea saccharalis* (*Lepidoptera Crambidae*)
 86 and *Tetranychus urticae* (*Acari: Tetranychidae*). *J*
 87 *Invertebr Pathol.*, **81**, 70-77

- 1 Arcas JA; Díaz BM; Lecuona RE. (1999).
2 Bioinsecticidal activity of conidia and dry
3 mycelium preparations of two isolates of
4 *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer
5 *Diatraea saccharalis*. *J Biotech.*, **67**, 151-158
- 6 Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S. (2005). Effect
7 of aeration and substrate moisture content on
8 sporulation of *Metarhizium anisopliae* Var.
9 *acridum*. *Process Biochem.*, **40**, 1037-1042
- 10 Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R; Gutiérrez-
11 Rojas M; Viniegra-González G; Saucedo-
12 Castañeda, G. (2002). Criteria for the selection of
13 strains of entomopathogenic fungi *Verticillium*
14 *lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme*
15 *Microbial Technol.*, **30**, 910-915
- 16 Boucias, D; Pendland JC, Latge JP. (1988).
17 Nonspecific factors involved in attachment of
18 entomopathogenic deuteromycetes to host insect
19 cuticle. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1795-1805
- 20 Dalla-Santa HS, Dalla-Santa OR, Brand D,
21 Vandenberghe LPS, Soccol CR. (2005). Spore
22 Production of *Beauveria bassiana* From Agro-
23 Industrial Residues. *Braz Arch Biol Techn.*, **48**,
24 51-60
- 25 Dalla-Santa HS, Sousa NJ, Brand D, Dalla-Santa
26 OR, Pandey A, Sobotka M, Paca J, Soccol CR.
27 (2004). Conidia production of *Beauveria sp.* by
28 solid state fermentation for biocontrol of *Ilex*
29 *paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiol.*, **49**,
30 418-422
- 31 Durand A, Pichon P, Desgranges C. (1988).
32 Approaches to KLa measurements in solid state
33 fermentation. *Biotechnol Tech.*, **2**, 11-16
- 34 Feng KC, Liu L Tzeng MY. (2000). *Verticillium*
35 *lecanii* spore production in solid-state and liquid-
36 state fermentations. *Bioprocess Eng.*, **23**, 25-29
- 37 Fuguest R, Vey A. (2004). Comparative analysis of
38 the production of insecticidal and melanizing
39 macromolecules by strains of *Beauveria spp.*: in
40 vivo studies. *J Invertebr Pathol* **85**: 152-167
- 41 Fuxa JR. (1987). Ecological considerations for the
42 use of entomopathogens in IPM. *Annu Rev*
43 *Entomol.*, **32**, 2225-251
- 44 Gervais P, Molin P, Grajek W, Bensoussan M.
45 (1988). Influence of the water activity of a solid
46 substrate on the growth rate and sporogenesis of
47 filamentous fungi. *Biotechnol Bioeng.*, **31**, 457-
48 463
- 49 Jeffs LB, Khachatourians GG. (1997). Estimation
50 of spore hydrophobicity for members of the
51 genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and
52 *Tolypocladium* by saltmediated aggregation and
53 sedimentation. *Canadian J. Microbiol.*, **43**, 23-28
- 54 Kamp AM, Bidochka MJ. (2002). Conidia
55 production by insect pathogenic fungi on
56 commercially available agars. *Lett Appl*
57 *Microbiol.*, **35**, 74-77
- 58 Kang SW, Lee SH, Yoon CS, Kim SW. (2005).
59 Conidia production by *Beauveria bassiana* (for
60 the biocontrol of a diamondback moth) during
61 solid-state fermentation in a packed-bed
62 bioreactor. *Biotechnol Lett.*, **27**, 135-139
- 63 Larroche C. (1996). Microbial growth and
64 sporulation behaviour in solid state fermentation.
65 *J Sci Ind Res.*, **55**, 408-423
- 66 Loera O, Viniegra-González G. (1998).
67 Identification of growth phenotypes in *Aspergillus*
68 *niger* pectinase overproducing mutants using
69 image analysis procedures. *Biotechnol Tech.*, **12**,
70 801-804
- 71 Montiel-González AM, Viniegra-González G,
72 Fernández FJ, Loera O. (2004). Effect of water
73 activity on invertase production by improved
74 diploids strains of *Aspergillus niger*. *Process*
75 *Biochem.*, **39**, 2085-2090
- 76 Pandey A. (2003). Solid-state fermentation.
77 *Biochem Eng J.*, **13**, 81-84
- 78 Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M,
79 Mozaffari J. (2006). Variation in virulence of
80 *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to
81 some morphological characteristics. *Biocontrol*
82 *Sci Technol.*, **16**, 525-534

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

M. en B. OSCAR NUÑEZ GAONA

El día 31 de julio del 2009

COMITÉ TUTORIAL:

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesor: Dr. Jesus Gerardo Saucedo Castañeda

Asesora: Dra. Raquel Alatorre Rosas

JURADO:

Presidente: Dr. Jesus Gerardo Saucedo Castañeda

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario: Dr. Segio Huerta Ochoa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Vocal: Dra. Raquel Alatorre Rosas

Colegio de Posgraduados

Vocal: Juan Esteban Barranco Florido

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco