



**Universidad Autónoma Metropolitana**  
*Unidad Iztapalapa*

---

**“Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida”**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

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

**ALI ASAFF TORRES**

**Director**

**Dr. Gustavo Viniegra González**

**Dra. Mayra de la Torre Martínez**

**Julio 2006**

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Postgrado del CONACYT”.

El presente trabajo de Tesis fue desarrollado con financiamiento del Proyecto N° 38522-B del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) “Fotoconidiación y producción de metabolitos insecticidas en *Paecilomyces fumosoroseus*”.

Iztapalapa, D.F., a 7 de julio de 2006

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

“Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces  
fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida”

---

que presentó

**Ali Asaff Torres**

---

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gustavo Viniegra González  
Codirectora: Dra. Mayra de la Torre Martínez  
Asesor: Dr. Carlos Cerda García-Rojas

Jurado:

Presidente: \_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario: \_\_\_\_\_  
Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal: \_\_\_\_\_  
Dr. Ernesto Favela Torres

Vocal: \_\_\_\_\_  
Dra. Amelia Farrés González

## ***Dedicatoria***

*A mis padres, que ayer me dieron la vida y sabias enseñanzas para triunfar y no desmayar en su transcurrir, y a quienes hoy son mi razón de vivir, Paola y Andrea.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis directores de tesis Dra. Mayra de la Torre y Dr. Gustavo Viniegra, infinitas gracias por la formación y el apoyo.

A mi asesor, Dr. Carlos Cerda y al Dr. Octavio Loera, gracias por su tiempo y consejos.

A todos mis maestros de la Universidad Autónoma Metropolitana, gracias por sus valiosas enseñanzas.

A María del Carmen, Samuel y María Isabel, gracias por todo el apoyo y comprensión brindados no solo durante la realización de este trabajo, sino también en todas mis actividades.

A Yolanda Reyes, Mónica Sánchez, Divanery Rodríguez, Octavio Gómez, Orlando Melchi, Calixto Ortega, Juan Sánchez, Alberto Martínez y David Flores, gracias porque de una u otra manera contribuyeron a la culminación de la tesis.

A México, gracias y mi eterno reconocimiento por haberme brindado la oportunidad de alcanzar una de mis principales metas académicas.

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VII
NOMENCLATURA.....	IX
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XII
1. REVISION DE LA LITERATURA.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Hongos como agentes de control biológico.....	1
1.2.1. <i>Generalidades</i> .....	1
1.2.2. <i>Mecanismo patogénico</i> .....	2
1.3. Producción de hongos entomopatógenos .....	3
1.3.1. <i>Generalidades</i> .....	3
1.3.2. <i>Patrones de crecimiento y transferencia de oxígeno en FS y FL</i> .....	5
1.4. Producción y detección de metabolitos con actividad insecticida.....	7
1.5. <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> como agente de biocontrol.....	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. OBJETIVOS .....	14
3.1. Objetivo general .....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y METODOS.....	15
4.1. Microorganismo .....	15
4.2. Medios de cultivo .....	15
4.2.1. <i>Para la obtención de esporas</i> .....	15

4.2.2.	<i>Para fermentación sólida y líquida</i> .....	15
4.3.	Condiciones de cultivo .....	17
4.3.1.	<i>Para la obtención de esporas y preparación de inóculo</i> .....	17
4.3.2.	<i>Fermentación líquida en matraz</i> .....	18
4.3.3.	<i>Fermentación sólida en matraz</i> .....	18
4.3.4.	<i>Fermentación líquida en fermentador</i> .....	18
4.4.	Técnicas analíticas.....	18
4.4.1.	<i>Conteo de esporas</i> .....	18
4.4.2.	<i>Determinación de biomasa en fermentación líquida</i> .....	19
4.4.3.	<i>Determinación de biomasa en fermentación sólida</i> .....	19
4.4.4.	<i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i> .....	19
4.4.5.	<i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i> .....	19
4.4.6.	<i>Espectrometría de masas (MS)</i> .....	20
4.4.7.	<i>Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)</i> .....	20
4.4.8.	<i>Ácido dipicolínico</i> .....	20
4.4.9.	<i>Ácido oxálico</i> .....	20
4.4.10.	<i>CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub></i> .....	20
4.4.11.	<i>Glucosa y glutamato</i> .....	21
4.5.	Bioensayos.....	21
4.6.	Ajuste de parámetros y modelos cinéticos .....	22
4.6.1.	<i>Crecimiento</i> .....	22
4.6.2.	<i>Consumo de sustratos</i> .....	23
4.6.3.	<i>Producción de metabolitos</i> .....	24
5.	EFFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE METABOLITOS CON POTENCIAL INSECTICIDA .....	26
5.1.	Introducción.....	26

5.2.	Montaje del bioensayo y evaluación de su sensibilidad a metabolitos del hongo .....	27
5.3.	Selección de los medios de cultivo.....	28
5.4.	Crecimiento de <i>P. fumosoroseus</i> en diferentes medios y toxicidad de los sobrenadantes .....	30
5.5.	Análisis fisico-químico de los sobrenadantes.....	32
5.6.	Selección y aislamiento de las principales fracciones activas.....	37
5.7.	Identificación de los compuestos activos .....	38
5.8.	Contenido de ácidos y correlación con la toxicidad de los sobrenadantes.....	39
6.	EFFECTO DE LA COMPOSICION DEL MEDIO, CONDICIONES DE OPERACIÓN Y SISTEMA DE FERMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE DPA Y OXA .....	45
6.1.	Introducción.....	42
6.2.	Cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y producción de DPA en tres medios seleccionados (M1, M3 y M4). .....	42
6.3.	Influencia de algunos oligoelementos .....	47
6.3.1.	<i>Efecto del calcio</i> .....	47
6.3.2.	<i>Efecto del zinc a nivel de matraz</i> .....	48
6.3.3.	<i>Efecto del zinc en fermentador sin limitación de oxígeno</i> .....	57
6.4.	Efectos de la limitación de oxígeno en fermentador .....	63
6.5.	Efecto del sistema de cultivo.....	66
7.	CONCLUSIONES.....	71
8.	RECOMENDACIONES .....	73
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	75

ANEXOS.....	89
A.1. Efecto del oxígeno sobre la formación de propágulos de <i>P. fumosoroseus</i> en fermentación líquida.....	89
<i>A.1.1. Introducción</i> .....	89
<i>A.1.2. Efecto del oxígeno durante el cultivo en fermentador</i> .....	89
A.2. Efecto del zinc y el sistema de cultivo sobre la formación de propágulos infectivos de <i>P. fumosoroseus</i> .....	93
A.3. Artículo publicado .....	94

## NOMENCLATURA

$C$	carbono
DPA	ácido dipicolínico
FL	fermentación líquida
FS	fermentación sólida
$m$	coeficiente de mantenimiento [ $\text{mol } C$ (sustratos) $\text{mol}^{-1}C$ (biomasa) $\text{h}^{-1}$ ]
OXA	ácido oxálico
OXAA	oxaloacetato
$q_{p/x}$	productividad específica de producto en base a biomasa [ $\text{g}$ (producto) $\text{g}^{-1}$ (biomasa) $\text{h}^{-1}$ ]
$X_{\text{max}}$	concentración de la biomasa máxima [ $\text{g}$ (biomasa) $\text{L}^{-1}$ ]
$Y_{SX}$	rendimiento molar de biomasa en base a sustratos [ $\text{mol } C$ (biomasa) $\text{mol}^{-1}C$ (sustratos)]
$Y_{X/S}^R$	rendimiento verdadero de biomasa en base a sustratos [ $\text{g}$ (biomasa) $\text{g}^{-1}$ (sustratos)]
$Y_{Pi/S}^R$	rendimiento verdadero de producto en base a sustratos, [ $\text{g}$ (producto) $\text{g}^{-1}$ (sustratos)]

## Símbolos griegos

$\alpha_i$	coeficiente asociado a crecimiento para el producto $i$ , [ $\text{mol } C$ (producto) $\text{mol}^{-1}C$ (biomasa)]
$\beta_i$	coeficiente no asociado a crecimiento para el producto $i$ , [ $\text{mol } C$ (producto) $\text{mol}^{-1}C$ (biomasa) $\text{h}^{-1}$ ]
$\mu_{\text{max}}$	máxima velocidad específica de crecimiento [ $\text{h}^{-1}$ ]

---

---

## RESUMEN

*Paecilomyces fumosoroseus* es uno de los agentes de biocontrol más efectivos contra la mosquita blanca, *Bemisia* spp. y puede ser cultivado, tanto en fermentación sólida (FS), como en fermentación líquida (FL). Al igual que otros hongos entomopatógenos, este microorganismo produce metabolitos, como péptidos cíclicos, ácido dipicolínico (DPA) y ácido oxálico (OXA), que pueden tener actividad insecticida *in vivo* y/o *in vitro*. Sin embargo, los efectos del medio, condiciones de cultivo y sistema de fermentación sobre su producción y la de otros metabolitos con posible actividad insecticida son poco conocidos.

El trabajo desarrollado estuvo dividido en dos partes. La primera de ellas referida a la búsqueda de otros metabolitos con potencial insecticida sintetizados por el hongo. Para ello se montó un bioensayo con *Artemia salina*. La segunda parte del trabajo estuvo referida al estudio de la influencia del sistema de fermentación, la composición del medio y las condiciones de cultivo sobre la producción de biomasa y de los principales metabolitos insecticidas de *P. fumosoroseus*.

Se encontró que *P. fumosoroseus* produce, además de DPA, OXA en cantidades importantes ( $2.5-7.5 \text{ g L}^{-1}$ ), superiores a las producidas por otros hongos entomopatógenos. Este metabolito resultó ser el componente activo principal de las fracciones tóxicas de los sobrenadantes del cultivo del hongo. Sin embargo, debido a las concentraciones altas de OXA, a la interferencia producida por algunos componentes de los medios de cultivo, así como a la sensibilidad del bioensayo utilizado, no se pudo establecer la presencia de otros metabolitos, como péptidos cíclicos, con potencial insecticida.

Se observó que en FL en matraz, la síntesis de DPA fue inhibida a concentraciones elevadas de calcio ( $\approx 2700 \mu\text{M}$ ), mientras que la producción de OXA, DPA y pigmentos, probablemente sideróforos, se vio favorecida a concentraciones bajas de zinc ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ), en desmedro de la síntesis de biomasa. Sin embargo, en FS, el zinc no tuvo efecto sobre la producción de OXA y DPA, además que en este sistema de cultivo hubo un incremento notable en la velocidad de crecimiento y el consumo de sustratos, siendo el carbono utilizado preferentemente para la formación de biomasa. Estos resultados indican que *P. fumosoroseus*

responde de manera diferente a la escasez de zinc si se cultiva en FL o en FS y que estas diferencias pudieran deberse a desequilibrios entre la demanda bioquímica y la provisión de oxígeno ya que la orientación metabólica depende su suministro. Se sabe que en FS, hay una transferencia de oxígeno relativamente mayor y más eficiente que en FL.

En FL, en fermentador sin limitación de oxígeno ( $OD > 60\%$ ), hubo un incremento notable en la productividad de OXA ( $\approx 20$  veces) y DPA ( $\approx 7.6$  veces) en relación a los cultivos en matraz, probablemente gracias al control del pH. Sin embargo, bajo limitación de oxígeno ( $OD \approx 0\%$ ), el flujo de carbono fue direccionado preferentemente hacia la formación de biomasa y propágulos infectivos sumergidos antes que a la de ácidos orgánicos.

## ABSTRACT

*Paecilomyces fumosoroseus*, one of the most effective biocontrol agents for whitefly *Bemisia* spp., can be cultivated both in liquid (LF) and solid-state fermentation (SSF) systems. As other entomopathogenic fungi, this fungus produces metabolites like cyclic peptides, dipicolinic acid (DPA) and oxalic acid (OXA), which can have insecticidal activity either *in vivo* or *in vitro*. However, scarce information about how culture media, culture conditions and fermentation systems can enhance DPA and other insecticidal metabolites production is available.

This study was developed following two ways. First, the production of putative insecticidal metabolites was investigated; through a bioassay with the brine shrimp *Artemia salina*. On the other hand, the influence of broth composition, culture conditions and fermentation systems on biomass, DPA and OXA production was assessed.

It was observed that *P. fumosoroseus* produces, besides DPA, oxalic acid (OXA), at higher concentrations than other entomopathogenic fungi (2.5-7.5 g L<sup>-1</sup>). Oxalic acid was identified as the main active principle in the broth culture supernatants that were toxic to *A. salina*. However, due to the residual nutrients interference, the high bioassay sensibility and the high titers of OXA, no other insecticidal metabolites could be identified.

During flask shake cultures, DPA production was inhibited at high calcium titers ( $\approx$  2700  $\mu$ M), while, OXA, DPA and other pigments, probably siderophores, production were enhanced by low zinc concentrations ( $<$  1  $\mu$ M), but biomass synthesis was diminished. Nevertheless, OXA and DPA production were not affected by zinc concentration during SSF, and high growth specific rates and substrate consumption rates were achieved in this culture system, and carbon was employed mainly to biomass synthesis. Since the oxygen availability determines the fungal metabolism and is known that in SSF the oxygen transfer rate is higher than in LF, the different behavior of *P. fumosoroseus* to zinc deprivation in both culture systems could be due to an oxygen limitation, i.e. the oxygen demand might be higher than the oxygen transfer rate in LF.

Fungal cultures in a stirred tank reactor without oxygen limitation ( $OD > 60\%$ ), resulted in a high improvement of OXA ( $\approx 20$  times) and DPA ( $\approx 6.6$  times) productivities, probably due to the pH control. However, with oxygen limitation ( $OD \approx 0\%$ ), carbon fluxes were directed to biomass and submerged propagule formation, and therefore OXA and DPA productivities dropped significantly.

## **1. REVISION DE LA LITERATURA**

### **1.1. Introducción**

Dentro de las prácticas de la agricultura moderna, el uso de los insecticidas químicos ha permitido el control de las plagas de insectos incrementando considerablemente los rendimientos de los cultivos. Sin embargo, se ha establecido que estos compuestos son altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas; además de que favorecen la selección de insectos resistentes, lo que ha llevado al uso de dosis cada vez mayores o de productos más tóxicos [Asaff y col., 2002]. Por esta razón, actualmente existe una tendencia creciente del manejo integrado de plagas (MIP), que es la aplicación racional de una combinación de prácticas biológicas, biotecnológicas, químicas, físicas y de cultivo o de selección de vegetales de modo que la utilización de productos fitosanitarios químicos se limite al mínimo necesario para mantener la población de la plaga en niveles inferiores a los que producirían daños o pérdidas inaceptables desde un punto de vista económico.

Dentro de las prácticas biológicas está el llamado control biológico que es la manipulación intencional de los enemigos naturales o antagonistas de los insectos plaga para limitar su población. A estos organismos se los llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parasitoides, así como patógenos de insectos, entre los que se incluyen virus y diferentes géneros y especies de protozoos, bacterias, hongos y nemátodos [Asaff y col., 2002].

### **1.2. Hongos como agentes de control biológico**

#### **1.2.1. Generalidades**

De los diferentes agentes utilizados en el control biológico, los hongos entomopatógenos son los únicos capaces de infectar a los insectos chupadores gracias a su poder de penetración de la cutícula [Lacey y col., 1996]. Hasta la fecha se han identificado más de 750 especies de hongos entomopatógenos pertenecientes a casi 100 géneros, la mayoría de los cuales se encuentran clasificados entre las divisiones Zigomicota (orden entomoptorales), Deuteromicota (hifomicetos) y Ascomicota [Roberts, 1989; Hegedus y col.,

1995; Khachatourians, 1996]. Sin embargo, solo 10 de ellos (Tabla 1) han sido o vienen siendo usados corrientemente en formulaciones comerciales o experimentales para el control de insectos [Lacey y col., 2001].

**Tabla 1. Principales hongos entomopatógenos**

<b>Género/Especie</b>	<b>Insectos blanco</b>
<b><u>Comerciales</u></b>	
<i>Beauveria bassiana</i>	Langostas, escarabajos, áfidos
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Escarabajos, chinches, picudo del algodón, gorgojos
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosquita blanca
<i>Verticillium lecanii</i>	Afidos
<b><u>Experimentales</u></b>	
<i>Aschersonia aleyrodis</i>	Mosquita blanca
<i>Beauveria brogniartii</i>	Moscas, escarabajos
<i>Langenedium giganteum</i>	Mosquitos
<i>Metarhizium flavoviride</i>	Langostas
<i>Nomuraea rileyi</i>	Gusanos
<i>Paecilomyces farinosus</i>	Langostas, moscas tse tsé

Modificada de Lacey y col., 2001

### **1.2.2. Mecanismo patogénico**

El inicio del proceso infeccioso se da por la adhesión de una espóra fúngica a la cutícula del insecto. En este proceso se involucran interacciones electrostáticas del tipo hidrofóbico [Boucias y col., 1988; Hegedus y col., 1992], en las cuales el área de contacto juega un papel importante, existiendo una correlación significativa entre el tamaño de las esporas y la virulencia [Altre y col., 1999].

Una vez adherida la espóra se inicia su germinación, desencadenada por señales provenientes del medio externo y que generalmente son carbohidratos presentes en las proteínas cuticulares de los insectos [Hegedus y col., 1995; Khachatourians, 1996]. En una siguiente etapa, la espóra del hongo ya germinada debe vencer la barrera primaria del insecto constituida por la cutícula. Este proceso se da por una combinación tanto de fuerzas mecánicas

como por la acción de diferentes enzimas como proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas entre otras, las cuales van degradando la cutícula y proporcionan a su vez nutrientes al hongo [Roberts y Yendol, 1971; Khachatourians, 1991; Hegedus y Khachatourians, 1995; Khachatourians, 1996]. En este proceso también intervienen ciertos ácidos orgánicos como el ácido cítrico y el ácido oxálico que coadyuvan a solubilizar las proteínas cuticulares [Bidochka y Khachatourians, 1991].

Una vez dentro del insecto, el hongo prolifera formando cuerpos hifales, los cuales se reproducen por gemación, que se van diseminando rápidamente a través del hemocele. También se ha reportado que además de los cuerpos hifales, durante el proceso invasivo los hongos forman micelio y propágulos tipo conidios [Cantone y Vandenberg, 1999].

Durante este periodo, una actividad común de los hongos entomopatógenos, es la secreción de sustancias tóxicas que les permite evadir o suprimir la respuesta inmune del insecto [Vilcinskas y col., 1999, Vey, 2002] y suelen ser la causa directa de la muerte del hospedero. La supresión de la respuesta inmune celular está relacionada en algunos casos con la disminución de la actividad fagocítica de células especializadas por la alteración de la formación de su cito-esqueleto [Vilcinskas y col., 1997<sup>a</sup>; Vilcinskas y col., 1997<sup>b</sup>].

Una vez suprimida o rebasada la respuesta inmune del insecto se produce una invasión generalizada por el hongo de diversos tejidos y órganos como cuerpos grasos, túbulos de Malpighi y tubo digestivo (septicemia). El insecto normalmente muere después de 3 a 14 días de iniciada la infección, probablemente por una combinación de daño mecánico en tejidos (causado por la pérdida de agua), falta de nutrientes y toxicosis [Gillespie y Claydon, 1989]. Una vez muerto el insecto, el hongo aprovecha los pocos nutrientes que quedan y crece en forma miceliar hacia el exterior, las hifas penetran la cutícula, emergen a la superficie e inician la formación de nuevas esporas [Roberts y Yendol, 1971] si las condiciones de humedad son adecuadas.

### **1.3. Producción de hongos entomopatógenos**

#### **1.3.1. Generalidades**

El producto buscado de los hongos entomopatógenos son sus propágulos infectivos tales como conidios, blastosporas, clamidiosporas, oosporas y zigosporas [Deshpande, 1999].

En la mayor parte de los casos la producción masiva de hongos entomopatógenos se realiza por fermentación sólida (FS), la cual fue desarrollada desde hace varios siglos en los países orientales [Hölker y Lenz, 2005], donde hoy en día continúa siendo la técnica preferida para la producción de hongos entomopatógenos [Feng y col., 1994]. El uso de este sistema de cultivo también se ha extendido a muchos países latinoamericanos [Mendonça, 1992; Jenkins y col., 1998].

Si bien las características de los productos obtenidos en FS son notables, se requiere de mucha mano de obra y el control preciso de parámetros críticos como la humedad y la temperatura es complicado [Daigle y col., 1998], por lo cual los rendimientos obtenidos generalmente son variables. Sin embargo, gracias a los avances en el campo de la ingeniería de FS en los últimos 20 años [Bradley y col., 1992; Roussos y col., 1993; Suryanarayan, 2003], la utilización de este sistema de producción ha ido creciendo [Robinson y col., 2001; Soccol y Vandenberghe, 2003]. Adicionalmente, se ha señalado que la FS ofrece muchas ventajas como por ejemplo, bajos costos de producción [Castilho y col., 2000], altas productividades, mayor estabilidad de los productos, bajos requerimientos de agua y energía, coeficientes de transferencia de masa altos, formación de espuma nula [Hölker y Lenz, 2005; Suryanarayan, 2003].

Aunque en menor escala, la fermentación líquida (FL) también es utilizada para la producción de unidades infectivas de hongos entomopatógenos, como las blastosporas o propágulos tipo conidios [Jackson y col., 1997; Issaly y col., 2005], sobre todo por la creciente presión de racionalización y estandarización de procesos y los problemas de escalamiento [Hölker y Lenz, 2005].

En los procesos en FS, generalmente se utilizan medios complejos heterogéneos como trigo, arroz y sus salvados, soya o soportes sólidos degradables, humidificados con una solución nutritiva [Dorta y Arcas, 1998; Koutinas y col., 2003], los cuales difieren sustancialmente de los medios de cultivo homogéneos empleados en FL [Jackson y col., 1997]. Por esta razón, se dificulta realizar una evaluación comparativa de rendimientos y cinéticas de producción entre ambos sistemas de cultivo. Hasta la fecha no se han podido explicar claramente las diferencias fisiológicas encontradas en un mismo microorganismo cultivado en FS o en FL y únicamente se han sugerido algunas hipótesis. Esta carencia de

información dificulta la evaluación del valor que tiene un sistema frente al otro, lo cual entorpece el enfoque fundamental de optimización y diseño de procesos [Viniegra y col., 2002].

Para vencer esta limitante, Raimbault y col. (1990) desarrollaron un sistema de dos fases formado por un soporte poroso compresible inerte al cual se agrega un medio nutritivo. Este caldo de fermentación forma entre los intersticios del soporte, películas muy delgadas de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  de espesor sobre las que se desarrollan los hongos en un cultivo de superficie [Romero-Gómez, 2001], que es una forma simplificada de la FS. Este sistema permite realizar estudios fisiológicos básicos, ya que es posible controlar la composición del medio, el desarrollo de biomasa y la formación de productos.

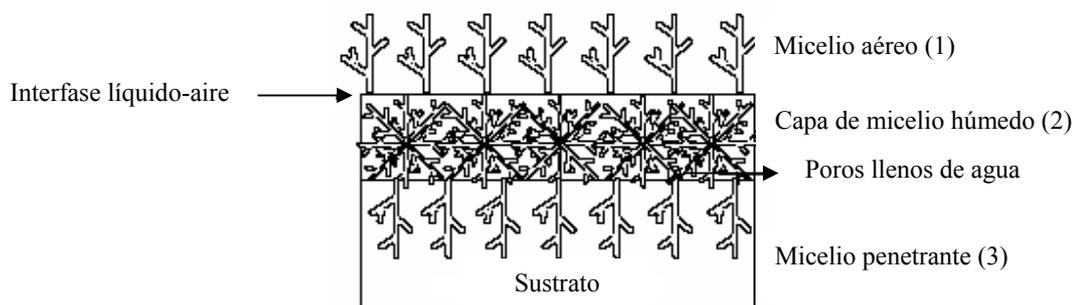
### **1.3.2 Patrones de crecimiento y transferencia de oxígeno en FS y FL**

Los cultivos de hongos tienen diferentes patrones de crecimiento de acuerdo al sistema utilizado. En FL, los hongos están expuestos a fuerzas hidrodinámicas y crecen formando pequeños agregados o esférulas y como micelio libre [Papagianni y col., 2001].

Dicho patrón de crecimiento determina en muchas ocasiones la producción de metabolitos debido a que la difusividad efectiva de oxígeno cambia de acuerdo al tamaño de las esférulas o al crecimiento micelial, afectando la actividad biológica de los microorganismos [Papagianni y col., 2001].

En FL, el oxígeno contenido en las burbujas de aire difunde a través de la capa límite donde se disuelve en la interfase gas-líquido. Luego el oxígeno disuelto difunde a través de la película líquida que envuelve la burbuja gaseosa antes de entrar en el seno del líquido donde queda disponible para los microorganismos [Thibault y col., 2000].

En FS, el crecimiento de los hongos está restringido generalmente a la superficie de una matriz sólida [Papagianni y col., 2001] donde el desarrollo micelial va creando un sistema compuesto de tres zonas claramente distinguibles:



**Figura 1.** Esquema del crecimiento de hongos en FS (Modificado de Rahardjo y col., 2002)

La zona 1, en la que el micelio aéreo se encuentra espaciado, es en muchos casos la región donde ocurre hasta un 75% del consumo de oxígeno [Biesebecke y col., 2002]. Gracias a que las hifas se encuentran en un contacto más íntimo con el oxígeno gaseoso que fluye entre los espacios del lecho empacado [Thibault y col., 2000], en esta zona no existe limitación en la difusión de oxígeno [Rahardjo y col., 2002].

En la zona 2 las hifas forman un entramado muy denso y quedan inundadas por la cantidad relativamente pequeña de líquido del medio ambiente. Se trata de una zona donde existe una fuerte limitación a la difusión de oxígeno al no haber convección forzada del líquido como en la FL [Oostra y col., 2001].

La zona 3 es la que está constituida por las hifas que penetran al material sólido usado como soporte y sustrato y que permiten al hongo acceder a más nutrientes. Es una capa caracterizada por estar en anoxigenia [Rahardjo y col., 2002].

En el sistema desarrollado por Raimbault y col. (1990), únicamente se tienen las dos primeras zonas y en el caso de la zona inundada, el grosor fino de la película ( $\approx 60 \mu\text{m}$ ), aireada por ambos lados, no constituye una barrera severa a la difusión de oxígeno.

En las fermentaciones aerobias, la transferencia de oxígeno a los microorganismos es indudablemente el fenómeno más importante para mantener la actividad microbiana. La velocidad de transferencia de oxígeno a las células es el factor limitante que determina la conversión biológica [Thibault y col., 2000]. Dadas las características de los sistemas descritos, los rendimientos de productos de fermentación obtenidos difieren considerablemente entre sí [Robinson y col., 2001; Viniegra y col., 2002].

#### 1.4. Producción y detección de metabolitos con actividad insecticida

Un tema muy común en la literatura de patología de insectos es la producción de toxinas por diversas especies de hongos entomopatógenos. Una revisión de la literatura de las últimas décadas muestra un considerable número de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que han sido aislados de patógenos de insectos (Tabla 2), muchos de los cuales han demostrado poseer una actividad insecticida marginal [Gillespie y Claydon, 1989].

**Tabla 2. Principales metabolitos producidos por hongos entomopatógenos**

Clasificación	Hongos que las producen
<u>No peptídicas</u>	
Oosporeína	<i>B. tenella</i> , <i>B. bassiana</i>
Tenellina	<i>B. tenella</i>
Bassianina	<i>B. bassiana</i>
Acido oxálico	<i>Beauveria</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Metarhizium</i>
Acido fusárico	<i>Fusarium</i>
Acido dipicolínico	<i>Beauveria</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Verticillium</i>
Paecilomicinas	<i>Paecilomyces tenuipes</i>
<u>Peptídicas lineales</u>	
Leucinostinas	<i>Paecilomyces</i>
Efraeptinas	<i>Tolyocladium</i>
<u>Peptídicas cíclicas</u>	
Beuvericina	<i>B. bassiana</i> , <i>Paecilomyces</i>
Beauverólidos	<i>B. bassiana</i> , <i>Paecilomyces</i>
Destruxinas	<i>Metarhizium</i>
Eniáticas	<i>Fusarium</i>
Ciclosporinas	<i>Metarhizium</i>

Modificada de Khachatourians, 1996

Aunque menos estudiadas, también se ha observado que diferentes macromoléculas de naturaleza proteica tienen un efecto insecticida notable como las proteínas melanizantes de *Beauveria bassiana* (Fuguet y Vey, 2004; Fuguet y col., 2004), una glicoproteína de

---

---

*Beauveria sulfurescens* [Mollier y col., 1994] y la hirsutellina A, aislada de *Hirsutella thompsonii* [Wei-Zhen y col., 1995].

Muchos de los metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos son comunes para varios de ellos y han sido detectados en la mayoría de los casos por su producción *in-vitro*, la cual es afectada significativamente por las condiciones y la composición del medio de cultivo [Khachatourians, 1991].

Por ejemplo, se encontró que los rendimientos de producción de destruxinas por *Metarhizium anisopliae*, cambiaron considerablemente de acuerdo al sistema de cultivo (FS o FL). Asimismo, los rendimientos fueron afectados positivamente por un incremento de peptona en el medio y negativamente por el pH [Wang y col., 2004]. Adicionalmente, se reportó que en FL, el tamaño de las esférulas formadas por *Metarhizium anisopliae* y el tipo de reactor incidieron notablemente en la producción de destruxinas, debido a la disponibilidad de oxígeno [Kuo-Ching y col., 2004]. Por otro lado, la producción de otros depsipéptidos se vio afectada por la fuente de carbono y a su vez fue favorecida por fuentes inorgánicas de nitrógeno [Billich y Zoher, 1988; Peeters, y col., 1983].

Se conoce que la producción de ciertos ácidos orgánicos como el oxálico y el cítrico dependen de la presencia de fuentes utilizables de carbono tales como glucosa, trehalosa o glicerol [Bidochka y Khachatourians, 1993], al igual que la síntesis de ciertos pigmentos con propiedades antibióticas e insecticidas. En *Beauveria bassiana* se observó que la síntesis de oosporeina ocurrió con glicerol como fuente de carbono y nitrato de sodio como fuente de nitrógeno. Por otro lado, el máximo rendimiento de bassianina se alcanzó con glucosa y glicina como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente [Khachatourians, 1991].

En los microorganismos la producción de diversos metabolitos y enzimas es regulada frecuentemente por represión catabólica, cuya función principal es asegurar y organizar una utilización secuencial de las fuentes de carbono, cuando más de una está presente en el medio. Bajo estas condiciones, la célula cataboliza la fuente de carbono de más fácil procesamiento como la glucosa, mientras que la síntesis de ciertas enzimas requeridas para la utilización de otros sustratos es reprimida hasta que el sustrato primario se haya agotado [Sánchez y Demain, 2002]. Por otro lado, la regulación del nitrógeno es de un amplio significado industrial, ya que afecta la síntesis de enzimas involucradas tanto en el metabolismo primario como en el

secundario [Sánchez y Demain, 2002]. Muchas rutas metabólicas secundarias son afectadas negativamente por fuentes de nitrógeno favorables para el crecimiento, como por ejemplo las sales de amonio [Shapiro, 1989]. Este catión, juega sin duda un papel central en el metabolismo del nitrógeno en hongos filamentosos [Adrianopoulos y col., 1998]. Por ello los medios complejos de producción a menudo solo incluyen una fuente proteica, mientras que los químicamente definidos contienen un aminoácido de asimilación lenta, a fin de asegurar una producción de metabolitos secundarios elevada [Sánchez y Demain, 2002]. Los aminoácidos pueden ser utilizados por los hongos filamentosos tanto como fuente de nitrógeno como de carbono. Adicionalmente, la alteración sistemática de otros parámetros de fermentación como: aireación, pH, tipo de reactor, sistema de fermentación, adición de inhibidores enzimáticos, etc., permite incrementar el número de metabolitos secundarios de una sola fuente microbiana [Zahn y col., 2001; Bode y col., 2002].

Un aspecto crucial en la investigación de actividades biológicas, es la disponibilidad de un bioensayo adecuado para monitorear los efectos buscados. Idealmente los sistemas de prueba deben ser rápidos, reproducibles, baratos y con una alta capacidad de procesamiento de muestras [Hostettmann y Wolfender, 1997]. Un método interesante para la detección de productos, fracciones y metabolitos con potencial insecticida es el bioensayo con *Artemia salina*. Este bioensayo cumple con todos los requisitos de un sistema ideal de prueba y ha sido ampliamente utilizado para la evaluación de toxicidad de pesticidas y otros productos provenientes de plantas, bacterias y hongos [Hamill y col., 1969; Hartl y Humpf, 2000; Sarker y col., 2001].

*Artemia salina* es un pequeño crustáceo de la subclase de los anostráceos que vive en las aguas salobres e hipersalinas de todo el mundo. Cuando el ambiente es demasiado salado ponen huevecillos recubiertos por una película dura a los que se denomina quistes y que se pueden conservar durante mucho tiempo, eclosionando cuando las condiciones son propicias. Luego de un periodo aproximado de 24 h de incubación de los quistes, nacen las larvas del crustáceo a las que se denomina nauplios, los cuales son empleados para los bioensayos.

### 1.5. *Paecilomyces fumosoroseus* como agente de biocontrol

En los últimos años, uno de los hongos entomopatógenos más empleado es *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith. Este microorganismo es capaz de infectar a una gran variedad de insectos [Smith, 1993]; sin embargo, su acción conocida más efectiva es contra *Bemisia* spp. “mosquita blanca”, insecto chupador polífago extendido en todo el mundo y que anualmente causa millonarias pérdidas en la agricultura. *Paecilomyces fumosoroseus* es capaz de infectar a la mosquita blanca en todas sus etapas de desarrollo, incluyendo huevos, provocando altos niveles de mortalidad a una velocidad mayor que otros hongos entomopatógenos [Osborne y Landa, 1992]. Existen reportes sobre la muerte de estos insectos entre las 24 a 48 horas posteriores a la aplicación de sus esporas, sugiriendo la producción de toxinas por el hongo [Osborne, 1990].

Trabajos posteriores mostraron que los sobrenadantes de algunos medios de cultivo de *P. fumosoroseus* presentan actividad insecticida moderada sobre larvas de mosquita blanca [Osuna y col., 2003], gracias en parte a la producción de ácido dipicolínico (DPA) [Asaff y col., 2005]. Investigaciones previas señalaron que este compuesto resulta tóxico para larvas de la mosca *Calliphora erithrocephala* [Claydon y Grove, 1982]. Además de la producción de DPA, existen reportes a cerca de la síntesis de ácido oxálico (OXA) (Shima, 1955) y otro tipo de compuestos insecticidas e inmunoreguladores como beauvericina y beauverólidos [Bernardini y col., 1975; Jegorov y col., 1994] por *P. fumosoroseus*. Sin embargo, los estudios sobre su metabolismo secundario aún resultan escasos, a diferencia de los de otros hongos entomopatógenos como *Beauveria* y *Metarhizium*, conocidos por su amplia diversidad metabólica [Roberts, 1981].

En hongos, la biosíntesis de DPA se da a partir del dihidrodipicolinato, el cual es formado por condensación entre el piruvato y el aspartato semialdehído proveniente de la reducción del aspartato [Hodson y Foster, 1966; Kanie y col., 1966], que a su vez se sintetiza por la reacción entre el glutamato y el oxaloacetato (OXAA). A su vez, el OXA puede ser sintetizado por hidrólisis del OXAA a través de la enzima oxaloacetato hidrolasa [Kubicec y col., 1988] u oxaloacetasa [Munir y col., 2001] o por oxidación del glioxilato, mediante catálisis de la glioxilato oxidasa o glioxilato deshidrogenasa [Yoon y col., 2002]. Varios de los precursores del DPA y OXA son intermediarios o productos del ciclo de Krebs, el cual se sabe

---

es fuertemente regulado por los requerimientos energéticos de la célula. Por esta razón, diferentes factores que afectan el metabolismo energético como la disponibilidad de nutrientes, la naturaleza de la fuente de carbono y otros que inciden en la relación de las pozas de oxido reducción, como las condiciones de aireación y el sistema de cultivo, probablemente tengan un efecto directo en la producción de DPA y OXA. Asimismo, muchos de los complejos enzimáticos que regulan el ciclo de Krebs requieren de cationes metálicos para una actividad óptima y en muchos casos, cuando los medios de cultivo son deficientes en ellos, la pérdida de actividad conduce a una acumulación de los intermediarios del ciclo [Christopher y van Holde, 1998; Voet y Voet, 1995]. Por otro lado, la síntesis de beauvericina en *P. fumosoroseus* es similar a la de la eniatina en *Fusarium oxysporum* [Peeters y col., 1983], siendo mediada por la enzima multifuncional constitutiva eniatina sintetasa, cuya actividad puede ser inhibida a pH bajos [Billich y Zocher, 1988]. Al parecer la síntesis de beauvericina también sufre represión catabólica de carbono [Audhya y Russell, 1975], mientras fuentes de nitrógeno de cierta naturaleza, logran estimular su producción [Billich y Zocher, 1988; Peeters, y col., 1983].

*Paecilomyces fumosoroseus* puede ser cultivado tanto en FS, como en FL, en las cuales, diversos factores como la naturaleza de la fuente de carbono y de nitrógeno, su relación (C:N), la presencia de ciertos oligoelementos, el pH, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y la luz entre otros, afectan su crecimiento [López-y-López y col., 2000].

En FS, *P. fumosoroseus* se desarrolla como micelio aéreo mientras las condiciones medioambientales le sean favorables. Ante condiciones adversas, como la falta de nutrientes y una baja actividad de agua, se desencadena el proceso de esporulación. Las señales y el mecanismo que gobiernan dicho proceso son muy complejos y han sido poco estudiados en este hongo en particular, habiendo tan solo establecido que la luz es indispensable para que se inicie la conidiación en cultivos de superficie [Sánchez-Murillo y col., 2004]. Los conidios aéreos son los productos insecticidas mayormente utilizados por su virulencia y resistencia a condiciones adversas del medio como la radiación UV y la desecación [Thomas y col., 1987; Smits y col., 1997; Stephan y Zimmermann, 1998].

En FL, *P. fumosoroseus* puede crecer como micelio disperso (hifas libres) o formar esférulas, las cuales generalmente se originan al inicio de la fermentación por la agregación de

los conidios aéreos hidrófobos usados como inóculo. Adicionalmente, puede desarrollar otro tipo de propágulos, que de acuerdo a su forma y tamaño han sido clasificados como blastosporas y conidios sumergidos. Las blastosporas o también llamadas cuerpos hifales son células simples de pared delgada, de forma cilíndrica, con una relación de 3 a 4 veces de largo por una de diámetro, con la parte media más estrecha que los extremos y su tamaño es mayor al de los conidios aéreos y sumergidos. Se producen generalmente en medios que contienen fuentes complejas de nitrógeno y azúcares simples como fuente de carbono [Jackson y col., 1997; Jackson, 1999] y son menos resistentes a condiciones adversas del medioambiente por lo que su eficiencia como bioinsecticidas resulta contradictoria [Vandenberg y col., 1998; Fargues y col., 1994]. Los llamados conidios sumergidos son estructuras que se asemejan a un elipsoide de revolución (grano de arroz), con una relación aproximada de 2:1 entre el largo y el diámetro. Generalmente se producen en medios de cultivo formulados con una fuente de carbono simple y una fuente inorgánica de nitrógeno [de la Torre y Cárdenas-Cota, 1996]. Estos propágulos aparentemente son menos hidrofóbicos que los conidios aéreos pues a diferencia de estos últimos no tienden a agregarse y se encuentran dispersos en el medio de cultivo.

La ubicación taxonómica de *Paecilomyces fumosoroseus* según Ulloa y Herrera (1994) es la siguiente:

División: Deuteromycetes.

Subdivisión: Deuteromycotina.

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliacea.

Género: *Paecilomyces*.

Especie: *Paecilomyces fumosoroseus*.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Los hongos son conocidos por su capacidad de producir una gran variedad de compuestos bioactivos. En el caso de los hongos entomopatógenos en particular, se ha establecido que muchos de sus metabolitos presentan actividad insecticida, la cual puede ser aprovechada para potenciar su eficacia como agentes de control biológico si son formulados junto con sus propágulos infectivos. Sin embargo, existe poca información acerca de los diferentes factores que pueden afectar la producción de metabolitos insecticidas. Esta falta de conocimiento dificulta la elección de un proceso u otro, al no contarse con los elementos fundamentales para el diseño y optimización de procesos.

En este sentido se planteó la siguiente pregunta: ¿Cambios en la composición de los medios, los sistemas de cultivo y las condiciones de operación, pueden ocasionar un incremento en la producción de metabolitos insecticidas que se sabe produce *Paecilomyces fumosoroseus* o inducir la producción de otros nuevos?

El presente trabajo buscó dar respuesta a la interrogante planteada con el propósito de contribuir al escaso conocimiento en este campo; además, pretendió aportar nuevos elementos acerca del papel de los metabolitos insecticidas dentro del mecanismo patogénico, abrió la posibilidad de encontrar nuevos insecticidas, contribuyendo así al estudio de la química de productos naturales y permitió evaluar la bioseguridad de *Paecilomyces fumosoroseus* y sus metabolitos bajo los sistemas y condiciones de proceso ensayados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar si cambios en la composición de los medios, los sistemas de cultivo y las condiciones de operación pueden ocasionar un incremento en la producción de metabolitos insecticidas que se sabe produce *Paecilomyces fumosoroseus* o inducir la producción de otros nuevos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Establecer un bioensayo adecuado con el propósito de evaluar la producción de metabolitos tóxicos con potencial insecticida.
- Determinar la toxicidad de los sobrenadantes del cultivo de *P. fumosoroseus* producidos sobre diferentes medios y sistemas de fermentación a través del bioensayo.
- Seleccionar los sobrenadantes que muestren mayor toxicidad e identificar las fracciones y principios activos.
- Determinar cuales son los principales factores de un medio de cultivo que afectan la producción de DPA y los otros metabolitos insecticidas identificados.
- Establecer el efecto de algunas condiciones de operación como aireación y control de pH sobre la producción de DPA y los otros metabolitos insecticidas identificados.
- Evaluar el efecto del sistema de cultivo sobre la producción de DPA y los otros metabolitos insecticidas identificados.

---

---

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa Pfrd de *Paecilomyces fumosoroseus* obtenida de la colección del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico DGSV-SAGARPA, México. Se utilizaron esporas de primera generación, proporcionadas por el Centro de Ciencias de Sinaloa, obtenidas en tubos inclinados con medio SDYM (Sabouraud-Dextrosa, extracto de levadura y extracto de malta), los cuales habían sido previamente inoculados con esporas denominadas de generación “0”, e incubados a 27 °C hasta esporulación (aproximadamente 14 días), almacenados luego a 4 °C. Las esporas denominadas de generación “0” son aquellas aisladas de ninfas muertas de *Bemisia* spp. infectadas por el hongo. Las esporas de primera generación fueron empleadas como inóculo para la propagación del hongo en cajas Petri por siembra directa con asa microbiológica.

### 4.2. Medios de cultivo

#### 4.2.1. Para la obtención de esporas

Para la producción de conidios aéreos se utilizó un medio formulado con agar Sabouraud-Dextrosa (65 g L<sup>-1</sup>), suplementado con 10 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura (medio SDY), y pH ajustado a 5.6.

#### 4.2.2. Para fermentación sólida y líquida

Se utilizaron los medios de cultivo cuya composición se muestra en la Tabla 3 y puntos subsiguientes. Los medios M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M4BF, corresponden a medios de cultivo utilizados por He Zengguo en su estancia posdoctoral para la obtención de propágulos sumergidos de *P. fumosoroseus* cepa Pfrd. Los medios M3 Ca(-) y M3 Ca(+), corresponden a modificaciones del medio M3 utilizado por He Zengguo, con el propósito de efectuar evaluaciones específicas sobre el efecto del calcio en la síntesis de DPA. Por otro lado, M3 glut(+), es otra variante de M3 que se utilizó como medio para determinar el efecto del zinc, de las condiciones y del sistema de cultivo sobre la fisiología del hongo, que no

interfirió con las técnicas analíticas de HPLC utilizadas para la detección y cuantificación de ácidos orgánicos y que además permitió monitorear el consumo de la fuente de nitrógeno. El medio M8 (infusión de papa) es un medio muy común utilizado para el cultivo de hongos y fue seleccionado porque, a diferencia de los otros medios, tanto la fuente de carbono, como la de nitrógeno son complejas. El medio M9 fue seleccionado bajo los mismos criterios que M8 y corresponde al medio de cultivo utilizado para la producción de un pigmento rojo por *Paecilomyces siinclairii* [Cho y col., 2002]. Finalmente, el medio M3 glut(+) modificado para cinéticas en fermentador, es una variante de M3 glut(+), en la que tanto la fuente de carbono, como la de nitrógeno, fueron disminuidas en un 150% guardando por tanto la misma relación C:N. Esta modificación se efectuó con el propósito de evitar una formación excesiva de biomasa en el fermentador, la cual hubiese podido interferir con una adecuada transferencia de oxígeno y la mezcla del sistema.

**Tabla 3. Composición de los medios de cultivo empleados en los diferentes ensayos**

Componentes	Unidad	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M4BF	M3Ca(-)	M3Ca(+)	M3glut(+)
glucosa	g/L	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
ext. de levadura	g/L	5.00		0.05						0.05	0.05	
glutamato	g/L					2.50						16.70
Pep.de caseína "H"	g/L						20.00					
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L				1.12				1.12			
KNO <sub>3</sub>	g/L		10.00	10.00						10.00	10.00	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	g/L	0.70						1.17				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L	0.39	5.00	5.00	0.13	0.13		0.39	6.83	5.00	5.00	5.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O	g/L	1.42						1.42				
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	g/L	0.60	2.00	2.00	0.15	0.15		0.60	0.15	2.00	2.00	2.00
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L				2.40	2.40			2.40			
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	g/L		0.05	0.05	0.40	0.40			0.40		0.40	0.05
KCl	g/L	1.00			0.50	0.50		1.00	0.50			
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	mg/L		12.00					0.10				
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	mg/L		2.50					2.00				
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	mg/L		0.25					10.00				
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	mg/L		0.20					2.00				
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	mg/L		2.50	*	15.50	15.50		20.00	15.50			*
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	mg/L		0.50					3.00				
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	mg/L				5.00	5.00		20.00	5.00			
Na <sub>2</sub> EDTA	mg/L							60.00				
pH		6.00	5.00	5.00	5.00	5.60	5.60	6.00	5.00	5.00	5.00	5.00

\* Adición de solución de sulfato de zinc hasta alcanzar concentraciones deseadas

Adicionalmente se utilizaron los siguientes medios:

**M8** (Infusión de papa) preparado de la siguiente forma: 200 g de papa en 400 mL de agua se sometieron a ebullición durante 1 h, luego de decantar sólidos en suspensión se aforó el extracto a 1 L con agua destilada y se ajustó el pH a 5.90 con una solución diluida de HCl.

**M9** preparado con 15 g L<sup>-1</sup> de almidón soluble, 10 g L<sup>-1</sup> de extracto de carne, 5 g L<sup>-1</sup> de peptona de carne y pH ajustado a 6.10.

**M3 glut(+)** **modificado para cinéticas en fermentador** con el mismo contenido mineral y pH de M3 glut (+), reduciendo la concentración de glucosa a 20 g L<sup>-1</sup> y glutamato a 7 g L<sup>-1</sup>.

Los criterios utilizados para la selección de los medios descritos anteriormente, se discutirán en detalle en el capítulo 5.

#### **4.3. Condiciones de cultivo**

##### **4.3.1. Obtención de esporas y preparación de inóculo**

Se utilizaron cajas Petri de 90 mm de diámetro conteniendo 10 mL de medio SDY inoculadas por estría con una asada de esporas de primera generación. Las cajas se incubaron a 27 °C durante 10 días en una incubadora NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Innova 4230, con foto-períodos de 12 horas de luz/oscuridad.

En el segundo día de cultivo las cajas fueron selladas con parafilm para evitar la pérdida de humedad. Al cabo del periodo de incubación, se quitó esta película, dejando las cajas a temperatura ambiente para que perdieran agua y se indujera la esporulación. Las esporas de este cultivo (segunda generación) se utilizaron para la preparación de los inóculos resuspendiéndolas en una solución de Tween (0.05% v/v), a una concentración de  $4 \times 10^7$  conidios mL<sup>-1</sup> y se almacenaron en tubos criogénicos de 5 mL a -70°C.

#### **4.3.2. Fermentación líquida en matraz**

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio, incubados a 27°C con una agitación de 150 rpm en una incubadora NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Innova 4230. Se inocularon con 5 mL del inóculo congelado, alcanzando una concentración de  $1.3 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup> de medio.

#### **4.3.3. Fermentación sólida en matraz**

Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo ca. 1 g de cubos de espuma de poliuretano (EPU) de baja densidad ( $\approx 0.017$  g L<sup>-1</sup>), de aproximadamente 0.5 cm de arista, previamente lavados con agua caliente ( $\times 3$ ), secados por un periodo aproximado de 24 h en una estufa HERAUS a 70 °C bajo vacío (480 mm de Hg), a los que se agregaron 20 mL de medio previamente inoculado conteniendo  $1.3 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>, incubados a 27 °C en una incubadora NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Innova 4230.

#### **4.3.4. Fermentación líquida en fermentador**

Se utilizó un fermentador CHEMAP–Fermenter (Switzerland, Chemap A.G.) de 7 L conteniendo 4.5 L de medio. Como parámetros de operación se fijaron 27 °C, pH de 5.4 ( $\pm 0.1$ , controlado con NaOH 0.5 M), una agitación de 300 rpm y 300 mL min<sup>-1</sup> de aire o una corriente gaseosa enriquecida con oxígeno.

Como inóculo se emplearon 200 mL de un cultivo de 24 horas de edad previamente inoculados con la suspensión de conidios aéreos congelada, con una cuenta inicial de  $2 \times 10^6$  conidios mL<sup>-1</sup>.

### **4.4. Técnicas analíticas**

#### **4.4.1. Conteo de esporas**

El conteo se realizó con un hemocitómetro de Neubauer bajo microscopio con una ampliación de 400  $\times$ .

---

---

#### **4.4.2. Determinación de biomasa en fermentación líquida**

El crecimiento del hongo fue evaluado indirectamente por gravimetría. Para este efecto la biomasa (micelio y otros propágulos) contenida en alícuotas de 5 mL del mosto de fermentación, fue filtrada en membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de corte, previamente pesadas. La biomasa retenida en las membranas se lavó tres veces con alícuotas de 5 mL de agua destilada y se secaron por un periodo aproximado de 24 h hasta peso constante en una estufa HERAUS a 70 °C, bajo vacío (480 mm de Hg). Previamente al lavado, los filtrados fueron recuperados y almacenados a 4 °C para análisis posteriores.

#### **4.4.3. Determinación de biomasa en fermentación sólida**

La evaluación fue realizada indirectamente por gravimetría. Para este efecto se tomó el peso inicial del soporte de crecimiento (espuma de poliuretano), luego se drenó el medio de cultivo residual del soporte por compresión dentro de una jeringa de 60 mL sobre membranas Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de corte previamente pesadas. Los filtrados fueron recuperados y almacenados a 4 °C para análisis posteriores. El soporte contenido en la jeringa se lavó 2 veces con agua destilada, drenando nuevamente sobre las membranas. Finalmente, tanto las membranas como el soporte fueron llevados hasta peso constante en una estufa HERAUS a 70 °C bajo vacío a 480 mm de Hg, en un periodo aproximado de 24 h.

#### **4.4.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Tanto las cromatografías analíticas cuantitativas como las preparativas se llevaron a cabo en un equipo THERMO SEPARATION Constametric 4100 usando como eluyente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.005 M a un flujo de 0.6 mL  $\text{min}^{-1}$ , en una columna ALLTECH OA-1000 (300 mm  $\times$  6.5 mm) para ácidos orgánicos, a 35 °C. Se usó un detector UV/visible PERKIN ELMER SERIES 200, operado a 210 nm.

#### **4.4.5. Cromatografía en capa fina (TLC)**

En placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck, con  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1) y *n*-BuOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (12:5:3) como eluyentes y sulfato cérico amoniacal 0.051 M y luz UV como reveladores.

---

---

#### 4.4.6. *Espectrometría de masas (MS)*

Los análisis de espectrometría de masas se realizaron a 20 eV en un equipo Hewlett Packard 5989A

#### 4.4.7. *Espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)*

Las mediciones de resonancia magnética nuclear fueron hechas a 300 MHz para  $^1\text{H}$  y a 75.4 MHz para  $^{13}\text{C}$  en un espectrómetro Varian Mercury, usando  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  como solvente y TMS como referencia interna.

#### 4.4.8. *Ácido dipicolínico*

Se cuantificó mediante un método colorimétrico [Janssen y col., 1958]. Se preparó una solución disolviendo 1 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y 1 g de ácido ascórbico en 100 mL de un buffer de acetatos 0.5 M, pH 5.5. Para la cuantificación se colocaron 0.8 mL de la muestra y 0.2 mL de la solución, desarrollándose color de forma inmediata.

La intensidad del color es proporcional a la concentración de ácido dipicolínico y fue cuantificado por medición de la absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro BECKMAN DU-530.

#### 4.4.9. *Ácido oxálico*

Fue cuantificado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un equipo THERMO SEPARATION Constametric 4100 usando como eluyente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.005 M a un flujo de  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ , en una columna ALLTECH OA-1000 (300 mm  $\times$  6.5 mm) para ácidos orgánicos a  $35^\circ\text{C}$ . Se usó un detector UV/visible PERKIN ELMER SERIES 200, operado a 210 nm.

#### 4.4.10. *CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>*

Fueron cuantificados por cromatografía gaseosa en un equipo SRI 8610C usando como gas acarreador helio a un flujo de  $20 \text{ mL min}^{-1}$ , en una columna ALLTECH CTR I, a temperatura constante ( $40^\circ\text{C}$ ), con un detector TCD a  $100^\circ\text{C}$ . Se inyectó 1 mL de muestra.

#### 4.4.11. Glucosa y glutamato

Tanto la glucosa como el glutamato fueron determinados en un analizador bioquímico YSI 2700 SELECT (Yellow Springs Instrument, Ohio, EEUU).

#### 4.5. Bioensayos

Se realizaron sobre *Artemia salina*, en microplacas de 96 pozos, según el protocolo propuesto por Hartl y Humpf (2000).

La incubación de los huevecillos se realizó en una incubadora NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC Innova 4230 bajo las siguientes condiciones:

- Iluminación: 2000 lux (bien iluminado)
- Salinidad: 32.5 g L<sup>-1</sup>
- pH: 7 - 8.5
- Temperatura: 27 °C
- Concentración de huevecillos: 5 -10 g L<sup>-1</sup>

El periodo de incubación tuvo una duración aproximada de 24 h y fue llevado a cabo en cajas Petri de vidrio conteniendo 25 mL de la solución salina. Una vez producida la eclosión, se depositó en cada pozo de la microplaca, 200 µl de medio conteniendo 20 a 40 nauplios (larvas planctónicas de reciente eclosión).

- Para la evaluación de toxicidad de los diferentes sobrenadantes se adicionaron 5 µL de muestra problema por pozo y al cabo de un tiempo<sup>1</sup> se hizo el recuento de artemias muertas por observación directa al microscopio con una ampliación de 25 ×. El recuento del total de artemias por pozo se efectuó luego de inmovilizar a las sobrevivientes por adición de 50 µL de etanol.

<sup>1</sup>El tiempo para las evaluaciones de la toxicidad mediante el bioensayo fue variable (1-3 h) y se definió en función de la toxicidad y/o de la concentración de los principios activos en solución.

- Para la determinación de la dosis letal media, LD<sub>50</sub>, de DPA se adicionaron 20 µL por pozo de soluciones conteniendo 20, 50, 200, 500, 1000 y 2000 mg L<sup>-1</sup> de DPA.

- Para la determinación del tiempo letal medio,  $LT_{50}$ , de las diferentes soluciones se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de las mismas, observando la mortalidad producida a intervalos de 10 minutos.

Tanto para determinación de la  $LD_{50}$  como para la comparación del grado de toxicidad de los diferentes sobrenadantes obtenidos, la mortalidad observada fue corregida con los blancos utilizando la fórmula de Abbot (1925).

$$\%M_c = \left[ \frac{\%MT - \%Mt}{100 - \%Mt} \right] \times 100$$

Donde:

$\%M_c$  = Porcentaje de mortalidad corregida.

$\%MT$  = Porcentaje de mortalidad del tratamiento.

$\%Mt$  = Porcentaje de mortalidad del control o testigo.

Para la determinación de la  $LD_{50}$  como de la  $LT_{50}$  se realizó un análisis Probit [Finney, 1962] mediante el uso del paquete estadístico NCSS 2000.

Para la evaluación de la toxicidad de los diferentes sobrenadantes, las mortalidades corregidas fueron sometidas a un análisis de varianza ANOVA para establecer si existía diferencia significativa entre las mortalidades observadas ( $\alpha = 0.05$ ). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey–Kramer. En ambos casos se usó del paquete estadístico NCSS 2000.

#### **4.6. Ajuste de parámetros y modelos cinéticos**

Los datos experimentales fueron empleados para estimar todos los parámetros cinéticos por ajuste a los diferentes modelos, usando el programa *NCSS 2000*, el cual utiliza el algoritmo de Marquard [Marquard, 1963] y calcula un intervalo de confianza del 95% para cada parámetro ajustado.

##### **4.6.1. Crecimiento**

El crecimiento fúngico fue adecuadamente descrito por la ecuación logística [Gatto y col., 1988] originalmente desarrollada para el crecimiento de poblaciones:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left[ 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right] X \quad (1)$$

donde  $X$ , es la concentración de biomasa [ $\text{g L}^{-1}$ ],  $X_{\max}$ , el valor de equilibrio para  $X > 0$ , cuando,  $dX/dt = 0$  y  $\mu_{\max}$ , es la velocidad específica de crecimiento máxima,  $(1/X) dX/dt$ , medida cuando  $0 < X \ll X_{\max}$  [ $\text{h}^{-1}$ ]. Para el ajuste de los datos experimentales y estimación de los parámetros  $\mu_{\max}$ ,  $X_{\max}$  y  $X_0$  se utilizó la ecuación (2), que es la solución de la ecuación (1).

$$X(t) = \frac{X_{\max}}{1 + ((X_{\max} - X_0) / X_0) e^{-\mu_{\max} t}} \quad (2)$$

donde  $X_0$ , es la condición inicial para  $X$ .

#### 4.6.2. Consumo de sustratos

El consumo de sustratos fue modelado usando la ecuación de Pirt [Pirt, 1975]:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{SX}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (3)$$

Donde  $S$ , es la concentración del sustrato [ $\text{mol C}(S) \text{ L}^{-1}$ ];  $X$ , es la concentración de biomasa [ $\text{mol C}(X) \text{ L}^{-1}$ ];  $Y_{SX}$ , el rendimiento de biomasa en base a sustrato [ $\text{mol C}(X) \text{ mol C}^{-1}(S)$ ] y  $m$  el coeficiente de mantenimiento [ $\text{mol C}(S) \text{ mol}^{-1} \text{ C}(X) \text{ h}^{-1}$ ]. En los casos en los que se emplearon glucosa y glutamato,  $S$  fue expresada como la concentración de los moles totales de carbono en los medios de cultivo;  $Y_{SX}$ , al igual que  $m$ , también fueron evaluados sobre el consumo total de carbono.

La solución a la ecuación (3) para  $S$  como función de  $X$  y considerando  $S_0$  como la condición inicial está dada por la ecuación (4):

$$S(t) = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{SX}} - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left[ \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right] \quad (4)$$

#### 4.6.3. Producción de metabolitos

Las cinéticas de producción de ácidos orgánicos fueron modeladas usando la ecuación de Luedeking y Piret [Luedeking y Piret,1959] según:

$$\frac{dP_i}{dt} = \alpha_i \frac{dX}{dt} + \beta_i X \quad (5)$$

donde,  $P_i$ , es la concentración del producto [ $\text{mol } C(P) \text{ L}^{-1}$ ],  $\alpha_i$ , el coeficiente asociado a crecimiento [ $\text{mol } C(P) \text{ mol } C^{-1}(X)$ ] y  $\beta_i$ , el coeficiente no asociado a crecimiento [ $\text{mol } C(P) \text{ mol}^{-1} C(X) \text{ h}^{-1}$ ]. La solución de la ecuación (5) es:

$$P_i(t) = P_{i,0} + \alpha_i (X - X_0) + \frac{\beta_i X_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left[ \frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right] \quad (6)$$

donde  $P_{i,0}$ , es la concentración inicial de productos. Ahora, definiendo el nivel relativo de biomasa como  $\xi = X/X_{\max}$  y  $\xi_0 = X_0/X_{\max}$ , la ecuación (6) puede ser reescrita como sigue:

$$P_i(t) - P_{i,0} = \Delta P_i = \alpha_i X_{\max} (\xi - \xi_0) + \frac{\beta_i X_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left[ \frac{1 - \xi_0}{1 - \xi} \right] \quad (7)$$

Si  $\beta_i = 0$ , la síntesis de producto ocurre solo durante el crecimiento y el producto no es posteriormente metabolizado. La gráfica  $\Delta P_i$  vs.  $\xi$ , es una línea recta con pendiente,  $\alpha_i X_{\max}$ . Si  $\alpha_i > 0$  y  $\beta_i < 0$ , la gráfica  $\Delta P_i$  vs.  $\xi$ , tiene un máximo siempre que,  $-1 < \beta_i < 0$ , y este máximo es obtenido cuando  $0 < (\xi = 1 + \beta_i) < 1$ . Esto significa que la síntesis de producto está asociada a crecimiento con una velocidad fija de degradación,  $\beta_i$ . Finalmente si  $\beta_i > 0$  y  $\alpha_i > 0$ , la síntesis de producto está asociada parcialmente a crecimiento. Si  $\beta_i > 0$  y  $\alpha_i = 0$ , la producción no está asociada a crecimiento. En ambos casos se obtienen curvas cóncavas.

La productividad específica de producto en base a biomasa,  $q_{P/X}$ , [ $\text{g } (P) \text{ g}^{-1} (X) \text{ h}^{-1}$ ] se calculó según un arreglo de la ecuación (5):

$$\frac{dP_i}{Xdt} = q_{P/X} = \alpha_i \frac{dX}{Xdt} + \beta_i = \alpha_i \mu + \beta_i \quad (8)$$

Los rendimientos verdaderos de biomasa y productos en base a sustrato, evaluados sobre las concentraciones iniciales y finales se calcularon según las ecuaciones (9) y (10):

$$Y_{SX}^R = (-1) (X_0 - X_f) (S_0 - S_f)^{-1} \quad (9)$$

$$Y_{P/S}^R = (-1) (P_0 - P_f) (S_0 - S_f)^{-1} \quad (10)$$

---

---

## 5. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE METABOLITOS CON POTENCIAL INSECTICIDA

### 5.1. Introducción

Como se mencionó en la revisión de la literatura, *Paecilomyces fumosoroseus* es capaz de producir diferentes metabolitos con potencial insecticida entre los que destacan péptidos cíclicos como la beauvericina y ácidos orgánicos como el dipicolínico (DPA) y oxálico (OXA). En un trabajo previo se determinó que la cepa Pfrd del hongo produce DPA cuando es cultivado en un medio complejo en matraz, no habiendo detectado la formación de beauvericina u otros compuestos, de acuerdo a la sensibilidad y tipo de técnicas analíticas utilizadas [Asaff y col., 2005]. Esta escasa diversidad metabólica contrasta con la de otros hongos entomopatógenos, como *Beauveria* y *Metarhizium*, conocidos por su capacidad de síntesis de una amplia gama de metabolitos insecticidas [Roberts, 1981] (Tabla 2).

Se ha sugerido que pequeños cambios en los medios de cultivo, condiciones de operación y sistemas de fermentación permiten explorar la diversidad metabólica de una misma cepa [Zahn y col., 2001; Bode y col., 2002]. Bajo estos antecedentes se decidió primeramente cultivar a *P. fumosoroseus* Pfrd en diferentes medios y evaluar si era capaz de sintetizar nuevos metabolitos o incrementar la producción de compuestos ya conocidos con potencial insecticida.

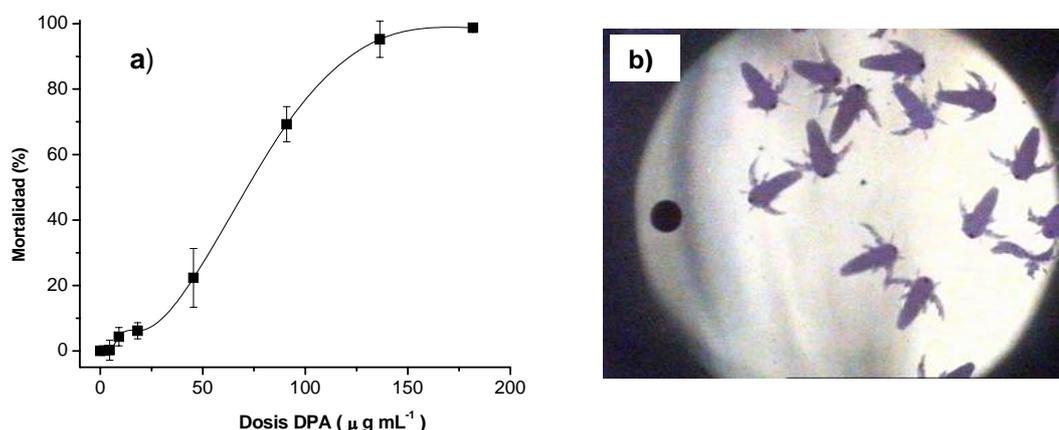
Un aspecto crucial en la investigación de actividades biológicas, es la disponibilidad de un bioensayo adecuado para monitorear los efectos buscados. Por esta razón, en este capítulo se presenta primeramente el montaje de la técnica y la sensibilidad del bioensayo elegido para seguir la formación de metabolitos con potencial insecticida, evaluada como toxicidad. En segundo término se muestran los resultados del efecto de los medios de cultivo de *P. fumosoroseus* Pfrd sobre la toxicidad de sus sobrenadantes, conjuntamente algunos datos de crecimiento y pH. Finalmente se presentan los análisis químicos y biológicos que permitieron la identificación de las fracciones y principios activos.

## 5.2. Montaje del bioensayo y evaluación de su sensibilidad a metabolitos del hongo

Primeramente se establecieron las condiciones para la eclosión y mantenimiento de los nauplios de *Artemia salina*. Aunque se implementó el procedimiento de desenquistado [Amat, 1985], la evaluación de su efecto sobre el porcentaje y tiempo de eclosión, mostró que no existía una diferencia importante con respecto a los huevecillos sin tratar, por lo que para los diferentes bioensayos se emplearon únicamente los quistes del crustáceo.

Para la eclosión de los quistes se probaron soluciones salinas preparadas tanto con cloruro de sodio como con sal de mar. Se observó que la solución preparada con cloruro de sodio, si bien permitía una elevada eclosión, no era apta para el mantenimiento ya que la sobrevivencia de los nauplios transcurridas 24 h era muy baja ( $7.99 \pm 2.19\%$ ). Contrariamente, la solución de sal de mar además de permitir una elevada eclosión, resultó adecuada para el mantenimiento con un alto porcentaje de sobrevivencia ( $96.63 \pm 2.21\%$ ), sugiriendo el requerimiento de otras sales, además del cloruro de sodio.

Establecidas las condiciones adecuadas para la eclosión y mantenimiento de los nauplios de *Artemia salina*, se evaluó la sensibilidad de este sistema a los metabolitos excretados por el hongo. Con este propósito se prepararon soluciones de diferente concentración de ácido dipicolínico (DPA) y se evaluó su efecto a las 24 horas de aplicación.



**Figura 2. a)** Curva de dosis/respuesta del DPA sobre *Artemia salina*. Cada punto fue determinado por cuadruplicado y corresponde a la media de la mortalidad corregida respecto al control (% mortalidad = 2.45) **b)** Vista al microscopio (25  $\times$ ) de nauplios muertos en el fondo de un micropozo a concentraciones elevadas de DPA

---

---

La curva de dosis/respuesta obtenida (Fig. 2a) fue una sigmoide que es característica de este tipo de pruebas [Lagunas-Tejeda, 1994], encontrándose que concentraciones altas de este compuesto ( $>150 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) produjeron una mortalidad elevada (Fig. 2b). Mediante un análisis Probit se estimó una  $LD_{50} = 44.5 \pm 2.49 \mu\text{g DPA mL}^{-1}$ .

En bioensayos de características similares, Delaney y Wilkins (1995) encontraron que la microcistina-LR, aislada de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, mostró a las 24 h una  $LD_{50} = 3.8 \text{ mg L}^{-1}$ ; es decir, fue aproximadamente 12 veces más tóxica que el DPA. En correlación con esta elevada toxicidad, la microcistina-LR tuvo una actividad insecticida muy importante, similar a la de otros insecticidas de uso comercial como rotenona, malathion o carbofuran. Las fumonisinas **B**<sub>1</sub> y **B**<sub>2</sub> producidas por el hongo *Fusarium moniliforme* tuvieron a las 48 h una  $LD_{50} = 1.98 \pm 0.12$  y  $3.37 \pm 0.13 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente [Hartl y Humpf, 2000]. Por otro lado, la evaluación toxicológica de diferentes derivados del retinol manifestó que estos compuestos presentaban toxicidades con  $LD_{50}$  que oscilaban entre 25 y  $420 \mu\text{g mL}^{-1}$  [Salo y col., 1995]. Una comparación de la  $LD_{50}$  del DPA con las de esos compuestos señala que este metabolito es de una toxicidad moderada, mostrando por otra parte que el sistema elegido para el bioensayo respondió a metabolitos producidos por *P. fumosoroseus*.

### 5.3. Selección de los medios de cultivo

No obstante que los microorganismos varían considerablemente respecto de los nutrientes que pueden necesitar para su crecimiento y síntesis de metabolitos es posible efectuar la distinción de las siguientes categorías de componentes: a) Macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg; b) Micronutrientes o elementos traza representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn, Co y Cu que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro; y c) Factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración como son las vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos, etc. Además de la relación de los nutrientes antes señalados, fenómenos como la represión catabólica de carbono y la regulación por nitrógeno, son los factores nutricionales que determinan la fisiología de los microorganismos. Antes de proceder a un diseño experimental con los diferentes factores, tomando como variable de respuesta a la toxicidad,

se decidió hacer una evaluación previa de esta variable en los sobrenadantes del cultivo del hongo en los medios utilizados por He Zennguo en una estancia posdoctoral (M1–M7 de la Tabla 4). Su trabajo tuvo por objeto el estudio de la influencia de algunos medios de cultivo en la formación de propágulos sumergidos de *P. fumosoroseus* Pfrd, reportando no solamente variaciones en su relación y morfología, sino también en el pH y la coloración de los sobrenadantes. La producción de pigmentos y los cambios en la morfología durante un cultivo indican que algunos géneros de hongos son metabólicamente diversos como por ejemplo *Beauveria* [Roberts y Yendol, 1971].

**Tabla 4. Medios utilizados para el cultivo de *P. fumosoroseus* en fermentación líquida**

Medio	Fuente de C	Fuente de N	C:N	Medio mineral
M1	Glucosa	Extracto de levadura	34:1	K, Na, Mg, Ca, P, S, Cl
M2	Glucosa	KNO <sub>3</sub>	17:1	K, Na, Mg, Ca, P, S, Cl, Fe (III), Mn, Co, Mo, Zn, Cu
M3	Glucosa	KNO <sub>3</sub>	17:1	K, Mg, Ca, P, S, Cl
M4	Glucosa	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98:1	K, Na, Mg, Ca, P, S, Cl, Zn, Fe (II)
M5	Glucosa	Glutamato	130:1	K, Na, Mg, Ca, P, S, Cl, Zn, Fe (II)
M6	Glucosa	Peptona de caseína		Información no disponible
M7	Glucosa	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	57:1	K, Na, Mg, Ca, P, S, Cl, Fe (III y II), Mn, Co, Mo, Zn, Cu (en EDTA)
M8	Almidón	Desconocida		Información no disponible
M9	Almidón	Extracto y peptona de carne		Información no disponible

Ver detalles de la composición de los medios en Materiales y Métodos

Adicionalmente se evaluaron los medios M8 y M9, correspondientes a medios empleados para el cultivo de hongos del género *Paecilomyces* [Cho y col., 2002] y que a diferencia de los primeros, tanto la fuente de carbono, como la de nitrógeno, son complejas.

Como se observa en la Tabla 4, la gran diversidad en la relación y la naturaleza de los nutrientes de los medios de cultivo hacía prever que debían provocar necesariamente cambios metabólicos en el hongo. De no ser así, era poco probable que otros medios de cultivo formulados en base a un diseño experimental, provocaran los cambios de toxicidad esperados.

#### 5.4. Crecimiento de *P. fumosoroseus* en diferentes medios y toxicidad de los sobrenadantes

Los medios de cultivo tuvieron un efecto importante sobre el desarrollo de la biomasa y el pH de los sobrenadantes (Tabla 5). Los medios M1 y M2 permitieron el crecimiento más alto a las 144 h, mostrando que tanto fuentes orgánicas de nitrógeno como el extracto de levadura y fuentes inorgánicas como el nitrato de potasio, con una adecuada suplementación de microelementos, podían soportar de igual manera un buen desarrollo del hongo.

**Tabla 5. Efecto de los medios de cultivo sobre el crecimiento y pH**

Medio	X [g L <sup>-1</sup> ]		pH		
	72 h	144 h	0 h	72 h	144 h
M1	6.68 ± 0.21	12.31 ± 0.18	6.0	2.36 ± 0.10	3.30 ± 0.28
M2	5.43 ± 0.11	18.32 ± 0.54	5.0	6.08 ± 0.08	6.28 ± 0.06
M3	3.43 ± 0.01	2.79 ± 0.13	5.0	3.86 ± 0.18	2.90 ± 0.13
M4	3.33 ± 0.14	3.52 ± 0.09	5.0	2.05 ± 0.11	2.12 ± 0.19
M5	6.48 ± 0.57	10.05 ± 0.64	5.0	5.20 ± 0.09	3.94 ± 0.12
M6	1.19 ± 0.08	1.19 ± 0.01	5.6	5.02 ± 0.13	4.84 ± 0.22
M7	6.68 ± 0.14	9.40 ± 0.85	6.0	5.84 ± 0.21	4.58 ± 0.14
M8	6.67 ± 0.12†	5.73 ± 0.18††	6.0	nd	5.22 ± 0.02††
M9	8.22 ± 0.79†	8.03 ± 0.32††	6.0	nd	6.29 ± 0.05††

† Corresponde a 96 h de cultivo †† Corresponde a 168 h de cultivo

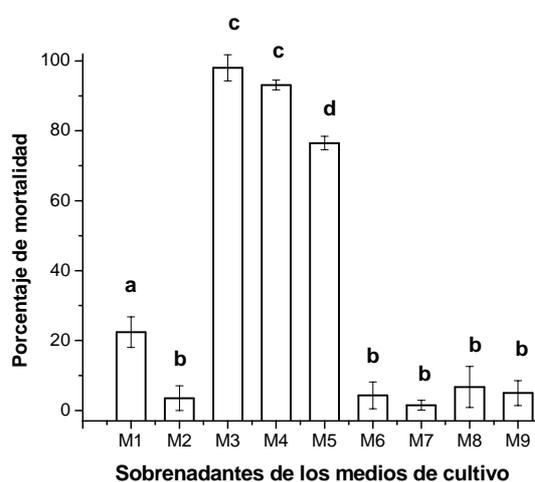
En el caso de M1 (Tabla 5) se observó que el pH descendió debido a la secreción de compuestos de naturaleza ácida como el DPA [Asaff y col., 2005]. Contrariamente, en el caso de M2, el pH tuvo un ligero ascenso, probablemente debido a una menor producción de metabolitos ácidos o la mejor capacidad amortiguadora del medio por su contenido de fosfatos. Destacó que tanto la producción de biomasa como la evolución del pH en M3 tuvieron un comportamiento contrario al observado en M2, pese a que ambos fueron formulados de igual manera, salvo en su contenido de microelementos. Probablemente el descenso del pH en M3 se debió a una mayor producción de compuestos de naturaleza ácida que superaron la capacidad amortiguadora del medio.

En el caso de M4 el crecimiento fue muy pobre ocasionado por el excesivo descenso del pH. Es conocido que la asimilación de amonio por los hongos permite la incorporación únicamente de amoniaco a las vías metabólicas, liberando iones  $H^+$  que acidifican el medio [Moore-Landecker, 1996]. Cuando se cambió la fuente de nitrógeno a glutamato (M5) se observó un mejor desarrollo del hongo y un descenso del pH menor.

En el caso de M6 se tuvo el crecimiento más bajo de todos. Este medio no había sido suplementado con ningún microelemento, salvo por las trazas que pudiera haber contenido la peptona de caseína, lo cual pone en evidencia el requerimiento de microelementos para un desarrollo adecuado de *Paecilomyces fumosoroseus*.

En el caso de M7, M8 y M9 el crecimiento y evolución del pH fue más o menos similar, siendo probablemente su contenido de nutrientes lo que determinó la biomasa máxima alcanzada.

A fin de establecer la influencia de los medios de cultivo sobre la producción de metabolitos tóxicos, los sobrenadantes de los 9 medios de cultivo, libres de cualquier forma biológica del hongo, fueron evaluados mediante el bioensayo con *Artemia salina*. Los resultados son presentados en la Figura 3.



**Figura 3.** Efecto de los medios sobre la toxicidad de los sobrenadantes. Las barras corresponden al valor de las medias del porcentaje de mortalidad obtenido a las 2 horas de iniciado el bioensayo. Los valores con las mismas letras indican que no

---

---

existe una diferencia significativa entre los tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ), según la prueba para diferencia de medias de Tukey–Kramer. Se hicieron 4 repeticiones por cada prueba.

Los sobrenadantes de los medios M3 y M4 resultaron altamente tóxicos para *Artemia salina*, mientras que M5 y M1 mostraron una toxicidad considerable y moderada respectivamente. Los otros sobrenadantes prácticamente no presentaron actividad durante la duración del bioensayo.

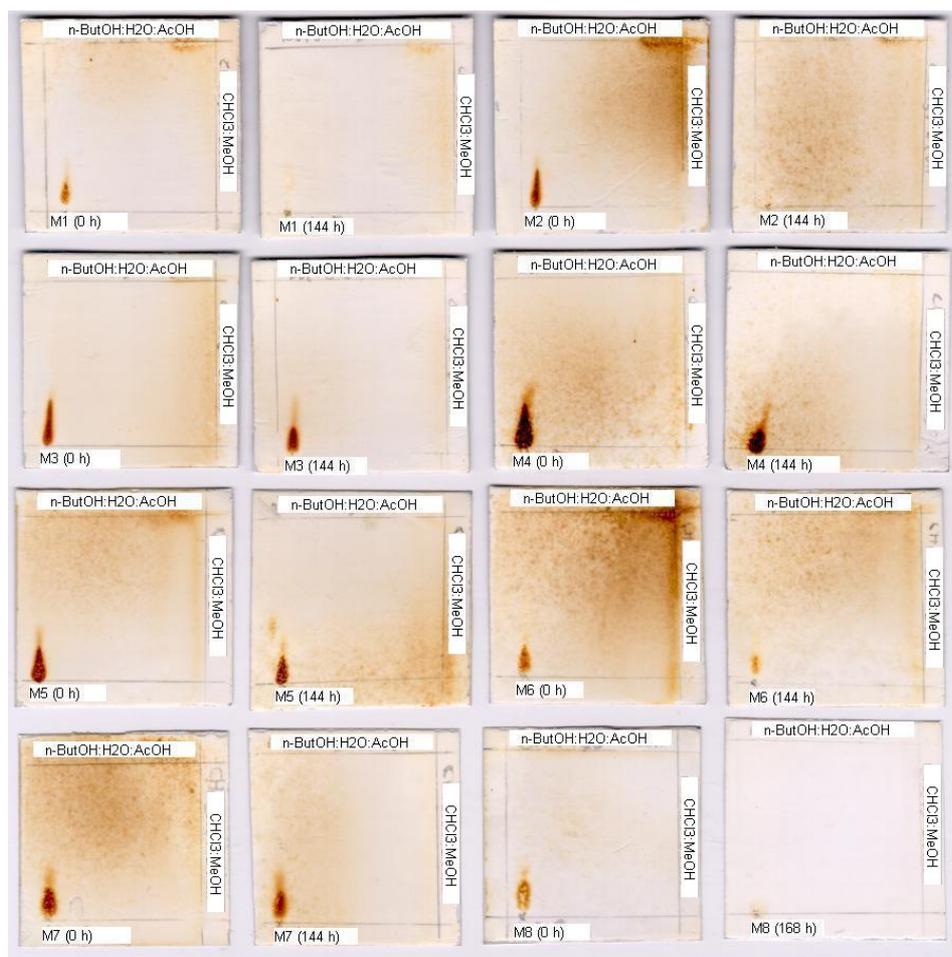
En primer término se trató de descartar que la toxicidad observada no fuera ocasionada por el pH bajo de los sobrenadantes que mostraron actividad. Para el efecto se evaluó la toxicidad de dos soluciones 0.010 M de HCl y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH  $\approx$  3), las cuales provocaron una mortalidad prácticamente despreciable (2.59 y 3.17% respectivamente). Por otro lado, se observó que cuando el pH del sobrenadante M3 fue ajustado a 4.2, la toxicidad fue reducida en un 50% y a pH 5 fue prácticamente abatida luego de una hora de ensayo. A pH 7 no se observó actividad transcurridas 24 h y con los sobrenadantes M1, M4 y M5 ajustados al mismo pH, la mortalidad fue prácticamente despreciable ( $\approx$  2%) luego de un periodo similar. El pH fue ajustado a diferentes niveles por la adición de un volumen mínimo de una solución de KOH concentrada, por lo cual el efecto de dilución se considera despreciable. El descenso del pH de los diferentes sobrenadantes ( $<$  3.6) y la actividad observada en estas condiciones hizo suponer que los metabolitos activos eran de naturaleza ácida y que mostraban actividad únicamente cuando se encontraban en su estado molecular o parcialmente disociados.

### 5.5. Análisis físico-químico de los sobrenadantes

Tratando de establecer el origen de las diferencias de mortalidad observadas, se buscó caracterizar los diferentes sobrenadantes de acuerdo a la naturaleza de sus componentes.

En primera instancia, los sobrenadantes fueron sometidos a un análisis de cromatografía de capa fina (TLC) de doble dimensión, utilizando *n*-BuOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (12:5:3) como primer solvente y CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1) como segundo solvente, revelados con sulfato cérico amoniacal (Fig. 4). Se observó que en la primera elusión tanto los componentes de los medios de cultivo (0 h) como componentes residuales y algún probable metabolito producido (144 h) migraron mínimamente a lo largo de la placa, mientras en la segunda elución ninguna muestra fue capaz de migrar, indicando claramente la fuerte polaridad de la

totalidad de los componentes de las muestras analizadas. La glucosa de los medios de cultivo fue revelada también con la solución empleada por lo cual no fue posible precisar si se produjeron metabolitos de naturaleza polar con tiempos de retención similares a los de este azúcar. Únicamente en algunos casos (M1, M2, M6, M8) quedó en evidencia el consumo de los nutrientes iniciales.



**Figura 4.** Cromatoplasmas de doble dimensión, utilizando *n*-BuOH:H<sub>2</sub>O:AcOH (12:5:3) como primer solvente y CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1) como segundo solvente, de los medios (0 h) y sobrenadantes de los cultivos (144 h) de *P. fumosoroseus* en FL, reveladas con sulfato cérico amoniacal.

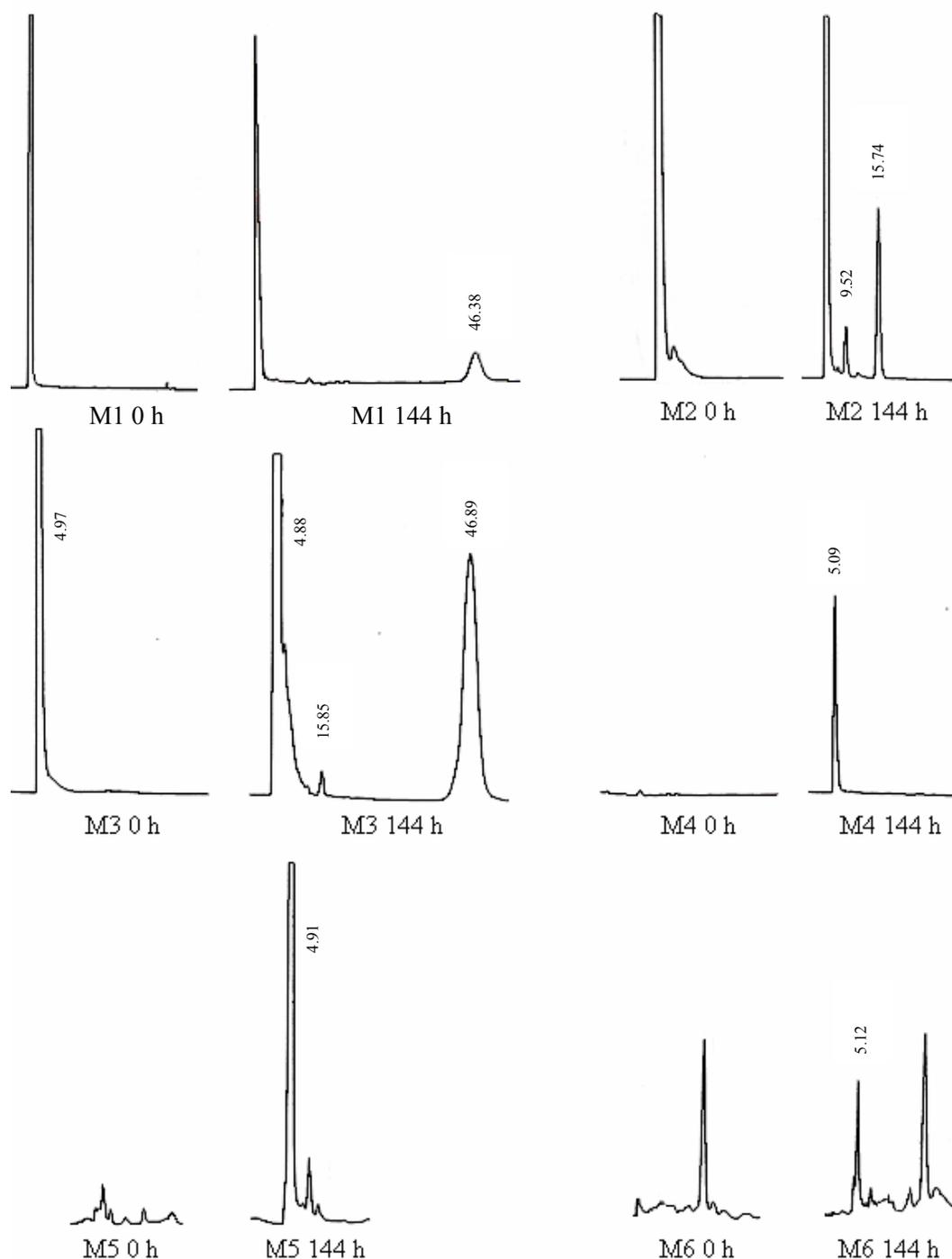
También se corrieron otras cromatoplasmas revelándolas con luz UV (Tabla 6) a fin de evitar la interferencia de componentes residuales del medio como la glucosa. En el caso de M1 y M3 en particular, se observó una especie química con un  $R_f = 0.2$  que coincidió con el del

DPA; sin embargo, en M3 la señal fue muy intensa, ocasionando incluso un barrido desde 0 a 0.2, frente a una señal tenue de M1. En los otros medios, incluido M9, no fue posible discriminar si las marcas observadas correspondían a metabolitos producidos por el hongo o a componentes residuales de los medios de cultivo. En ninguno de los casos se observó la formación de beauvericina, cuyo estándar eluido con  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (9:1), tiene un  $R_f = 0.8$ .

**Tabla 6. Marcas en cromatoplasmas de doble dimensión de los medios (0 h) y sobrenadantes de los cultivos (144 h) de *P. fumosoroseus* en FL observadas con luz UV**

Medio	UV	$R_f$ ( $n\text{-BuOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ )	$R_f$ ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ )
M1 (0 h)	---	---	---
M1 (144 h)	++	0.2	0
M2 (0 h)	+	0	0
M2 (144 h)	+	0	0
M3 (0 h)	---	---	---
M3 (144 h)	++++	0-0.2	0
M4 (0 h)	+	0-0.2	0
M4 (144 h)	+	0-0.2	0
M5 (0 h)	+	0-0.2	0
M5 (144 h)	+	0-0.2	0
M6 (0 h)	+	0.3; 0.4	0.2
M6 (144 h)	+	0.3; 0.6	0.2
M7 (0 h)	+	0.3	0
M7 (144 h)	---	---	---
M8 (0 h)	+	0	0
M8 (168 h)	+	0	0
M9 (0 h)	+	0-0.2	0
M9 (168 h)	+	0-0.2	0

Los análisis de cromatografía de capa fina mostraron que en algunos casos se producían metabolitos fuertemente polares, muy probablemente de naturaleza ácida, por lo que en los análisis por HPLC de los sobrenadantes, se usó una columna para ácidos orgánicos. Los cromatogramas obtenidos en cada caso son ilustrados en la Figura 5.



**Figura 5.** Cromatogramas de HPLC de los sobrenadantes y medios de cultivo de *P. fumosoroseus* en FL usando como eluyente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.005 M a un flujo de  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ , en una columna ALLTECH OA-1000 para ácidos orgánicos, a  $35^\circ\text{C}$  y detección UV a 210 nm. Los picos con  $R_t \approx 5$  y 46 min fueron identificados como OXA y DPA respectivamente.

En M1 se observó un pico con un  $R_t = 46.4$  min, el cual apareció también en M3, aunque con un área 17 veces superior. La comparación del tiempo de retención y su espectro de absorción con el de un estándar mostraron que se trataba del DPA.

A los niveles de sensibilidad empleados para el análisis cromatográfico no se observó en los otros medios la producción de DPA, aspecto que indica que su síntesis dependió de manera importante de la composición del medio de cultivo.

En M2 aparecieron dos nuevos picos con  $R_t = 9.5$  y  $15.7$  min que también fueron observados en M3, aunque el primero no fue resuelto de forma adecuada.

En M3 (0 h) se vio un pico de área considerable con un  $R_t \approx 5$  min, que en el sobrenadante (144 h) también apareció pero con un área mayor y aparentemente traslapado con alguna otra señal.

Cuando se utilizó un detector con arreglo de diodos, se observó que los espectros de absorción de los picos con un  $R_t \approx 5$  min del medio de cultivo M3 (0 h) y del sobrenadante M3 (144 h) eran diferentes, lo cual indica que en M3, además del DPA, se produjo algún(os) otro(s) metabolito(s) con un  $R_t \approx 5$  min. Se observó que cuando la fuente de nitrógeno de M3 ( $\text{KNO}_3$ ) fue reemplazada con glutamato [M3 glut(+)], el sobrenadante que se obtuvo luego de 212 h de cultivo, provocó una mortalidad del 100% en 1 h. Cuando el blanco de este medio (0 h) fue analizado por HPLC, la señal con un  $R_t \approx 5$  no apareció, mientras que en el sobrenadante (212 h) se apreciaba nuevamente su formación al igual que la fracción con un  $R_t = 46.4$  min, correspondiente al DPA.

Tanto en M4, M5 y M6 también se observó la aparición del pico con un  $R_t \approx 5$  min aunque de área diferente. El espectro de esta fracción del sobrenadante de M3 y los espectros de los picos detectados en los sobrenadantes de M4, M5 y M6 con el mismo tiempo de retención, fueron similares por lo que se presumió que se trataba de un mismo metabolito. En M7, M8 y M9 no se observó la formación de ningún metabolito en cantidades significativas.

Al parecer la elevada toxicidad mostrada por M3, M4 y M5 y en menor grado por M1 (Tabla 5) y posteriormente por M3 glut(+), estuvo correlacionada con su contenido de DPA y de la fracción con un  $R_t \approx 5$  min.

### 5.6. Selección y aislamiento de las principales fracciones activas

De acuerdo a los cromatogramas de HPLC y toxicidad de los sobrenadantes de M1, M3, M3 glut(+), M4 y M5, se seleccionó la fracción con un  $R_t \approx 5$  min como una de las principales candidatas a contener él o los principios activos. Con el propósito de evitar la interferencia de componentes del medio de cultivo en los análisis posteriores, tanto para el aislamiento, como para la identificación del compuesto(s) contenido(s) en dicha fracción, se utilizó el sobrenadante de M3 glut(+). También se colectaron las fracciones con  $R_t \approx 9$  y 15 min del sobrenadante de M2, también presentes en M3 y M5, aunque mejor resueltos en el primero. Finalmente se colectó la fracción correspondiente al DPA con un  $R_t \approx 46$  min.

Las fracciones colectadas del equipo de HPLC fueron contrastadas durante los bioensayos con fracciones con tiempos de retención similares, colectadas a partir de sus blancos respectivos (medio de cultivo puro). Los resultados del bioensayo luego de un periodo de 2 h son presentados en la Tabla 7.

**Tabla 7. Toxicidad de las diferentes fracciones de HPLC de los sobrenadantes**

Fracción $R_t$ [ $\approx$ ] min	Mortalidad blanco (%)	Mortalidad sobrenadantes (%)	Fuente
5	5.32 ( $\pm 2.11$ )	98.33 ( $\pm 2.89$ )	M3 glut(+)
9	1.67 ( $\pm 1.39$ )	1.74 ( $\pm 1.54$ )	M2
15	2.19 ( $\pm 1.89$ )	1.75 ( $\pm 1.01$ )	M2
46	2.62 ( $\pm 2.28$ )	4.15 ( $\pm 0.79$ )	M3 glut(+)
(H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.005M)	1.43 ( $\pm 1.06$ )	-----	Fase móvil

Para la colección de fracciones se inyectaron 100  $\mu$ L de muestra, colectando las fracciones por periodos aproximados de 2 minutos con una dilución de 1:12. Las fracciones colectadas se concentraron en la misma proporción por evaporación bajo una corriente de nitrógeno.

El bioensayo mostró que la fracción aislada con un  $R_t \approx 5$  min fue altamente tóxica. Las fracciones con  $R_t \approx 9$  y 15 min no mostraron ninguna actividad. Por su parte la fracción con  $R_t \approx 46$  min correspondiente al DPA ocasionó una mortalidad despreciable. De acuerdo a estos resultados el o los compuestos activos principales estaban contenidos en la primera fracción por lo cual se procedió a aislarlos e identificarlos.

## 5.7. Identificación de los compuestos activos

Como se mencionó anteriormente, tanto los análisis de capa fina ( $R_f = 0$ ), como los de HPLC ( $R_t \approx 5$  min) mostraron que la fracción activa tenía una naturaleza fuertemente polar. Los análisis del compuesto purificado mostraron una masa molecular de 90 y su espectro de  $^{13}\text{C}$  mostró un único pico con un desplazamiento de 160.441 ppm, coincidente con el desplazamiento de 160.770 ppm del ácido oxálico (manual Aldrich de espectros), por lo que se concluyó que se trataba de este compuesto.

El efecto tóxico mostrado por el ácido oxálico (OXA) está correlacionado con las propiedades insecticidas y acaricidas altamente efectivas de este compuesto sobre la chinche *Lygus hesperus* y el ácaro *Varroa destructor* [Alverson, 2003; Gregorc y Planinc, 2002]. Este último se ha constituido en una plaga muy seria para la industria apícola, capaz de causar epizootias de gran magnitud en las colmenas, por lo cual el uso de OXA o caldos de fermentación que lo contienen, resultan una alternativa de control interesante. Por ejemplo, existen reportes a cerca de que los sobrenadantes de *Beauveria bassiana* libres del hongo, causaron una gran mortalidad entre otras especies de ácaros como *Ambylomma americanum* L., *Ambylomma maculatum* Koch e *Ixodes scapularis* Say, siendo el OXA, el compuesto activo de estos sobrenadantes [Kirkland y col., 2005]. Un aspecto importante a considerar es que dichos autores señalan que el efecto acaricida se manifestó en sobrenadantes con pH 4, mientras que dicho efecto fue prácticamente suprimido a pH 7. Este fenómeno concuerda con los resultados encontrados en los bioensayos con *Artemia salina* en los cuales se observó que los sobrenadantes conteniendo OXA o soluciones puras de OXA con  $\text{pH} > 4$  carecieron de actividad (Tabla 8). Este hecho sugiere que la forma parcialmente disociada ( $\text{pK}_{a2} = 4.19$ ) y la molecular ( $\text{pK}_{a1} = 1.20$ ) del OXA son las biológicamente activas. Este comportamiento posiblemente tiene su origen en fenómenos de transporte y en un modo de acción similar al sugerido para los ácidos benzoico ( $\text{pK}_a = 4.19$ ), sórbico ( $\text{pK}_a = 4.80$ ) y láctico ( $\text{pK}_a = 3.08$ ) como inhibidores de crecimiento microbiano. Estos compuestos son ácidos débiles que a pH menores a 5.0 son protonados y llevados a su forma molecular la cual les permite penetrar la membrana celular. Una vez dentro de la célula, estos ácidos se disocian liberando protones lo cual origina que los microorganismos tengan que bombearlos fuera mediante la ATP sintetasa

---

---

a fin de mantener constante el pH interno de la célula. Esto ocasiona una disminución en la producción de ATP con la consecuente pérdida de energía [Griffin, 1994].

Además de las propiedades insecticidas del OXA, se ha encontrado que su producción en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, forma parte de un mecanismo concertado con la actividad de enzimas hidrolíticas y otros ácidos como el cítrico para la solubilización de la cutícula de los insectos. Este mecanismo conjuntamente con la acción mecánica del apresorio permite la penetración de las hifas [Bidochka y Khachatourians, 1991].

### 5.8. Contenido de ácidos y correlación con la toxicidad de los sobrenadantes

Una vez identificado el OXA como uno de los compuestos activos, además del DPA, se buscó establecer si la toxicidad de los sobrenadantes analizados se debía en su totalidad a su contenido de estos ácidos o si además existían otras sustancias involucradas que no habían sido detectadas debido a la sensibilidad de las técnicas analíticas y/o procedimientos utilizados. Para el efecto se tomó el sobrenadante de M3 glut(+) y se cuantificó su contenido de ácidos orgánicos y nutrientes residuales. Se determinaron concentraciones de 0.98 g L<sup>-1</sup> de DPA, 3.53 g L<sup>-1</sup> de OXA, 26.31 g L<sup>-1</sup> de glucosa y 7.07 g L<sup>-1</sup> de glutamato. Se añadieron 10 µL de este sobrenadante, al igual que de todas las otras muestras ensayadas, a 200 µL de la solución salina conteniendo los nauplios de *Artemia* en cada micropozo. Las concentraciones en molaridad y considerando el efecto de dilución para el DPA, OXA, glucosa y glutamato en los micropozos fueron 0.285, 1.852, 6.878 y 2.299 mM respectivamente. De acuerdo a estas concentraciones se hicieron diferentes pruebas de toxicidad de los compuestos puros o mezclas, tratando de establecer su grado de participación en la actividad observada mediante la estimación de la LT<sub>50</sub> y la LT<sub>90</sub>. Los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tanto la LT<sub>50</sub> como la LT<sub>90</sub> señalan que el sobrenadante de M3 glut(+) (1) resultó más tóxico que cualquiera de sus componentes ácidos puros o mezclados (2–7). Se prepararon soluciones tanto de DPA como de OXA en las mismas concentraciones en las que se encontraban presentes en el sobrenadante de M3 glut(+). En el caso del DPA (2), se observó que su actividad fue prácticamente despreciable. Tampoco se observó un efecto sinérgico o aditivo con el OXA pues la actividad de este compuesto puro (4) o mezclado con DPA (5) no mostró diferencias significativas ni en la LT<sub>50</sub> ni en la LT<sub>90</sub>.

**Tabla 8. Comparación del grado de toxicidad del sobrenadante de M3 glut(+) y sus principales componentes**

	Descripción	pH	Concentración (mM) <sup>a</sup>	LT <sub>50</sub> (min)	LT <sub>90</sub> (min)
(1)	M3 glut(+)	3.54	(1.852 + 0.285) <sup>b</sup>	12.45 (1.98)	29.52 (2.37)
(2)	DPA	3.44	0.285	>400	>400
(3)	DPA	3.51	1.853	18.33 (2.45)	31.67 (4.66)
(4)	OXA	3.52	1.852	27.64 (3.32)	50.45 (12.61)
(5)	(OXA + DPA)	3.50	(1.852 + 0.285)	34.23 (4.19)	69.90 (8.31)
(6)	(OXA + DPA)	3.55	(1.852 + 0.285) <sup>b</sup>	16.78 (6.01)	47.83 (16.03)
(7)	(OXA + DPA)	5.01	(1.852 + 0.285)	>500	>500

<sup>a</sup>Concentraciones alcanzadas en cada micropozo de los bioensayos. <sup>b</sup>Corresponde a las concentraciones de OXA y DPA respectivamente, conteniendo además 6.878 mM glucosa y 2.299 mM de glutamato. Todas las pruebas tuvieron 5 repeticiones y los números entre paréntesis representan los límites de confianza a un 95%.

Con el propósito de comparar el grado de toxicidad del DPA y OXA, se preparó una solución de DPA (3) a la misma concentración del OXA (4), observando que en este caso tanto la LT<sub>50</sub> como la LT<sub>90</sub> fueron menores, lo cual indica que el DPA es un compuesto aproximadamente 36% más tóxico que el OXA. Por otro lado, se trató de establecer si los componentes residuales del medio de cultivo pudiesen también tener un efecto tóxico aditivo con el DPA y el OXA. Para el efecto se preparó una solución (6) conteniendo las sales del medio M3 glut(+), glucosa y glutamato (en las mismas concentraciones en las que se encontraban en el sobrenadante). En este caso se observó un incremento de la toxicidad en comparación a la mezcla únicamente de DPA y OXA (4), lo cual indica que además de los ácidos producidos, también los nutrientes residuales del medio coadyuvaban en alguna medida a la toxicidad del sobrenadante. Finalmente se buscó reconfirmar el efecto del pH utilizando la misma mezcla de DPA y OXA pero a un pH mayor (7). En este caso, nuevamente se observó que no hubo actividad, que como se discutió anteriormente, señala al estado molecular o parcialmente disociado de los ácidos como los biológicamente activos.

Estos resultados confirman que el OXA a la concentración alcanzada, fue el componente activo principal de M3 glut(+) y muy probablemente de M3, M4 y M5 en los que se observó su formación (Fig. 5). Otro componente del sobrenadante como el DPA, más

---

tóxico que el OXA, no presentó actividad durante el tiempo del ensayo simplemente por un efecto de concentración. Como en este caso, no fue posible descartar que el sobrenadante pudiera haber contenido también otros componentes minoritarios con actividad, pero que no fue posible detectarlos por su baja concentración y debido a que la alta producción de OXA enmascaró cualquier otro efecto, además de que la sensibilidad del bioensayo permitió la interferencia de los nutrientes residuales. En este sentido, se apreció la formación de pigmentos amarillo verdosos, probablemente sideróforos. En muchos casos se ha observado que los pigmentos producidos por hongos entomopatógenos, tal el caso de la tenellina, basianina y oosporeina, producidos por *Beauveria bassiana*, presentan actividad biológica [Jeffs y Khachatourians, 1997]. En algunos de los cromatogramas de HPLC también se observaron algunos picos minoritarios no identificados, probablemente intermediarios del ciclo de Krebs como el ácido cítrico, que sin embargo no presentaron toxicidad.

Los resultados presentados a lo largo de este capítulo muestran que cambios en la composición de los medios de cultivo permiten modificar la toxicidad de los sobrenadantes de *P. fumosoroseus*, gracias principalmente a una mayor o menor producción de DPA, OXA y el pH final alcanzado. Sin embargo, con la metodología seguida no fue posible establecer la producción de nuevos metabolitos con potencial insecticida, que por su baja concentración probablemente no alcanzaron a mostrar actividad biológica.

Por otro lado, tanto el DPA y el OXA son considerados de riesgo moderado para la salud humana. La clasificación NFPA para el DPA es de 2 (Sigma-Aldrich), que corresponde a materiales que en exposición intensa o continua pudieran causar incapacitación temporal o posibles daños residuales a menos que se dé pronta atención médica. En el caso del OXA, su clasificación NFPA lo ubica en el nivel 3 (Sigma-Aldrich), usado para materiales que en un tiempo corto pudieran causar daños temporales o residuales aunque se hubiera recibido pronta atención médica. La mayor parte de los insecticidas químicos están en el nivel 4 de la clasificación NFPA, correspondiente a materiales que en muy poco tiempo pudieran causar la muerte o daños permanentes aunque se hubiera recibido pronta atención médica. Por tanto, utilizando una adecuada protección, el uso de los sobrenadantes de *P. fumosoroseus*, solos o combinados con propágulos infectivos del hongo, puede ser una opción interesante para el control de plagas. Sin embargo, serán necesarios más estudios a este respecto.

## **6. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO, CONDICIONES DE OPERACIÓN Y SISTEMA DE FERMENTACIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE DPA Y OXA**

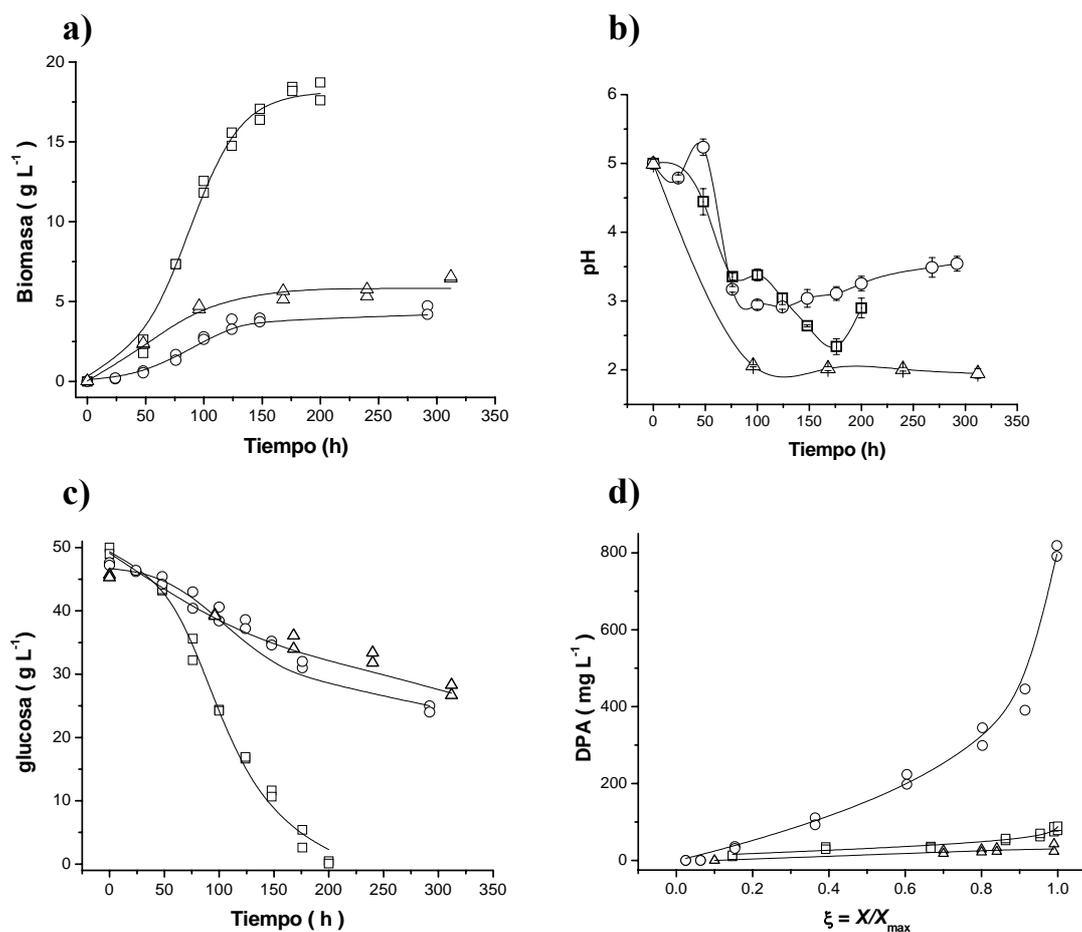
### **6.1. Introducción**

En este capítulo se presentan los resultados que explican las diferencias encontradas en el capítulo anterior a cerca de la producción de DPA y OXA por efecto del medio de cultivo. Además se muestra el efecto de las condiciones de operación (aireación y control de pH) y el sistema de fermentación (FL y FS) sobre las cinéticas de producción de DPA, OXA y biomasa, así como las de consumo de sustratos. Cabe aclarar que en los primeros análisis no se incluye al OXA debido a que su identificación se logró en forma posterior a muchos de los resultados obtenidos.

Con el propósito de identificar los principales factores del medio de cultivo que afectan la producción de los ácidos orgánicos de interés se pudo haber recurrido a un diseño de experimentos. Sin embargo, como se verá más adelante, un análisis comparativo de la composición de algunos de los medios utilizados en el capítulo anterior, permitió excluir a varios factores, recurriendo en la mayoría de los casos a pruebas menos elaboradas.

### **6.2. Cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y producción de DPA en tres medios seleccionados (M1, M3, M4)**

Los análisis cromatográficos (Fig. 5) mostraron que la producción de DPA era muy variable. Llamó la atención la elevada producción en algunos casos (M3) y su casi nula formación en otros (M4). En una primera instancia se siguieron las cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y producción de DPA en estos dos medios, usando como control M1, al ser el medio en el que se había encontrado la presencia de este metabolito en un trabajo anterior [Asaff y col., 2005], buscando establecer si la producción de DPA estaba ligada o no a crecimiento. Los resultados experimentales y las curvas correspondientes al modelado se ilustran en la Figura 6. Los parámetros cinéticos estimados se muestran en la Tabla 9.



**Figura 6.** Cinéticas de cultivo de *P. fumosoroseus* en FL en matraz en diferentes medios a 27 °C y 150 rpm. **a)** Crecimiento; **b)** pH; **c)** Consumo de glucosa; **d)** Producción de DPA en función de la biomasa relativa. □ M1; ○ M3; △ M4. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a los datos ajustados a los modelos.

De los medios ensayados, en M1 se alcanzó la biomasa más alta, 353% y 209% mayor a la alcanzada en M3 y M4 respectivamente. En M3 el hongo creció principalmente como micelio disperso hasta las 150 h y partir de este punto formó conglomerados que sedimentaron y se separaron del medio de cultivo, dificultando la toma de muestras representativas. Por esta razón solo se volvió a evaluar el crecimiento hasta el final de la fermentación como biomasa total por matraz por volumen total de sobrenadante.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de FL en matraz de *P. fumosoroseus* en diferentes medios

	Medios de cultivo		
	M1	M3	M4
$X_{\max}$	18.11 (0.23)	4.16 (0.57)	5.86 (0.66)
$\mu_{\max} \times 10^{-2}$	4.69 (0.65)	4.36 (0.89)	4.18 (1.82)
$R^2$	0.9947	0.9736	0.9656
$Y_{X/S}$	0.63 (0.05)	0.48 (0.06)	0.61 (0.06)
$m \times 10^{-2}$	0.87 (0.38)	2.72 (1.09)	5.57 (2.01)
$R^2$	0.9893	0.9756	0.9712
$\alpha \times 10^{-2}$	0.18 (0.09)	2.22 (1.37)	nd
$\beta \times 10^{-3}$	0.02 (0.01)	1.52 (0.17)	nd
$R^2$	0.9775	0.9974	nd

Los números entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza del 95% de los parámetros ajustados. Todos los parámetros cinéticos relacionados con el consumo de glucosa y producción de DPA están en base molar.

Las  $\mu_{\max}$  estimadas muestran que si bien en M1 se obtuvo la velocidad específica más elevada, estadísticamente no presenta diferencias significativas con las de los otros dos medios de acuerdo a los intervalos de confianza del 95%. Las  $\mu_{\max}$  estimadas indican que *Paecilomyces fumosoroseus* creció más lentamente que otros miembros del género. Por ejemplo *P. varioti* tuvo una  $\mu_{\max} = 0.30 \text{ h}^{-1}$  [Heijjnen y Roels, 1981], mientras que *P. farinosus* una  $\mu_{\max} = 0.12 \text{ h}^{-1}$  [Inch y Trinci, 1987]. Asimismo fue inferior a las  $\mu_{\max}$  reportadas por Vidal y col. (1998) ( $0.08 \text{ h}^{-1}$  to  $0.265 \text{ h}^{-1}$ ), para la cepa 92117 de *P. fumosoroseus*. Sin embargo, la  $\mu_{\max}$  resultó similar a las reportadas ( $\approx 0.40 \text{ h}^{-1}$ ) para la misma cepa creciendo en medios y condiciones de cultivo de características parecidas a las de M1 [de la Torre y Cárdenas-Cota, 1996; Asaff y col., 2005].

Por otro lado, tal como se observa en la Figura 6b, el pH en M1 fue descendiendo en forma gradual conforme el hongo creció hasta alcanzar un mínimo de 2.34 a las 176 horas de cultivo a partir de las cuales hubo un ligero ascenso. El pH en M3 sufrió un ligero incremento

---

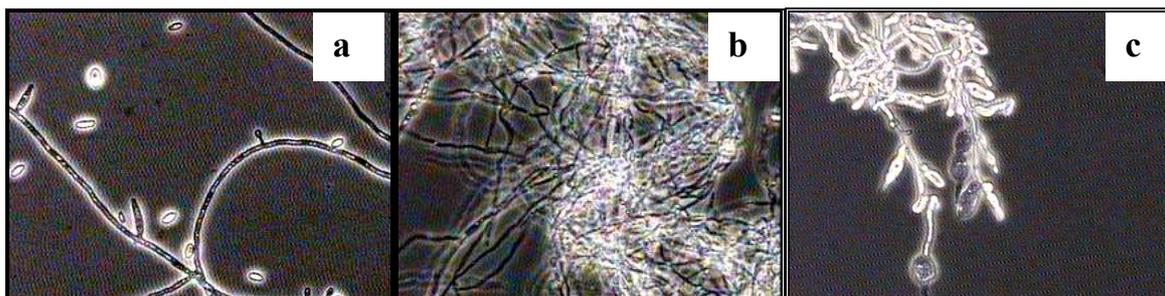
---

alrededor de las 50 h, cuando las esporas empezaron a germinar, pero iniciada la fase de crecimiento exponencial descendió rápidamente y una vez alcanzado un mínimo de 2.93 a las 124 horas se observó un ligero ascenso sostenido hasta el final de la fermentación. El pH en M4 descendió rápidamente hasta 2 cuando las esporas empezaron a germinar entre las 36 y 48 h, manteniéndose constante a partir de este punto hasta el final de la fermentación.

El consumo de glucosa tuvo un perfil relacionado con los patrones de crecimiento. En M1 la glucosa quedó agotada al cabo de 200 h, punto en el cual se alcanzó la biomasa máxima, mientras que al final de las fermentaciones en M3 y M4 ( $\approx 300$  h) quedó como remanente más del 50% del azúcar original (Fig. 6c). En la Tabla 10 se observa que en M1 y M4 el rendimiento específico de biomasa en base a sustrato ( $Y_{X/S}$ ) fue estadísticamente similar, aunque 30% más alto que el alcanzado en M3. Sin embargo, los coeficientes de mantenimiento en M3 y M4, si bien estadísticamente iguales, fueron aproximadamente 380% mayores que en M1. Estos parámetros indican que en M1 la glucosa fue empleada principalmente para la síntesis de biomasa. En M3 el consumo de glucosa se dio principalmente entre las 50 y 150 horas que corresponden al periodo de crecimiento exponencial. Al cabo de este tiempo tanto el crecimiento como el consumo decrecieron drásticamente.

La relación C:N en M1 y M3 fueron 34:1 y 17:1 respectivamente, por lo cual el menor crecimiento observado en M3 no pudo deberse a una limitación por nitrógeno. De hecho se reportó que en el hongo *Talaromyces flavus*, usado como agente de control biológico, relaciones C:N entre 15:1 y 30:1 no tuvieron efecto sobre su crecimiento micelial [Engelkes y col., 1997]. El perfil de consumo de glucosa en M4 fue similar al observado en M3; sin embargo, en este caso el bajo crecimiento y consumo de nutrientes sí pudo haberse debido a la elevada relación C:N (98:1) y/o al descenso excesivo del pH que ocasionó la formación de estructuras deformes como micelio corto, hinchado y con múltiples nodulaciones (Fig. 7). El bajo crecimiento y el desarrollo de estructuras deformes en M4, también fueron observadas por He Zengguo en una estancia posdoctoral (comunicación personal). Estos fenómenos fueron atribuidos al excesivo descenso del pH ocasionado por el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  usado como fuente de nitrógeno en este medio (Fig. 6b).

En el trabajo de He Zengguo se estableció que la adición de diferentes niveles de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u otras sales como  $\text{MgPO}_3$  o  $\text{CaCO}_3$  al mismo medio de cultivo evitaba la formación de estructuras deformes estableciendo un umbral crítico de pH ( $\approx 2.3$ ), abajo del cual se daba la formación de dichas estructuras.



**Figura 7.** Vista al microscopio de las estructuras morfológicas de *P. fumosoroseus* a las 72 horas de cultivo en diferentes medios: **a)** M1; **b)** M3; **c)** M4 (400  $\times$ )

Al igual que en el caso del crecimiento y el consumo de glucosa, la producción de DPA fue severamente influenciada por los medios de cultivo. A fin de evaluar el grado de asociación de su producción con el crecimiento, se graficó la producción de DPA vs. biomasa relativa,  $\xi = X/X_{\max}$  (Fig. 6d). En M1 se alcanzó una producción máxima de DPA de  $0.075 \text{ g L}^{-1}$ . Esta concentración resultó mayor en un 88% a la reportada para la misma cepa creciendo en un medio similar, aunque con una concentración de glucosa menor ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), manteniendo una relación C:N equivalente [Asaff y col., 2005]. Esta diferencia en la concentración final de DPA se correlaciona con la mayor cantidad de nutrientes, pues la productividad específica en base a biomasa,  $q_{p/x}$ , calculada con la  $\mu_{\max}$  estimada para este medio fue de  $1.03 \times 10^{-4} \text{ g DPA g}^{-1} (\text{X}) \text{ h}^{-1}$ , similar a la reportada por Asaff y col. (2005) ( $1.2 \times 10^{-4} \text{ g DPA g}^{-1} (\text{X}) \text{ h}^{-1}$ ). De este valor, el término asociado a crecimiento ( $\alpha$ ) contribuyó con el 78%, mientras que el término no asociado a crecimiento ( $\beta$ ) con el 22% restante. Este hecho es claramente visible en la Figura 6d, donde se observa una línea recta durante casi toda la fermentación, tornándose ligeramente cóncava hacia el final de la misma, indicando que la producción de DPA estuvo asociada principalmente a crecimiento. Si bien en M3 el desarrollo de biomasa fue muy pobre, la producción de DPA fue alta, alcanzando a las 292 h de cultivo, una concentración máxima de  $0.805 \text{ g L}^{-1}$ , 10 veces superior a la obtenida en M1. La productividad específica,  $q_{p/x}$ ,

---

---

calculada con la  $\mu_{\max}$  estimada para este medio fue de  $2.30 \times 10^{-3} \text{ g DPA g}^{-1} (\text{X}) \text{ h}^{-1}$ , 22 veces superior a  $q_{p/x}$  calculada para M1. De este valor, el término asociado a crecimiento contribuyó con el 37%, mientras que el término no asociado a crecimiento con el 63% restante. En este caso, en la Figura 6d se observa una línea cóncava, ilustrando gráficamente que la producción de DPA se dio principalmente de forma no asociada a crecimiento. Si bien en el caso de M3 se dio una importante producción de DPA, el descenso del pH fue más pequeño que en los otros dos medios debido a su mejor capacidad amortiguadora, gracias a un mayor contenido de fosfatos. La producción de DPA por *P. fumosoroseus* en M3 resultó notable en comparación a otros hongos entomopatógenos. Claydon y Grove, (1982) reportan una producción de  $0.133 \text{ g L}^{-1}$  luego de 672 h de cultivo en superficie de una cepa virulenta de *Verticillium lecanii*.

En el caso de M4, si bien hubo un crecimiento ligeramente mayor al observado en M3, contrariamente a lo observado en este medio, la producción de DPA fue prácticamente inhibida, alcanzando concentraciones cercanas a los  $0.023 \text{ g L}^{-1}$ .

### 6.3. Influencia de algunos oligoelementos

#### 6.3.1. Efecto del calcio

En el punto anterior se observaron grandes diferencias en cuanto a la producción de DPA entre M3 y M4. Un análisis de la composición de estos medios muestra que sus principales diferencias fueron la naturaleza de la fuente de nitrógeno (nitrato de potasio para M3 y sulfato de amonio para M4), la relación C:N (17:1 para M3 y 98:1 para M4) y un mayor contenido en M4 de algunos microelementos como el calcio, zinc y hierro. Estudios en *Penicillium citreoviride* señalan que el calcio resulta inhibitorio para la formación de DPA [Kalle y Adkar, 1986]. Para evaluar el efecto de este catión sobre la síntesis de DPA en *P. fumosoroseus*, se modificó su contenido en M3. En un caso fue suprimido de la formulación [M3Ca(-)] y en otro se incrementó su concentración 8 veces (similar al contenido de calcio de M4) [M3Ca(+)]. Al parecer, una concentración abajo de los  $0.05 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en M3 tuvo un efecto positivo pequeño sobre la producción de DPA; sin embargo, una elevada cantidad de esta sal ( $0.40 \text{ g L}^{-1}$ ) tuvo un efecto negativo drástico sobre su síntesis, no así sobre el crecimiento del hongo (Tabla 10). Este hecho muestra que en *P. fumosoroseus*, el calcio en

concentraciones altas, tiene también un resultado inhibitorio sobre la síntesis de DPA como el observado en *P. citreoviride*.

**Tabla 10. Efecto del calcio en el crecimiento de *P. fumosoroseus* y producción de DPA**

Medio	C:N	pH final	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Glucosa residual (g L <sup>-1</sup> )	DPA (g L <sup>-1</sup> )
M3	17:1	3.31 ± 0.15	3.76 ± 0.56	27.90 ± 1.56	0.68 ± 0.09
M4	98:1	1.98 ± 0.01	6.51 ± 0.08	27.50 ± 1.13	0.02 ± 0.01
M3Ca(-)	17:1	3.10 ± 0.07	4.04 ± 0.02	26.65 ± 0.35	0.83 ± 0.01
M3Ca(+)	17:1	3.45 ± 0.09	4.14 ± 0.12	28.50 ± 1.27	0.03 ± 0.00

Todas las mediciones fueron hechas por duplicado transcurridas 312 h de cultivo. La glucosa inicial en todos los casos fue de 45 g L<sup>-1</sup>.

### 6.3.2. Efecto del zinc a nivel de matraz

Las grandes diferencias encontradas tanto a nivel de crecimiento, consumo de sustratos, como en producción de DPA por *P. fumosoroseus* cultivado en M3, llevaron a buscar la razón de este fenómeno. Un análisis de los medios utilizados muestra que la composición de M2 fue muy parecida a la de M3, con una relación C:N idéntica, salvo que se encontraba suplementado con diferentes cationes (0.4 μM Fe<sup>3+</sup>, 14.7 μM Mn<sup>2+</sup>, 1.0 μM Co<sup>2+</sup>, 1.2 μM Mo<sup>6+</sup>, 10.0 μM Zn<sup>2+</sup> y 2.0 μM Cu<sup>2+</sup>). Sin embargo, los resultados obtenidos sobre la producción de biomasa, pH final (Tabla 5) y producción de DPA (Fig. 5) fueron muy diferentes. En M2 se obtuvo una formación de biomasa alta (18.32 g L<sup>-1</sup>), frente a una producción muy pobre en M3 (2.79 g L<sup>-1</sup>). Por su parte el pH en M2 se mantuvo casi constante (≈ 6) mientras que en M3 descendió considerablemente (≈ 3). A su vez, en M2 se observó una pequeña producción de DPA en contraste con la elevada producción en M3.

De los oligoelementos antes señalados, el molibdeno es considerado como un ión esencial para la actividad de la enzima nitrato reductasa, que es la encargada de la conversión de nitrato (fuente de nitrógeno en M2 y M3) a amonio. Por su parte el manganeso y el zinc son conocidos por su importancia para la actividad de diferentes enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) [Moore–Landecker, 1996].

Bajo estas consideraciones, M3 fue suplementado separadamente con estos cationes, evaluando la producción de biomasa, DPA y consumo de glucosa al cabo de 200 h de fermentación. Los resultados son presentados en la Tabla 11.

**Tabla 11. Efecto del Zn, Mo y Mn sobre el crecimiento de *P. fumosoroseus* y producción de DPA**

Medio	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Glucosa residual (g L <sup>-1</sup> )	DPA (g L <sup>-1</sup> )
M3	3.87 ± 0.83	30.53 ± 1.33	0.47 ± 0.04
M3 + 1.2 µM Mo <sup>6+</sup>	3.51 ± 0.44	29.4 ± 0.76	0.52 ± 0.08
M3 + 10.0 µM Zn <sup>2+</sup>	15.78 ± 0.53	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02
M3 + 14.7 µM Mn <sup>2+</sup>	4.12 ± 0.62	27.64 ± 1.14	0.51 ± 0.04

Todos los análisis se realizaron por duplicado. La glucosa inicial en todos los casos fue de 50 g L<sup>-1</sup>.

Se observó que la adición de zinc tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento del hongo y negativo en la producción de DPA. En el medio suplementado con 10.0 µM Zn<sup>2+</sup> la biomasa se incrementó 4 veces mientras que la formación de DPA disminuyó 3.4 veces. Este elemento ya había sido señalado como importante para el crecimiento óptimo de *P. fumosoroseus* [Cliquet y Jackson, 1999]. Aunque la adición de los otros cationes en los niveles ensayados no tuvo efecto sobre la fisiología del hongo, no se puede descartar que fueran aportados como trazas por las otras sales empleadas en la formulación del medio de cultivo y que esa cantidad resultara suficiente para soportar el crecimiento del hongo.

En el caso de M1 también se observó una producción de biomasa alta y una baja producción de DPA (Fig. 6). En este medio, aunque no se aportó zinc en forma de alguna sal, se utilizó una fuente compleja de nitrógeno como el extracto de levadura, el cual se sabe contiene factores de crecimiento como vitaminas y oligoelementos entre los que destacan el sodio, potasio, magnesio y fósforo; en menor proporción el hierro, cobre y zinc y como trazas el manganeso, cromo selenio y níquel. El contenido aproximado de zinc en 100 g de extracto de levadura es de 2.8 mg [Paul y Southgate, 1978], equivalente a una concentración de 2.2 µM Zn<sup>2+</sup> en M1 (de acuerdo a su contenido de extracto), que al parecer fue suficiente para soportar un buen crecimiento del hongo.

Adicionalmente se evaluó el efecto de diferentes niveles de zinc sobre el crecimiento de *P. fumosoroseus* y la síntesis de DPA. Con este propósito se usó como medio basal M3. Se

partió de una concentración máxima de 100  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ , diez veces superior a la encontrada en M2 y se fueron haciendo diluciones sucesivas 1:10 (Tabla 12). Sin embargo, no se evaluaron concentraciones aún mayores de este catión metálico, bajo el antecedente de que el zinc a concentraciones elevadas ( $> 4000 \mu\text{M}$ ), a diferencia de otros metales pesados, prácticamente no tuvo efecto sobre el crecimiento, esporulación y virulencia de *Verticillium lecanii* [Ropek y Para, 2002]. Solo se tomaron los datos hasta las 236 h ya que a este tiempo se alcanzó la biomasa máxima y la glucosa fue agotada a las concentraciones más altas de zinc.

Se observaron umbrales críticos en la concentración del catión en los cuales se dio un cambio efectivo en el crecimiento, mientras que entre ciertas concentraciones, la biomasa máxima se mantuvo prácticamente constante.

El consumo de glucosa estuvo acorde con el crecimiento observado. A 100 y 10  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ , la glucosa fue consumida en su totalidad a las 236 h, pero a concentraciones menores hubo una cantidad importante de glucosa remanente.

**Tabla 12. Efecto de la adición de zinc al medio M3 sobre el crecimiento de *P. fumosoroseus* y producción de DPA**

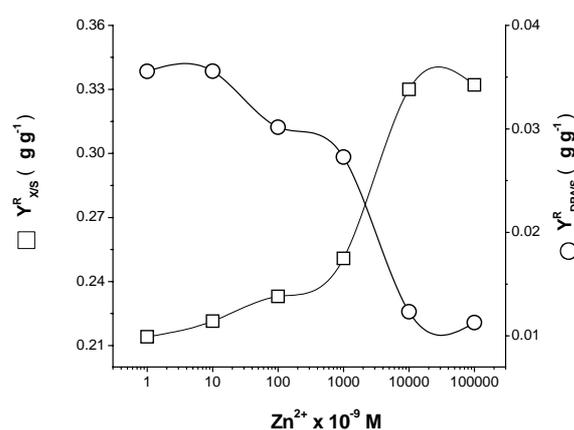
Nivel $\text{Zn}^{2+}$	Biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ )	Glucosa residual ( $\text{g L}^{-1}$ )	DPA ( $\text{g L}^{-1}$ )
100 $\mu\text{M}$	$15.61 \pm 0.01^a$	$0.00 \pm 0.00^a$	$0.53 \pm 0.03^a$
10 $\mu\text{M}$	$17.12 \pm 0.14^a$	$0.00 \pm 0.00^a$	$0.64 \pm 0.06^a$
1 $\mu\text{M}$	$8.83 \pm 0.04^b$	$11.80 \pm 0.28^b$	$0.96 \pm 0.11^b$
0.1 $\mu\text{M}$	$7.34 \pm 1.22^b$	$15.50 \pm 1.27^b$	$0.95 \pm 0.03^b$
0.01 $\mu\text{M}$	$3.30 \pm 0.82^c$	$32.10 \pm 0.14^c$	$0.53 \pm 0.01^a$
0.001 $\mu\text{M}$	$2.89 \pm 1.12^c$	$33.50 \pm 0.71^c$	$0.48 \pm 0.02^a$

Todas las mediciones fueron hechas por duplicado transcurridas 236 h de cultivo. Medias con la misma letra indican que no presentan diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) según la prueba de Tukey-Kramer. La glucosa inicial en todos los casos fue de  $47 \text{ g L}^{-1}$ .

Las concentraciones finales de DPA alcanzadas a 100, 10, 0.01 y 0.001  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  fueron estadísticamente similares. A 1 y 0.1  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  la producción se incrementó prácticamente al doble, observando también una formación notable de pigmentos amarillo

verdosos. Es conocido que diversas especies de bacterias y hongos producen sideróforos en medios deficientes en hierro [Winkelmann, 2002]. Estos metabolitos están encargados de solubilizar y facilitar su transporte y en muchos casos son sustancias de color. Probablemente los pigmentos observados fueron este tipo de compuestos, dado que los medios de cultivo empleados estuvieron limitados en este elemento. Aunque los sideróforos tienen una alta afinidad por el hierro, también se ha encontrado que son capaces de quelar a otros cationes metálicos como el zinc [Neu, 2000].

La Figura 8 muestra los rendimientos específicos en base a sustrato, calculados a partir de las concentraciones finales de biomasa, glucosa y DPA ( $Y_{X/S}^R$  y  $Y_{DPA/S}^R$ ), como una función de la concentración de zinc en escala logarítmica.



**Fig. 8.** Efecto del zinc sobre los rendimientos específicos de biomasa y DPA en base a sustrato

Se observó que  $Y_{X/S}^R$  incrementó considerablemente con la concentración de zinc, mientras que  $Y_{DPA/S}^R$  tuvo un comportamiento inverso. El perfil de la Figura 8, graficada en escala semilogarítmica, indica que existen umbrales críticos ( $< 10$  y  $> 1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ) en la concentración de zinc a los cuales los rendimientos cambian sustancialmente.

Los resultados obtenidos concuerdan con los de Hodson y Foster (1966), quienes observaron que los rendimientos de producción de DPA en fermentaciones líquidas de *Penicillium citreoviride* eran elevados cuando el hongo crecía pobremente en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno, pero en ausencia de minerales esenciales como el zinc para el

---

crecimiento. También se observó un efecto similar del zinc sobre el crecimiento y producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Según Wold y Suzuki (1976), el zinc juega un papel importante en la regulación del crecimiento y la acumulación de citrato en este hongo. A niveles elevados del catión ( $\approx 2 \mu\text{M}$ ), los cultivos tienen una fase de crecimiento exponencial prolongada, pero cuando el medio se limita ( $< 0.2 \mu\text{M}$ ), el crecimiento entra tempranamente en fase estacionaria, iniciándose la acumulación de ácido cítrico. La adición de zinc al cultivo es capaz de revertir el fenómeno.

Posteriormente, se logró identificar al ácido oxálico (OXA) como uno de los principales metabolitos de *P. fumososeus*, que junto con el DPA y la biomasa constituyen los productos de fermentación mayoritarios. Con el propósito de evaluar el efecto del zinc en la distribución de carbono entre estos productos, se usó el medio de cultivo modificado M3 glut(+), en el cual el nitrato de potasio de M3 había sido reemplazado con glutamato guardando la misma relación C:N (17:1). Este cambio facilitó el análisis cuantitativo por HPLC del OXA al no existir interferencias con componentes residuales del medio de cultivo como ocurría con M3.

En el medio modificado M3 glut(+), al igual que en M3, el crecimiento, consumo de glucosa y producción de DPA fueron afectados por la concentración de zinc. También hubo un efecto sobre la producción de OXA (Tabla 13). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las  $\mu_{\text{max}}$  ( $P \leq 0.05$ ) que tuvieron un valor promedio de  $0.035 \text{ h}^{-1}$ . Solo se tomaron los datos hasta las 248 h ya que a este tiempo se alcanzó la biomasa máxima y la glucosa fue agotada a la concentración más alta de zinc. Debido al número pequeño de repeticiones y la dispersión de datos no se observó una diferencia significativa entre la biomasa alcanzada a 100 y  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , pero sí respecto a la biomasa obtenida a  $0.01 \mu\text{M Zn}^{2+}$ .

Solo a la concentración de zinc más alta la glucosa fue agotada después de 248 h de cultivo. Como en los anteriores casos, se observó que tanto la producción de biomasa como el consumo de nutrientes se incrementaron conforme lo hizo la concentración de zinc en los niveles ensayados

**Tabla 13. Efecto de la adición de zinc al medio M3 glut(+) sobre el crecimiento de *P. fumosoroseus* y producción de DPA y OXA**

Nivel Zn <sup>2+</sup>	Biomasa (g L <sup>-1</sup> )	Glucosa residual (g L <sup>-1</sup> )	DPA (g L <sup>-1</sup> )	OXA (g L <sup>-1</sup> )
100 µM Zn <sup>2+</sup>	18.92 ± 1.34 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.81 ± 0.26 <sup>a</sup>
1 µM Zn <sup>2+</sup>	13.24 ± 2.05 <sup>a</sup>	11.80 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.06 <sup>b</sup>	3.15 ± 0.14 <sup>ab</sup>
0.01 µM Zn <sup>2+</sup>	4.84 ± 0.97 <sup>b</sup>	31.75 ± 0.28 <sup>c</sup>	0.90 ± 0.11 <sup>c</sup>	3.43 ± 0.10 <sup>b</sup>

Todas las mediciones fueron hechas por duplicado transcurridas 248 h de cultivo. Medias con la misma letra indican que no presentan diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) según la prueba de Tukey-Kramer. La glucosa inicial en todos los casos fue de 50 g L<sup>-1</sup>.

Por el contrario, la producción de DPA se vio favorecida por una disminución de la concentración del catión. El reemplazo del nitrato de M3 por glutamato tuvo un efecto moderado sobre la producción de biomasa y DPA, los cuales se incrementaron en un 26 y 51% respectivamente a la concentración de zinc más baja. Este aminoácido, uno de los productos más importantes del ciclo de Krebs, es utilizado para la síntesis de otros aminoácidos y biomasa [McCammon y col., 2003; Stephanopoulos y col, 1998] y también para la formación del aspartato, uno de los principales precursores del DPA [Hodson y Foster, 1966].

La producción de OXA tuvo un comportamiento similar a la del DPA respecto a la concentración de zinc; es decir, se vio favorecida a bajas concentraciones de este elemento. La producción de OXA por *P. fumosoroseus* resultó superior a la de otros hongos entomopatógenos. Por ejemplo a 0.01 µM Zn<sup>2+</sup>, el rendimiento específico de OXA fue 0.709 g g<sup>-1</sup> (biomasa), mientras que una cepa silvestre de *Metarhizium anisopliae*, crecida durante 3 días en un medio suplementado con extracto de levadura, tuvo un rendimiento específico diez veces menor [St Leger y col., 1999]. Por otro lado, mutantes de *Beauveria bassiana* súper productoras de OXA, crecidas en un medio conteniendo 1% (p/v) de cutícula de langosta, alcanzaron niveles de OXA entre 0.075–0.104 g L<sup>-1</sup> [Bidochka y Khachatourians, 1993].

En la Tabla 14 se presentan los rendimientos estimados para biomasa, DPA y OXA en base a sustrato. Al ser cinéticas en matraz no fue posible cuantificar la producción de CO<sub>2</sub> y tampoco se siguió el consumo de glutamato, razón por la cual no se establecieron los balances de materia correspondientes.

**Tabla 14. Rendimientos en base a sustrato de los principales productos de *P. fumosoroseus* crecido en matraces agitados en un medio químicamente definido a diferentes niveles de zinc**

	Concentración de Zn <sup>2+</sup> [μM]		
	100	1	0.01
$Y^R_{SX}$	0.45 (0.04)	0.41 (0.09)	0.32 (0.08)
$Y^R_{DPA/S} \times 10^{-2}$	0.65 (0.01)	2.15 (0.27)	6.21 (0.91)
$Y^R_{OXA/S} \times 10^{-1}$	0.37 (0.05)	0.55 (0.03)	1.25 (0.02)
$\Sigma Y$	0.49	0.48	0.51

Los números entre paréntesis representan la desviación estándar de los parámetros correspondientes. Todos los rendimientos están expresados en base molar.

Se observó que los rendimientos de biomasa fueron aumentando conforme se incrementó la concentración de zinc, mientras que los rendimientos tanto de DPA como de OXA, tuvieron un comportamiento contrario; es decir, fueron favorecidos a bajas concentraciones del catión. Este comportamiento indica que a elevadas concentraciones de zinc, el carbono fue empleado preferentemente para la síntesis de biomasa, mientras que bajas concentraciones el flujo de carbono se dirigió hacia la formación de DPA y OXA, señal de una redirección del metabolismo.

Las productividades específicas en base a biomasa,  $q_{p/x}$ , estimadas para DPA a 100, 1 y 0.01 Zn<sup>2+</sup>, fueron  $3.4 \times 10^{-4}$ ,  $7.4 \times 10^{-4}$  y  $2.0 \times 10^{-3}$  g DPA g<sup>-1</sup> (X) h<sup>-1</sup> respectivamente, mientras que para OXA fueron  $2.4 \times 10^{-3}$ ,  $6.8 \times 10^{-3}$  y  $1.4 \times 10^{-2}$  g OXA g<sup>-1</sup> (X) h<sup>-1</sup>.

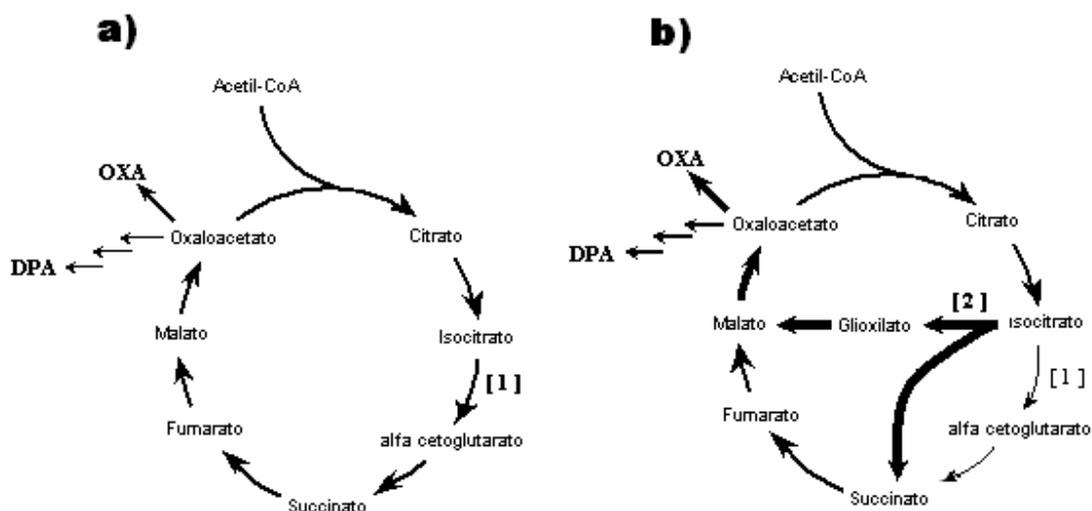
Si bien en los cromatogramas de HPLC no se observó la formación de otros ácidos orgánicos en cantidades significativas, a concentraciones bajas de zinc se apreció la formación de pigmentos que no fueron identificados ni cuantificados. En este experimento no fue posible cuantificar el consumo de glutamato y por tanto no se pudieron establecer los balances de materia correspondientes.

La biosíntesis de DPA se da a partir del dihidrodipicolinato, el cual es formado por condensación entre el piruvato y el aspartato semialdehído proveniente de la reducción del aspartato [Hodson y Foster, 1966; Kanie y col., 1966], que a su vez se sintetiza por la reacción entre el glutamato y el oxaloacetato (OXAA). Por otro lado, el OXA puede ser sintetizado por

---

hidrólisis del OXAA a través de la enzima oxaloacetato hidrolasa [Kubicec y col., 1988] u oxaloacetasa [Munir y col., 2001] o por oxidación del glioxilato, mediante catálisis de la glioxilato oxidasa o glioxilato deshidrogenasa [Yoon y col., 2002]. El OXAA es un intermediario del ciclo de Krebs que puede ser formado por dos vías anapleróticas. En la primera, el OXAA es formado a partir de la carboxilación del piruvato gracias a la acción de la piruvato carboxilasa [Kubicec y col., 1988]. La segunda involucra la vía del glioxilato [Munir y col., 2001], la cual se acopla con el ciclo de Krebs mediante intermediarios y enzimas comunes. La relación entre los flujos de los sustratos a través del ciclo de Krebs y el ciclo del glioxilato, es un factor sustancial para el control del estado energético de la célula bajo diferentes condiciones. Los cambios en esta relación pueden servir a la célula como un mecanismo de respuesta a diferentes condiciones medioambientales [Samokhvalov y col., 2004]. Las enzimas reguladoras del ciclo de Krebs son el complejo de la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y el complejo de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa [Christopher y van Holde, 1998], mientras que la isocitrato liasa es reconocida como la enzima reguladora del ciclo del glioxilato [Yoon y col., 2002]. Muchos de estos complejos enzimáticos requieren de cationes metálicos para una actividad óptima y en muchos casos, cuando los medios de cultivo son deficientes en ellos, la pérdida de actividad conduce a una acumulación de los intermediarios del ciclo. Por ejemplo, el zinc es requerido por varias enzimas entre las que se incluyen peptidasas, liasas y deshidrogenasas [Schomburg y col., [www.brenda.uni-koeln.de/](http://www.brenda.uni-koeln.de/)] para estabilizar intermediarios de reacción o facilitar la unión a cofactores [Christopher y van Holde, 1998; Voet y Voet, 1995]. Se conoce que una alteración en las funciones enzimáticas del ciclo de Krebs ocasiona grandes cambios en la expresión génica, por ejemplo, en *S. cerevisiae* se observó que se activan más de 400 genes por alteraciones en este ciclo [McCammon y col., 2003].

En la Figura 9 se presenta el probable mecanismo que explica el efecto del zinc sobre el metabolismo de *P. fumosoroseus*. Probablemente la isocitrato deshidrogenasa del hongo requiere de este catión como cofactor, al igual que la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> de *Aspergillus wentii* [Majolli y Aguirre, 1999].



**Fig. 9.** Mecanismo propuesto para la acumulación de OXA y DPA bajo limitación de zinc durante el cultivo sumergido de *P. fumosoroseus*. **a)** Sin limitación de zinc **b)** Bajo limitación de zinc. [1] Ciclo de Krebs [2] Ciclo del glioxilato

Posiblemente cuando la concentración de zinc no es limitante (Fig. 9a), se da un funcionamiento normal del ciclo de Krebs, con la consecuente formación de biomasa y una escasa acumulación de intermediarios como el OXAA (precursor del DPA y el OXA). Cuando la concentración de zinc se torna limitante (Fig. 9b), disminuye la actividad de la enzima isocitrato deshidrogenasa, incrementándose el flujo de isocitrato al ciclo del glioxilato y por tanto hay mayor formación de OXAA y sus derivados. Por otra parte, la producción de  $\alpha$ -cetoglutarato se torna deficiente y por tanto la producción de ATP por mol de glucosa disminuye, consecuentemente la producción de biomasa también.

Un sistema de regulación similar fue descrito por Yoon y col. (2002) en el que el cambio entre la etapa vegetativa y la etapa fructificante del hongo *Fomitopsis palustris* dependió fuertemente de la relación entre los ciclos de Krebs y del glioxilato. Munir y col. (2001) encontraron en el mismo hongo que durante su fase vegetativa, la actividad de la isocitrato deshidrogenasa fue 8 veces más baja que la de la isocitrato liasa y propusieron un acoplamiento metabólico de los dos ciclos que soporta la biosíntesis de OXA y genera NADH como equivalente energético. En dicho sistema, la isocitrato liasa y una enzima hidrolítica del

---

---

OXAA, conocida como oxaloacetasa, juegan un papel esencial en la producción de OXA a partir de OXAA mediante las rutas metabólicas de reciclaje del acetato. En estas vías, el acetato, que es el otro producto de la hidrólisis del OXAA, reacciona con el glioxilato formando malato, el cual a su vez es oxidado para reabastecer OXAA y NADH. Cabe destacar que durante el análisis de los sobrenadantes no se detectó la formación de acetato en cantidades significativas, aspecto que respalda el mecanismo propuesto.

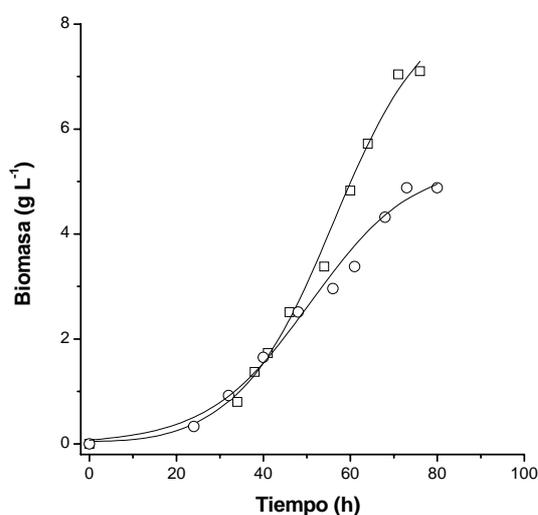
Por otro lado, la utilización del modelo de Luedeking-Piret, originalmente concebido para describir la simulación de la producción de un metabolito primario (ácido láctico) asociado a la obtención de energía, describió bastante bien la producción de DPA y OXA. La aplicación de este modelo al sistema estudiado se justifica plenamente puesto que de darse el fenómeno sugerido en la Figura 9, se estaría bajo los mismos fundamentos bioquímicos y fisiológicos considerados originalmente para su desarrollo. En el caso de la fermentación láctica se establece una proporción 1:1 en la producción molar de lactato y ATP que la célula utiliza como energía para multiplicarse en la fase de crecimiento exponencial y para mantenerse en la fase estacionaria. En el caso de *P. fumosoroseus*, según el mecanismo propuesto, una disminución de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa como una consecuencia de una limitación por zinc, derivaría en una producción de ATP insuficiente para mantener el crecimiento exponencial. Sin embargo, a través de la vía anaplerótica sugerida, la producción de oxalato permitiría la generación de energía para el mantenimiento celular.

### **6.3.3. Efecto del zinc en fermentador sin limitación de oxígeno**

Experimentos preliminares sugirieron que en fermentación líquida la respuesta del hongo a una limitación de zinc podía estar además condicionada a la disponibilidad de oxígeno. Para evaluar esta correlación se hicieron fermentaciones en un reactor agitado, usando como medio basal M3 glut(+) conteniendo 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa y 7 g L<sup>-1</sup> de glutamato a dos concentraciones de zinc (100 y 1 μM Zn<sup>2+</sup>). Esta modificación del medio M3 glut(+), consistente en una reducción del 150 % de la glucosa y glutamato iniciales, se efectuó con el propósito de evitar una excesiva formación de biomasa que usualmente dificulta los procesos de mezclado y de transferencia de masa. El oxígeno disuelto fue mantenido arriba del 60% mediante aire enriquecido con oxígeno u oxígeno puro, manteniendo el flujo de gas (300 mL

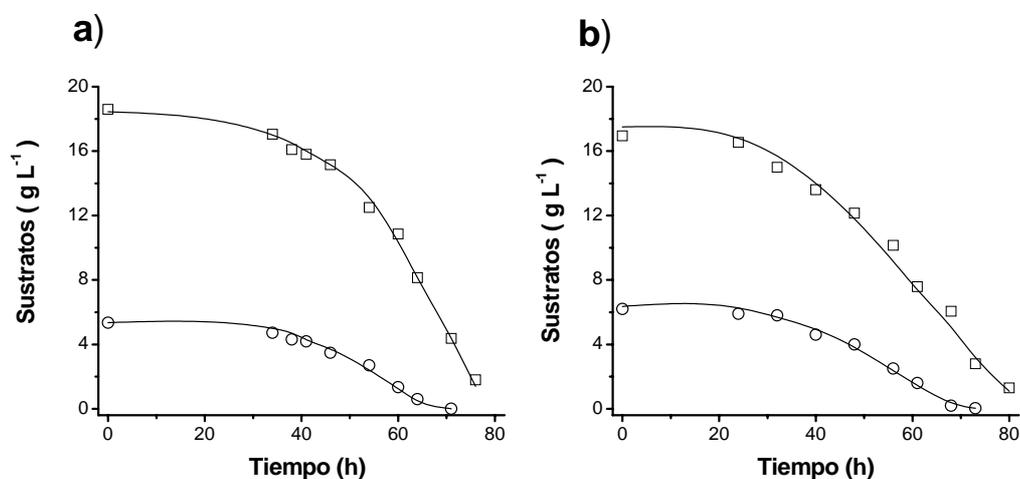
$\text{min}^{-1}$  equivalentes a 0.08 VVM) y la agitación (300 rpm) constantes, con temperatura y pH controlados. Se fijó un flujo bajo de la corriente gaseosa porque en experimentos previos se observó que flujos relativamente elevados ocasionaban la separación completa de la biomasa del caldo de fermentación, transcurrido un cierto tiempo.

Las cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y producción de DPA y OXA a ambas concentraciones de zinc son ilustradas en las Figuras 10, 11 y 12 respectivamente. Los parámetros cinéticos estimados se presentan en la Tabla 15.

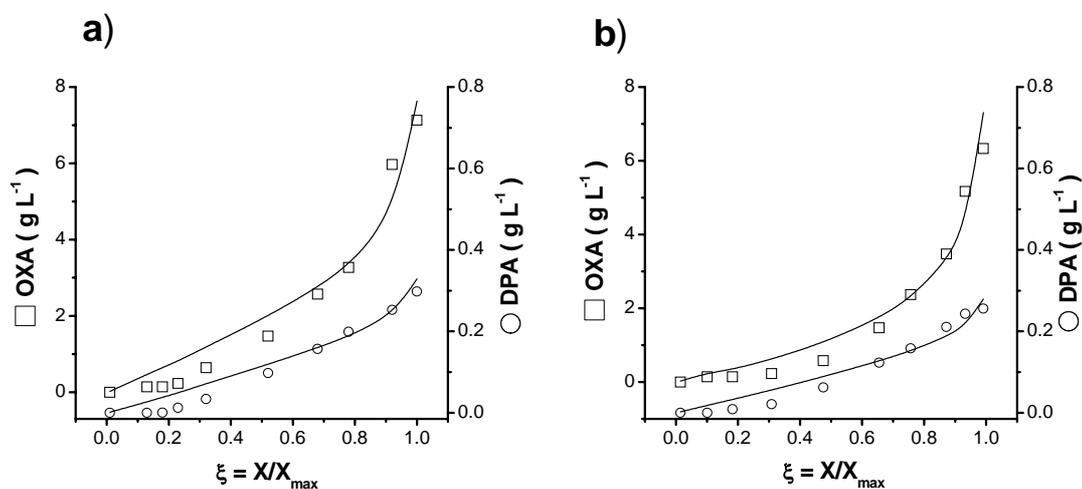


**Fig. 10.** Cinéticas de crecimiento de *P. fumosoroseus* durante su cultivo sumergido sin limitación de oxígeno ( $\text{OD} > 60\%$ ) en fermentador a dos niveles de zinc. □  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ; ○  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ . Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a los datos ajustados al modelo.

Las cinéticas de crecimiento fueron similares durante las primeras 50 horas y a partir de este punto, a  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , la velocidad de crecimiento fue disminuyendo (Fig. 10). La biomasa máxima alcanzada a  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$  fue mayor en un 57% a la obtenida a  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ . Sin embargo, las  $\mu_{\text{max}}$  (Tabla 15) no presentaron diferencias significativas entre sí ( $\approx 0.09 \text{ h}^{-1}$ ), aunque resultaron 125% superiores a las  $\mu_{\text{max}}$  obtenidas en matraz ( $0.040 \text{ h}^{-1}$ ), hecho que señala que la disponibilidad de oxígeno afecta de manera importante la velocidad de crecimiento.



**Fig. 11.** Cinéticas de consumo de sustratos durante el cultivo sumergido de *P. fumosoroseus* sin limitación de oxígeno ( $OD > 60\%$ ) en fermentador a dos niveles de zinc. **a)**  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ; **b)**  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ . ( $\square$  glucosa;  $\circ$  glutamato). Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a los datos ajustados al modelo.



**Fig. 12.** Cinéticas de producción de ácidos orgánicos durante el cultivo sumergido de *P. fumosoroseus* en fermentador sin limitación de oxígeno ( $OD > 60\%$ ) a dos niveles de zinc. **a)**  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ; **b)**  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ . Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a los datos ajustados al modelo.

**Tabla 15. Parámetros cinéticos del cultivo sumergido de *P. fumosoroseus* en fermentador sin limitación de oxígeno (OD > 60%) a dos niveles de zinc**

	100 $\mu\text{M Zn}^{2+}$	1 $\mu\text{M Zn}^{2+}$
$X_{\text{max}}$	8.43 (0.97)	5.37 (0.34)
$\mu_{\text{max}} \times 10^{-2}$	9.30 (1.60)	8.53 (1.74)
$R^2$	0.9966	0.9953
$Y_{\text{SX}}$	0.57 (0.07)	0.32 (0.05)
$m \times 10^{-2}$	2.84 (0.80)	1.82 (1.09)
$R^2$	0.9893	0.9756
$\alpha_{\text{DPA}} \times 10^{-2}$	2.64 (1.01)	3.10 (1.53)
$\beta_{\text{DPA}} \times 10^{-4}$	2.84 (2.55)	5.02 (2.18)
$R^2$	0.9476	0.9512
$\alpha_{\text{OXA}} \times 10^{-1}$	2.01 (1.27)	0.20 (0.07)
$\beta_{\text{OXA}} \times 10^{-2}$	0.84 (0.08)	1.42 (0.47)
$R^2$	0.9437	0.9659

Todos los parámetros cinéticos relacionados con el consumo de sustratos (glucosa + glutamato) y producción de DPA y OXA están en base molar. Los datos entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza del 95% de los parámetros estimados.

Por otra parte, aunque la concentración inicial de nutrientes fue ligeramente diferente (Fig. 11) debido a efectos de dilución por la formación de condensados durante la esterilización, se observó que tanto a alta, como a baja concentración de zinc, primeramente se agotó el glutamato. Posteriormente, la glucosa remanente fue utilizada preferentemente para el mantenimiento y para la síntesis de ácidos orgánicos. El glutamato empleado como fuente de nitrógeno también puede ser utilizado como fuente de carbono. Por esta razón los rendimientos de biomasa en base a sustrato fueron calculados como mol C (biomasa) sobre moles totales de carbono de los sustratos [mol C (glucosa) + mol C (glutamato)]. A 100  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ,  $Y_{\text{X/S}}$ , fue 78% más alto que a 1  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ , mientras que los coeficientes de mantenimiento no mostraron diferencias significativas (Tabla 15). Los rendimientos obtenidos son parecidos a

los reportados por Fernández-Sumano (2002) para la misma cepa de *P. fumosoroseus* creciendo en fermentador en un medio químicamente definido con glucosa y glutamato como fuentes de carbono y de nitrógeno [ $0.32$  y  $0.47 \text{ mol C (X) mol}^{-1} \text{ C (S)}$ ]. Estos rendimientos son bajos comparados con los de otros hongos creciendo sobre glucosa y amonio como *Trichoderma viride*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus nidulans*, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium chrysogenum* ( $0.80$ ,  $0.60$ ,  $0.75$ ,  $0.60$  y  $0.55 \text{ mol C (X) mol}^{-1} \text{ C (S)}$  respectivamente) [Heijnen y Roels, 1981].

Por otro lado, las cantidades formadas de DPA y OXA, tanto a alta como a baja concentración de zinc, fueron muy similares (Fig. 12). A  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ,  $q_{p/x}$  fue  $2.6 \times 10^{-3} \text{ g DPA g}^{-1} \text{ (X) h}^{-1}$ , 7.6 veces más alta que la obtenida en matraz a la misma concentración de zinc y en el mismo medio conteniendo  $50 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa y  $16.7 \text{ g L}^{-1}$  de glutamato. A  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ,  $q_{p/x}$  fue  $3.0 \times 10^{-3} \text{ g DPA g}^{-1} \text{ (X) h}^{-1}$ , 4 veces mayor a la alcanzada en matraz. Los parámetros cinéticos asociados y no asociados a crecimiento para la producción de DPA ( $\alpha$  y  $\beta$ ) no presentaron diferencias significativas de acuerdo a los intervalos de confianza (Tabla 15) y señalan además que en ambos casos, la producción estuvo principalmente asociada a crecimiento ( $\approx 90\%$ ). Este hecho se ilustra gráficamente la Figura 12, en la que se observa que únicamente hacia el final de la fermentación, cuando el glutamato había sido agotado, la producción de DPA no estuvo asociada al crecimiento.

En el caso del OXA, a  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , la productividad específica fue  $4.8 \times 10^{-2} \text{ g OXA g}^{-1} \text{ (X) h}^{-1}$ , 20 veces más alta que la obtenida en matraz a la misma concentración de zinc. A  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ ,  $q_{p/x}$  fue  $2.9 \times 10^{-2} \text{ g OXA g}^{-1} \text{ (X) h}^{-1}$ , 4.3 veces mayor a la alcanzada en matraz. Contrariamente a lo que sucedió en matraz, donde la productividad específica de OXA se incrementó 2.8 veces cuando la concentración de zinc se redujo de  $100$  a  $1 \mu\text{M}$ , a nivel fermentador se produjo un ligero descenso ( $\approx 40\%$ ). A  $100 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , el parámetro cinético asociado a crecimiento ( $\alpha$ ) fue 10 veces mayor que el estimado para  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , mientras que el término no asociado a crecimiento ( $\beta$ ) fue 0.7 veces menor (Tabla 15). Esto significa que a la concentración de zinc más alta, la producción de OXA estuvo asociada a crecimiento en un  $70\%$ , mientras a la menor concentración del catión tan solo en un  $11\%$ . Sin embargo, las diferencias encontradas acerca de la productividad, tanto de DPA, como de OXA entre los

cultivos en matraz y en fermentador no pueden ser atribuidas únicamente a la disponibilidad de oxígeno, sino que además deberá considerarse un posible efecto del pH. En matraz todas las cinéticas fueron desarrolladas a pH libre, mientras que en fermentador a pH controlado (pH  $5.4 \pm 0.1$ ). El efecto del pH durante la producción de OXA por *Aspergillus niger* está bien documentado y se sabe que para alcanzar altas productividades de este ácido es necesario trabajar con pHs entre 5 y 7 [Bohlman y col., 1998]. Para poder discriminar el posible efecto del pH en la síntesis de DPA y OXA durante el cultivo sumergido de *P. fumosoroseus*, aún son necesarios más estudios.

A fin de poder comparar con los resultados obtenidos en matraz (Tabla 14), en la Tabla 16 se incluyen los datos de los rendimientos molares en base a sustratos totales de biomasa,  $Y^R_{SX}$ ; y productos,  $Y^R_{P/S}$ .

**Tabla 16. Rendimientos en base a sustrato total de los principales productos de *P. fumosoroseus* cultivado en fermentador sin limitación de oxígeno a dos niveles de zinc**

	Concentración de $Zn^{2+}$ [ $\mu M$ ]	
	100	1
$Y^R_{SX}$	0.38	0.27
$Y^R_{DPA/S} \times 10^{-2}$	1.68	1.46
$Y^R_{OXA/S} \times 10^{-1}$	2.13	1.91
$\Sigma Y$	0.61	0.48

Todos los rendimientos están expresados en base molar.

Durante el cultivo en fermentador no se observó un efecto notorio del zinc sobre los rendimientos de DPA y OXA. Destaca el hecho de que a la concentración más baja, el porcentaje de recuperación de *C* fue menor que el obtenido a una alta concentración. Probablemente a bajas concentraciones del catión se dio la formación de otros metabolitos no identificados ni cuantificados.

Cabe mencionar que aunque no se midió directamente, el aumento en la viscosidad en el fermentador fue notable a medida que el micelio se fue desarrollando. Es conocido que un incremento de la viscosidad durante el cultivo de hongos filamentosos provoca un gran

---

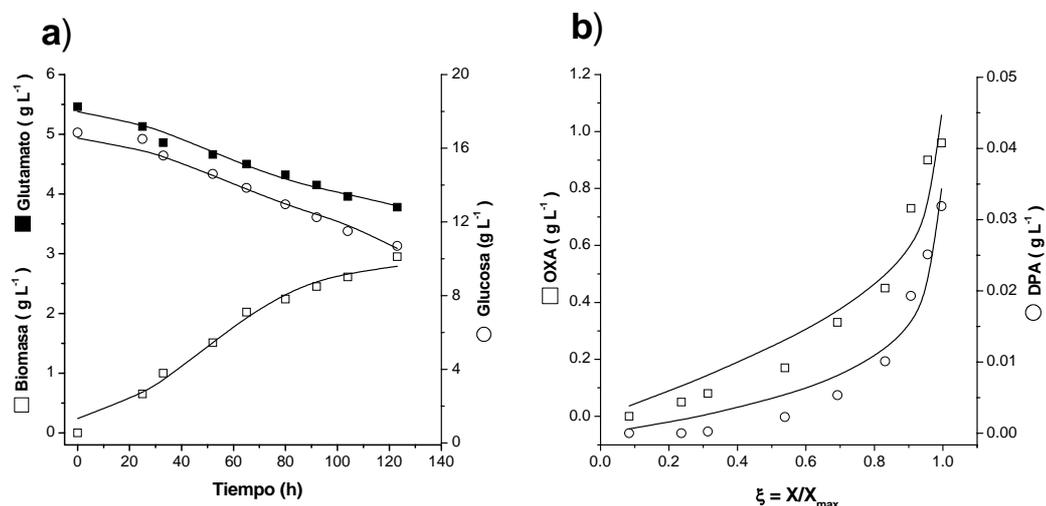
descenso en la velocidad volumétrica de transferencia de oxígeno ( $R_{O_2}$ ) [Atkinson y Mavituna, 1983]. Este descenso obligó a elevar cada vez más el porcentaje de oxígeno en la corriente gaseosa hasta llegar a un 100%, a fin de mantener el oxígeno disuelto arriba del 60%. En cultivos viscosos de hongos filamentosos, el proveer el suficiente oxígeno a los cultivos por difusores convencionales de aire es difícil y muchas de las estrategias empleadas pueden exponer a los hongos a un daño oxidativo por la presencia de especies reactivas de oxígeno [Zhonghu y col., 2003]. Por ejemplo, Fernández–Sumano (2002) encontró que al mantener un cultivo de *P. fumosoroseus* con 100% de oxígeno disuelto, el micelio se deformaba y que las hifas se hinchaban en los extremos, de manera similar a las deformaciones provocadas por un descenso excesivo del pH (Fig 7c), atribuyendo este comportamiento a un “estrés oxidativo”. Sin embargo, en el caso del presente trabajo, no se observó micelio deformado por lo que aparentemente no hubo problemas de estrés oxidativo, probablemente gracias a la mayor cantidad de glutamato empleado. Se ha reportado que en *E. coli.*, el glutamato elevó la producción de una superóxido dismutasa, la cual protege a la célula contra el daño oxidativo [Hyung-Moo y col., 2004].

Los datos presentados muestran que sin limitación de oxígeno, el efecto del zinc sobre el crecimiento, consumo de sustratos y producción de OXA y DPA, fue menos notable, lo que sugiere que en los matraces el oxígeno pudo haberse vuelto limitante a medida que la viscosidad aumentó. Por lo tanto, la disponibilidad de oxígeno podría como se presumía, condicionar la respuesta del hongo a la limitación de zinc, al haber mayor relación  $NAD^+/NADH+H^+$ , requerido como cofactor de la isocitrato deshidrogenasa [Voet y Voet, 1995].

#### **6.4. Efectos de la limitación de oxígeno en fermentador**

Con el propósito de evaluar el efecto de una limitación de oxígeno en FL sobre la fisiología de *P. fumosoroseus*, se cultivó el hongo en el mismo medio, bajo las mismas condiciones controladas de agitación, pH y temperatura que en el punto anterior, a una concentración de  $100 \mu M Zn^{2+}$ . Se alimentó aire a un flujo constante de  $300 mL \min^{-1}$  (0.08 VVM). El nivel de oxígeno disuelto empezó a decaer rápidamente al germinar las esporas del inóculo, llegando a cero a las 27 horas y se mantuvo en este nivel hasta el final de la

fermentación (125 h). Las cinéticas de crecimiento, consumo de sustratos y producción de OXA y DPA bajo las condiciones ensayadas se ilustran en la Figura 13. Los parámetros cinéticos estimados se presentan en la Tabla 17.



**Figura 13.** Cinéticas del cultivo de *P. fumosoroseus* en FL en fermentador con limitación de oxígeno (OD = 0%)  
**a)** Crecimiento y consumo de sustratos **b)** Producción de OXA y DPA en función de la biomasa relativa. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a los datos ajustados a los modelos.

El crecimiento bajo limitación de oxígeno (OD = 0%) fue muy pobre en comparación al obtenido en el cultivo sin limitación (OD > 60%) (Fig. 10). La biomasa máxima alcanzada fue 170% menor, observándose además una relación de micelio/propágulos infectivos menor que la obtenida en los cultivos sin limitación de oxígeno<sup>1</sup>. Al igual que la biomasa, la  $\mu_{\max}$  se redujo considerablemente (100%), resultando similar a las obtenidas en matraz. La mayoría de los hongos son aerobios obligados [Griffin, 1994]. Se sabe que bajas concentraciones de oxígeno restringen el crecimiento de los hongos al limitar la respiración, y es posible correlacionar las velocidades de crecimiento con la concentración de oxígeno mediante el modelo de Monod [Atkinson, 1983; Slininger, 1993]. Por ejemplo, se reportó que *Neurospora crassa*, disminuye su velocidad de crecimiento al reducirse la concentración de oxígeno por debajo 8 mg·L<sup>-1</sup> [Kobr y col., 1967].

<sup>1</sup> Por la importancia que puede tener en una futura aplicación tecnológica el fenómeno observado, en el Anexo A.1 se presentan datos complementarios y un análisis más detallado al respecto.

Al igual que el crecimiento, el consumo de nutrientes fue muy lento y al cabo de 125 horas de fermentación apenas se habían consumido alrededor del 25% de los nutrientes iniciales. Sin embargo, el rendimiento específico de biomasa en base a sustrato,  $Y_{SX}$ , fue un 30% mayor al obtenido en el cultivo sin limitación de oxígeno. No se observaron diferencias significativas en los coeficientes de mantenimiento,  $m$ , (Tabla 17).

**Tabla 17. Parámetros cinéticos del cultivo sumergido de *P. fumosoroseus* en fermentador con y sin limitación de oxígeno a 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$**

	Concentración de oxígeno disuelto	
	0%	> 60% <sup>(a)</sup>
$X_{\max}$	2.87 (0.36)	8.43 (0.97)
$\mu_{\max} \times 10^{-2}$	4.8 (1.7)	9.30 (1.60)
$R^2$	0.9849	0.9966
$Y_{SX}$	0.75 (0.09)	0.57 (0.07)
$m \times 10^{-2}$	2.01 (0.75)	2.84 (0.80)
$R^2$	0.9935	0.9893
$\alpha_{\text{DPA}} \times 10^{-2}$	0.04 (0.04)	2.64 (1.01)
$\beta_{\text{DPA}} \times 10^{-4}$	1.08 (0.47)	2.84 (2.55)
$R^2$	0.9283	0.9476
$\alpha_{\text{OXA}} \times 10^{-1}$	0.58 (0.15)	2.01 (1.27)
$\beta_{\text{OXA}} \times 10^{-2}$	0.13 (0.08)	0.84 (0.08)
$R^2$	0.9012	0.9437

Todos los parámetros cinéticos relacionados con el consumo de sustratos (glucosa + glutamato) y producción de DPA y OXA están en base molar. Los datos entre paréntesis corresponden al intervalo de confianza del 95% de los parámetros estimados. <sup>(a)</sup> Corresponden a los parámetros estimados presentados en la Tabla 15.

Por otro lado, la producción de ácidos orgánicos (Fig. 13b) tuvo una caída drástica si se compara con el cultivo sin limitación de oxígeno (Fig.12a). Las productividades específicas fueron  $1.22 \times 10^{-4}$  g DPA  $\text{g}^{-1}$  (X)  $\text{h}^{-1}$  y  $7.39 \times 10^{-3}$  g OXA  $\text{g}^{-1}$  (X)  $\text{h}^{-1}$ , 21.3 y 6.5 veces más pequeñas respectivamente, que las alcanzadas en el cultivo sin limitación de oxígeno. Los

parámetros cinéticos, tanto para la producción de DPA, como de OXA ( $\alpha$  y  $\beta$ ), resultaron también menores e indican que bajo limitación de oxígeno, la síntesis de estos ácidos se dio principalmente de forma no asociada a crecimiento (Tabla 17).

Los rendimientos en base al consumo de sustratos totales (Tabla 18), muestran que en el cultivo bajo limitación de oxígeno hubo una utilización preferente de carbono para la producción de biomasa, gracias a que los otros productos de fermentación (DPA y el OXA) se formaron en menor cantidad.

**Tabla 18. Rendimientos en base a sustrato total de los principales productos de *P. fumosoroseus* cultivado en fermentador con y sin limitación de oxígeno a 100  $\mu\text{M Zn}^{2+}$**

	Concentración de oxígeno disuelto	
	0%	> 60% <sup>(a)</sup>
$Y^R_{SX}$	0.45	0.38
$Y^R_{DPA/S} \times 10^{-2}$	0.51	1.68
$Y^R_{OXA/S} \times 10^{-1}$	0.81	2.13
$\Sigma Y$	0.54	0.61

Todos los rendimientos están expresados en base molar. <sup>(a)</sup> Corresponden a los rendimientos estimados presentados en la Tabla 16.

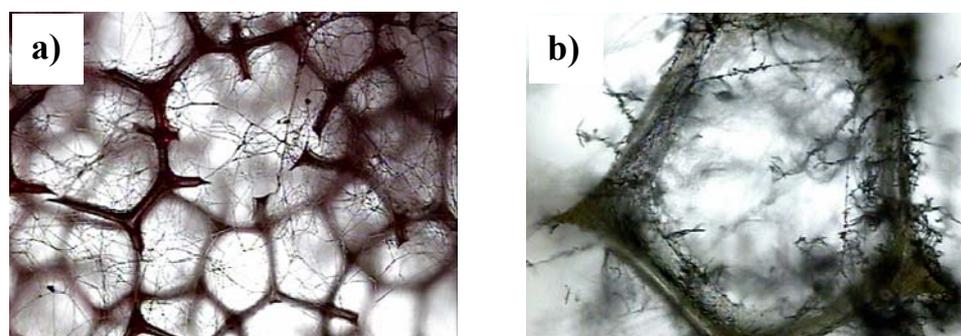
### 6.5. Efecto del sistema de cultivo

Se conoce que el metabolismo de los hongos y por tanto la producción de metabolitos y enzimas es afectado de gran manera por el sistema de cultivo [Biesebeke y col., 2002; Viniegra-González y col., 2002].

Con el propósito de evaluar el efecto del sistema de cultivo sobre el comportamiento de *P. fumosoroseus*, se desarrolló un estudio comparativo en FS y en FL. Para ello se empleó el medio M3, a dos concentraciones de zinc (1 y 0.001  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ).

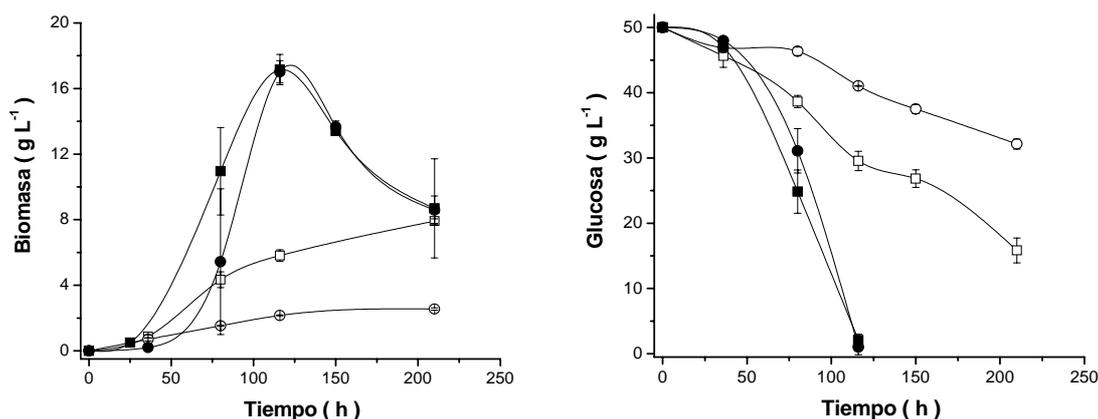
En FS se observó un buen crecimiento de la biomasa, la cual se fue desarrollando entre los intersticios del soporte como micelio aéreo, tal como se puede observar en la Figura 14. Al cabo de aproximadamente 120 horas de fermentación se empezaron a observar conidios

aéreos, incrementándose su producción en las horas posteriores. Por esta razón, los cultivos en FS adquirieron una tonalidad café característica de este tipo propágulos.



**Fig. 14.** a) Micelio aéreo de *P. fumosoroseus* desarrollado entre los intersticios del soporte a las 70 h de cultivo (100 ×). b) Micelio esporulado a las 140 h de cultivo (200 ×).

En la Figura 15a se puede apreciar que la biomasa máxima alcanzada en FS fue mucho más alta que en FL a cualquiera de los dos niveles de zinc ensayados. En efecto, los niveles de biomasa máxima alcanzados en FS resultaron similares a aquellos obtenidos en FL en medios sin limitación de zinc como M1 o M2 ( $\approx 17 \text{ g L}^{-1}$ ). En el caso de la FL, como se había visto anteriormente, la concentración del catión influyó notablemente en la producción de biomasa mientras que en FS no tuvo efecto.



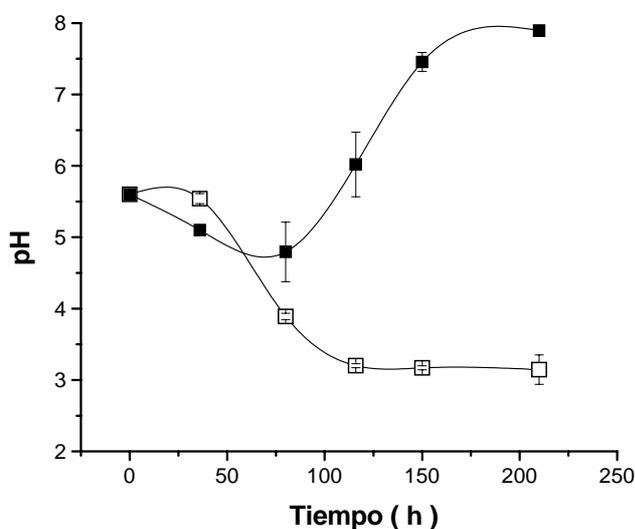
**Fig. 15.** a) Cinéticas de crecimiento de *P. fumosoroseus* en FS ■ 1  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ; ● 0.001  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  y FL □ 1  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ; ○ 0.001  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ . b) Cinéticas de consumo de glucosa en FS ■ 1  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ; ● 0.001  $\mu\text{M Zn}^{2+}$  y FL □ 1  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ ; ○ 0.001  $\mu\text{M Zn}^{2+}$ .

En FL, a la concentración de zinc mayor, la tasa de crecimiento más alta se obtuvo aproximadamente entre las 30 y las 75 h de cultivo, punto en el cual la velocidad empezó a declinar, mientras que a la concentración más baja se observó un crecimiento casi lineal. En FS se esperaba un comportamiento similar pero la velocidad específica de crecimiento,  $\mu_{\max}$ , en este sistema de cultivo fue  $0.15 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ , prácticamente 2.8 veces mayor a la obtenida en FL ( $0.04 \text{ h}^{-1}$ ). Tanto en FS, como en FL, no se observó un efecto de la concentración de zinc sobre la velocidad máxima de crecimiento. En FS, gracias a la elevada velocidad de crecimiento, tanto a alta como a baja concentración de zinc, la concentración máxima de biomasa se alcanzó a las 116 h de cultivo, punto en el que la glucosa en ambos casos había sido agotada (Fig. 15b). Posteriormente, la biomasa empezó a declinar, probablemente por lisis del micelio, y empezaron a aparecer las primeras esporas<sup>1</sup>. El rendimiento específico en base sustrato estimado fue de  $0.55 \text{ g (X) g}^{-1}$  (glucosa). En el caso de la FL, el consumo de glucosa fue acorde con el crecimiento. A la concentración de zinc más alta hubo un mayor consumo de glucosa mientras que a la concentración más baja su consumo fue menor, quedando remanente una cantidad considerable ( $\approx 35 \text{ g L}^{-1}$ ).

Únicamente se evaluó la concentración de DPA al final de las fermentaciones al constatar que este producto no se degrada ni es reinternalizado por la célula. En FS, a  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , se alcanzó una concentración de DPA de  $123 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que a  $0.001 \mu\text{M Zn}^{2+}$ , la concentración alcanzada fue de  $174 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ . En FL, las concentraciones de DPA fueron  $325 \pm 25 \text{ mg L}^{-1}$  y  $181 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$  a  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$  y  $0.001 \mu\text{M Zn}^{2+}$  respectivamente. El crecimiento alcanzado y la producción de DPA en FS, contrastaron con los obtenidos en FL.

Pese a que el medio y las condiciones de cultivo fueron similares, la evolución del pH fue diferente (Fig. 16). Aunque en FS se produjeron DPA y OXA capaces de acidificar el medio, el pH solo descendió ligeramente durante las primeras horas de cultivo, alcanzando un mínimo a las 80 h para luego nuevamente empezar a ascender y alcanzar la zona alcalina.

<sup>1</sup> En el Anexo A.2 se presentan datos complementarios a cerca de la esporulación en FS y como se vio afectada por la concentración de zinc.



**Fig 16.** Evolución del pH durante el cultivo de *P. fumosoroseus* en FS ■ y FL □ a  $1 \mu\text{M Zn}^{2+}$

El ascenso del pH a partir de las 116 horas durante la FS, fue posiblemente coadyuvado por la lisis del micelio, al observarse un descenso de la biomasa en las horas posteriores y verificarse que en ese punto se habían agotado los nutrientes.

Se ha reportado que diferentes hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* son capaces de producir amonio para subir el pH de medios excesivamente ácidos, como un mecanismo de adaptación y sobrevivencia en el ambiente de su hospedero [St Leger y col., 1999]. La producción de amonio por los hongos entomopatógenos y su relación con la regulación de su microambiente representa otro factor de virulencia que no había sido considerado previamente, además con el potencial de dañar tejidos y perturbar la respuesta inmune del hospedero [St Leger y col., 1999]. Un análisis colorimétrico de los sobrenadantes correspondientes a las 116 h de cultivo de *P. fumosoroseus* en FS y FL con un kit para detección de amonio, mostró una formación entre 3 a 6 veces más alta de este catión en FS que en FL. Probablemente en FL, una producción específica de ácidos orgánicos alta y una formación de amonio baja hicieron que el pH en este sistema de cultivo descendiera, mientras que en FS, una producción específica de ácidos orgánicos baja y una liberación de amonio mayor ocasionaron el incremento del pH. La capacidad de los hongos entomopatógenos para regular el pH de su microambiente en FS, ya sea mediante la secreción de sustancias ácidas

---

---

como OXA o básicas como amonio [St Leger y col., 1999], les permite estimular la producción de otros factores de virulencia como enzimas necesarias para la degradación de la cutícula de los insectos. La síntesis de proteasas ocurre a pH neutros o ligeramente alcalinos y es inhibida a pH ácidos [St Leger y col., 1998].

El artículo publicado [Asaff y col., 2006], adjunto al manuscrito de tesis (Anexo A.3), contiene información más detallada a cerca de la influencia del sistema de cultivo sobre la distribución de carbono entre los productos de fermentación y la respuesta adaptativa a la limitación de zinc de *P. fumosoroseus*. A través de los balances de materia se muestra que en FS el carbono es empleado principalmente para la formación de biomasa, mientras que en FL, este elemento es dirigido hacia la síntesis de DPA, OXA y otros compuestos no identificados, especialmente cuando el medio de cultivo es deficiente en zinc. En FS, la producción de ambos ácidos está asociada a crecimiento, independientemente de la concentración de zinc, mientras que en FL bajo limitación de este elemento, su formación está asociada de manera parcial, por una posible redirección del metabolismo cuando la concentración del catión se torna insuficiente para soportar el crecimiento. Por otro lado, se presentan datos a cerca de las demandas volumétricas y las velocidades máximas de transferencia de oxígeno, que muestran que los cultivos en FL no estuvieron en ningún momento limitados por este elemento. Entonces, si la disponibilidad de oxígeno en el seno del líquido o en el ambiente gaseoso que rodea a las estructuras fúngicas no fue el factor limitante, probablemente las variaciones fisiológicas encontradas se deban a diferencias en los fenómenos difusionales involucrados para el transporte de oxígeno a través de la membrana celular y la capa límite. También se ha sugerido que las diferencias fisiológicas que presentan los hongos de acuerdo al sistema de cultivo pudieran deberse a los microgradientes de oxígeno y sustratos que se van creando en el entorno de sus estructuras vegetativas [Viniestra y col., 2002]. Como consecuencia habría variaciones importantes en los flujos de carbono a través de las vías del metabolismo central, principalmente en las ramas reguladas por el balance de coenzimas oxidadas y reducidas, así como en los niveles de ATP y otros compuestos de alta energía.

---

---

## 7. CONCLUSIONES

- La composición del medio de cultivo, las condiciones de operación y el sistema de fermentación modifican la producción de metabolitos insecticidas como el ácido dipicolínico (DPA), el ácido oxálico (OXA) y otros no identificados como pigmentos potencialmente activos por *Paecilomyces fumosoroseus*. Sin embargo, la sensibilidad del bioensayo utilizado, la elevada cantidad en la que son sintetizados ambos ácidos orgánicos y en algunos casos, la interferencia de componentes residuales de los medios de cultivo, no permitieron identificar otros metabolitos minoritarios del hongo con potencial insecticida.
- El DPA y el OXA son los metabolitos mayoritarios, moderadamente tóxicos para *Artemia salina*, producidos por *Paecilomyces fumosoroseus*, aunque únicamente el último fue identificado como el compuesto activo principal de los sobrenadantes tóxicos del hongo, debido a su concentración elevada. En FL en matraz, concentraciones de calcio  $\geq 0.40 \text{ g L}^{-1}$ , inhibieron la producción de DPA, mientras que concentraciones de zinc  $\leq 1 \text{ }\mu\text{M Zn}^{2+}$  estimularon la formación de DPA y OXA en detrimento de la síntesis de biomasa.
- La disponibilidad de oxígeno en el sistema de fermentación modifica la fisiología de *P. fumosoroseus*. En FL, la velocidad específica de crecimiento en cultivos en fermentador, sin limitación de oxígeno, fue igual a la alcanzada en cultivos en FS y considerablemente mayor ( $\approx 2.8$  veces) a las velocidades alcanzadas en cultivos en FL, tanto en matraz, como en fermentador bajo limitación de oxígeno. Un comportamiento similar se observó en las productividades volumétricas de DPA y OXA en FL, aunque no fue posible precisar si la mayor productividad se debió a un efecto del oxígeno o del pH.

- La respuesta adaptativa de *P. fumosoroseus* a una limitación por zinc y la distribución de carbono entre sus productos de fermentación cambia de acuerdo al sistema de cultivo. En FS el carbono es empleado principalmente para la formación de biomasa, mientras que en FL, este elemento es dirigido hacia la síntesis de DPA, OXA y otros compuestos no identificados, especialmente cuando el medio de cultivo es deficiente en zinc. En FS, la producción de ambos ácidos está asociada a crecimiento, independientemente de la concentración de zinc, mientras que en FL bajo limitación de este elemento, su formación está asociada de manera parcial, por una posible redirección del metabolismo cuando la concentración del catión se torna insuficiente para soportar el crecimiento.

## 8. RECOMENDACIONES

- El estudio de la posible producción de sideróforos por el hongo resulta interesante por cuanto muchos de estos compuestos son de naturaleza peptídica y en algunos casos como las destruxinas y la beauvericina (péptidos cíclicos), poseen cualidades insecticidas. No existen reportes acerca de la producción de sideróforos por hongos entomopatógenos.
- Un aspecto complementario importante al presente trabajo de tesis, que permitirá validar en gran parte las explicaciones sugeridas a cerca del rol del zinc en la fisiología de *P. fumosoroseus* y las diferencias ocasionadas por los sistemas de cultivo (FL y FS), es la evaluación de las actividades enzimáticas del ciclo de Krebs y del glioxilato, particularmente de las enzimas isocitrato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  e isocitrato liasa, en presencia y ausencia de zinc, así como en FL y FS.
- Los resultados que puedan obtenerse del punto anterior, complementado con algunos de los datos obtenidos en el trabajo de tesis, permitirían el cálculo de fluxes a través de las herramientas de la ingeniería metabólica, lo cual enriquecería el trabajo y validaría las rutas metabólicas propuestas. La posibilidad de aplicar el cálculo de fluxes en cultivos en lote de *P. fumosoroseus* se origina en la capacidad del hongo de crecer en un medio químicamente definido y mantenerse en estadios cuasi estacionarios prolongados, la disponibilidad de métodos analíticos sencillos para la cuantificación de sustratos y productos de fermentación y una alta de tasa de recuperación de carbono en los balances de materia.
- A fin de discriminar entre el efecto del oxígeno y el pH en FL a nivel fermentador, sobre el incremento en la productividad de DPA y OXA y la velocidad de crecimiento, es necesario realizar experimentos adicionales tanto a pH libre como a diferentes pH controlados. Se podrá complementar con cultivos de lote alimentado, para tratar de establecer una correlación entre la disponibilidad de oxígeno y la de nutrientes.

- Las diferencias en forma, tamaño y coloración de los propágulos sumergidos en diferentes medios podrían tener relación directa con características de resistencia a factores externos como luz, temperatura y desecación así como con la virulencia. El desarrollo de investigación en este campo permitiría generar conocimiento importante para la producción de este hongo, buscando conferir las mejores características al producto final. Adicionalmente y con el mismo fin sería significativo estudiar la interacción entre los propágulos producidos y los sobrenadantes conteniendo metabolitos insecticidas como el DPA y el OXA.
- Aún no queda claro si los propágulos sumergidos tipo conidios son estructuras de reposo y resistencia como las esporas aéreas (conidios). Una característica de éstas últimas es su baja actividad metabólica. Probablemente se puedan conducir estudios de calorimetría para evaluar la actividad metabólica y así poder establecer con mayor precisión si se tratan de estructuras equivalentes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbott W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, **18**: 265–267.
- Adrianopoulos A., Kourambas S., Sharp J.A., Davis M.A., Hynes M.J. (1998) Characterization of the *Aspergillus nidulans nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *Journal of Bacteriology*, **180**: 1973–1977.
- Altre J. A., Vandenberg J. D., Cantone F. A. (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: Correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**: 332–338.
- Alverson J. (2003) Effects of mycotoxins, kojic acid and oxalic acid, on biological fitness of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **83**: 60–62.
- Amat F: (1985) Utilización de Artemia en acuicultura. *Informes técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras*, Septiembre-octubre 1985: 128–129.
- Asaff A., Reyes-Vidal Y., López-y-López E., de la Torre M. (2002) Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*, **21**: 291–295.
- Asaff A., Cerda-García-Rojas C., de la Torre M. (2005) Isolation of dipicolinic acid as an insectidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**: 542–547.
- Asaff A., Cerda-García-Rojas C., Viniestra-González G., de la Torre M. (2006) Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochemistry*, **41**: 1303–1310.
- Atkinson B., Mavituna F. (1983) Gas-liquid mass transfer. In *Biochemical engineering and biotechnology handbook*, The Nature Press, New York, pp. 727–801.
- Audhya T.K., Russell D.W. (1975) Enniatin production by *Fusarium sambucinum*: Primary, secondary, and unitary metabolism. *Journal of General Microbiology*, **86**: 327–331.

- 
- Ballario P., Vittorioso P., Magrelli A., Talora C., Cabibbo A., Macino G. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO Journal*, **15**: 1650–1657.
- Bernardini M., Carilli A., Pacioni G., Santurbano B. (1975) Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, **14**: 1865–1865.
- Bidochka M., Khachatourians G. (1991) The implication of metabolic acids produced by *Beauveria bassiana* in pathogenesis of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **58**: 106–117.
- Bidochka M., Khachatourians G. (1993) Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to an utilizable carbon source but not to virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, **62**: 53–57.
- Biesebeke R., Ruijter G., Rahardjo Y., Hoogschagen M., Heerikhuisen M., Levin A., van Driel K., Schutyser M., Dijksterhuis J., Zhu Y., Weber F., de Vos W., van den Hondel K., Rinzema A., Punt P. (2002) *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. *FEMS Yeast Research*, **2**: 245–248.
- Billich A., Zocher R. (1988) Constitutive expression of enniatin synthetase during fermentative growth of *Fusarium scirpi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 2504–2510.
- Bode H., Bethe B., Höfs R., Zeeck A. (2002) Big effects from small changes: Possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chem BioChem*, **3**: 619–627.
- Bohlman J.T., Cameselle C., Nunez M.J., Lema J.M. (1998) Oxalic acid production by *Aspergillus niger*. Part II: Optimization of fermentation with milk whey as carbon source. *Bioprocess Engineering*, **19**: 337–342.
- Boucias D., Pendland J., Latge J. (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 1795–1805.

- 
- Bradley C.A., Black W.E., Kearns R., Wood P. (1992) Role of production technology in mycoinsecticide development. In: *Frontiers in industrial mycology*. Leatham G.F., ed. London, Chapman and Hall, pp. 160–173.
- Cantone F.A., Vandenberg J.D. (1999). Use of green fluorescent protein for investigations of *Paecilomyces fumosoroseus* in insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, **74**:193–197.
- Carter B.L.A., Bull A.T. (1971). The effect of oxygen tension in the medium on the morphology and growth kinetics of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, **65**:265–273.
- Castilho L., Polato C., Baruque E., Sant’Anna Jr. G., Freire D. (2000) Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, **4**: 239–247.
- Cho Y.J., Park J.P., Kim S.W., Choi J.W., Yun J.W. (2002) Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology*, **35**: 195–202.
- Christopher K.M., Van Holde K.E. *Bioquímica*, 2<sup>nd</sup> ed.; McGraw–Hill: España, 1998.
- Claydon N., Grove J. (1982) Insecticidal secondary metabolic products from the entomogenous fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **40**: 413–418.
- Cliquet S., Jackson M.A. (1999) Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**: 97–102.
- Daigle D., Connick W., Boyette C., Jackson M., Dorner J. (1998) Solid-state fermentation plus extrusion to make biopesticide granules. *Biotechnology Techniques*, **12**: 715–719.
- De la Torre M., Cárdenas-Cota, H.M. (1996). Production of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. *Entomophaga*, **41**: 443–453.
- Delaney M., Wilkins R.M. (1995) Toxicity of microcystin-LR, isolated from *Microcystis aeruginosa*, against various insect species. *Toxicon*, **33**: 771–778.

- 
- Deshpande M. V. (1999) Mycopesticide production by fermentation: Potential and challenges. *Critical Reviews in Microbiology*, **25**: 229–243.
- Dorta B., Arcas J. (1998) Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**: 501–505.
- Engelkes C. A., Nucló R. L., Fravel D. R. (1997) Effect of carbon, nitrogen, and C:N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. *Phytopathology*, **87**: 500–505.
- Fargues J., Maniania N., Delmas J. (1994) Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosoroseus* during in vitro development to *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **64**: 173–178.
- Feng M.G., Poprawski T.J., Khachatourians G.G. (1994) Production, formulation and application of the entomo-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, **4**: 3–34.
- Fernández–Sumano P. (2002) Efecto de la concentración de oxígeno disuelto en el cultivo sumergido de *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de maestría. CINVESTAV-IPN, México D.F., México.
- Finney D.J. (1962) Probit Analysis, Cambridge University Press, Cambridge.
- Fuguet R., Théraud M., Vey A. (2004) Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **138**: 149–161.
- 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.
- Gatto M., Muratori S., Rinaldi S. (1988) A functional interpretation of the logistic equation. *Ecological Modelling*, **42**: 155–159.
- Gillespie A., Claydon N. (1989) The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*, **27**: 203–215.

- 
- Gregorc A., Planinc I. (2002) The control of *Varroa destructor* using oxalic acid. *Veterinary Journal*, **163**: 306–10.
- Griffin D.H. (1994). *Fungal Physiology*. 2ª edición, Wiley-Liss, EE.UU.A.
- Hamill R., Higgins C., Boaz N., Gorman M. (1969) The structure of Beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic for *Artemia salina*. *Tetrahedron Letters*, **49**:4255–4258.
- Hansberg W., de Groot H., Sies, H. (1993) Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, **13**: 287–293.
- Hartl M., Humpf H.U. (2000) Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 1097–1102.
- Hegedus D., Bidochka M., Manipuri G., Khachatourians G. (1992) A comparison of the virulence, stability and cell-wall surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**: 785–789.
- Hegedus D., Khachatourians G. (1995) The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*, **13**: 455–490.
- Heijnen J.J., Roels G. A. (1981) Macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **23**: 739–763.
- Hodson P.H., Foster J.W. (1966) Dipicolinic acid synthesis in *Penicillium citreoviride*. *Journal of Bacteriology*, **91**: 562–569.
- Hölker U., Lenz J. (2005) Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*, **8**: 301–306.
- Hostettmann K., Wolfender J.K. (1997) The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science*, **51**: 471–482.
- Hyung-Moo J., Kwan-Hwa P., Sang-Young K., Jung-Kul L. (2004) L-Glutamate enhances the expression of *Thermus maltogenic* amylase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, **20**: 26–31.
- Inch J.M.M., Trinci A.P.J. (1987) Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *Journal of General Microbiology*, **133**: 247–252.

- 
- Issaly N., Chauveau H., Aglevor F., Fargues J., Durand A. (2005) Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*, **40**: 1425–1431.
- Jackson M. (1999) Method for producing desiccation tolerant *Paecilomyces fumosoroseus* spores. United States Patent N° **5,968,808**.
- Jackson M. A., McGuire M. R., Lacey L. A., Wraight S. P. (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*, **101**: 35–41.
- Janssen F.W., Lund A.J., Anderson L.E. (1958) Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. *Science*, **127**: 26–27.
- Jeffs L.B., Khachatourians G.G. (1997) Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicon*, **35**:1351–1356.
- Jegorov A., Sedmera P., Matha V., Simek P., Zahradnickova H., Landa Z., Eyal J. (1994) Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, **37**:1301–1303.
- Jenkins N.E., Heviefó 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**: 21N–31N.
- Kalle G. P., Adkar S. S. (1986) Fermentative production of dipicolinic acid by *Penicillium citreoviride* from sugarcane molasses. *Journal of Fermentation Technology*, **64**: 493–497.
- Kanie M., Fujimoto S., Foster J.W. (1966) Chemical degradation of dipicolinic acid-C<sup>14</sup> and its application in biosynthesis by *Penicillium citreoviride*. *Journal of Bacteriology*, **91**: 570–577.
- Khachatourians G. (1991) Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. In: *Handbook of Applied Mycology Vol. 2, Humans, Animals and Insects*, Arora DK., Ajello L., Mukerji KG. eds., Marcel Dekker, Inc., New York. pp 613–661.

- 
- Khachatourians G.G. (1996) Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In *The Mycota VI . Human and Animal Relationships*, Howard/Miller eds., Springer-Verlag, Berlin. pp 331–364.
- Kirkland B. H., Eisa A., Keyhani N. O. (2005) Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor source. *Journal of Medical Entomology*, **42**: 346–351.
- Kobr M.J., Bianchi D.E., Oulevey N., Turian G. (1967) The effect of oxygen tension on growth, conidiation, and alcohol production of *Neurospora crassa*. *Canadian Journal of Microbiology*, **13**:805–809.
- Koutinas A., Wang R., Webb C. (2003). Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. *Biochemical Engineering Journal*, **14**: Pages 93–100.
- Kubicec C.P., Schrefel-Kunar G., Wöhrer W., Röhr M. (1988) Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 633–637.
- Kuo-Ching F., Tzyy-Min R., Bing-Lan L., Yew-Min T., Yaw-Nan C. (2004) Effect of fungal pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**: 22–25.
- Lacey L. A., Fransen J. J., Carruthers R. (1996) Global distribution of naturally occurring fungi of *Bemisia*, their biologies and use as biological control agents. In: *Bemisia 1995: Taxonomy, Biology, Damage, and Management*. D. Gerling and R. Mayer, Eds. Intercept, Andover, pp. 401–433.
- Lacey L. A., Frutos R., Kaya H. K., Vail P. (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological Control*, **21**:230–248.
- Lagunes-Tejeda, A. M. (1994). La relación dosis respuesta. En: *El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas*. Vázquez-Navarro M., Saéñz-Colín A., eds., Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp 6–15.
- Linden H., Macino G. (1997) White collar 2, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO Journal*, **16**: 98–109.

- 
- López-y-López E., Chavarría-Hernández N., Fernández-Sumano P., de la Torre M. (2000) Fermentation processes for bioinsecticide production. An overview. *Recent Research Developments in Biotechnology & Bioengineering*, **3**: 1–20.
- Luedeking R., Piret E.L. (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation, Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, **1**: 393–412.
- Majolli M.V., Aguirre S.N. (1999) Effect of trace metals on cell morphology, enzyme activation, and production of citric acid in a strain of *Aspergillus wentii*. *Revista Argentina de Microbiología*, **31**: 65–71.
- Marquardt D.W. (1963) An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, **2**: 431–441.
- McCammon M., Epstein C., Przybyla-Zawislak B., McAlister-Henn L., Butow R. (2003) Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Molecular Biology of the Cell*, **14**: 958–972.
- Mendonça A.F. (1992) Mass production, application and formulation of *Metarhizium anisopliae* for control of sugarcane froghopper, *Mahanarva posticata*, in Brazil. In: *Biological control of locusts and grasshoppers*. Lomer, C.J.; Prior, C., eds. Wallingford, UK; CAB INTERNATIONAL, pp. 239–244.
- Mollier P., Lagnel J., Fournet B., Aïoun A., Riba G. (1994) A glycoprotein highly toxic for *Galleria mellonella* larvae secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria sulfurescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **64**: 200–207.
- Moore-Landecker E. (1996) *Fundamentals of the fungi*. Snaveley S., Hornby M., eds. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA.
- Munir E., Yoon J.J., Tokimatsu T., Hattori T., Shimada M. (2001) A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *PNAS*, **98**: 11126–11130.
- Neu M. (2000) Siderophore-mediated chemistry and microbial uptake of plutonium. *Los Alamos Science*, **26**: 416–417.

- Oostra J., le Comte E.P., van den Heuvel J.C., Tramper J., Rinzema A. (2001) Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **75**:13–24.
- Osborne L., Landa Z. (1992) Biological control of whiteflies with entomopathogenic fungi. *Florida Entomology*, **75**: 456–471.
- Osborne L.S. (1990) Biological control of whiteflies and other pests with a fungal pathogen. United States Patent N° **4,942,030**.
- Osuna-Paez G., Estrada-Ramírez F., Caro-Macías P., Galván-Piña B., Cárdenas-Cota H. (2003) Virulencia de *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith contra ninfas de *Bemisia* (Gennadius) spp. en un cultivo de berenjena (*Solanum melongena* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, **21**: 292–299.
- Papagianni, M., Nokes S.E., Filer K. (2001) Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Technology and Biotechnology*, **39**: 319–326.
- Paul A.A., Southgate D.A.T. (1978) *The composition of foods*, 4<sup>th</sup> edition, McCance and Widdowson's eds., H.M.S.O., London.
- Peeters H., Zocher R., Madry N., Kleinkauf H. (1983). Incorporation of radioactive precursors into beauvericin produced by *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry*, **22**: 119–1720.
- Pirt S.J. (1975) *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, 1<sup>st</sup> ed. Blackwell Scientific Publications, London.
- Rahardjo Y., Weber F., le Comte E., Tramper J., Rinzema A. (2002) Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*, **78**: 539–544.
- Raimbault M., Roussos S., Oriol E., Viniegra-González G., Gutiérrez-Rojas M., Barrios-González J. (1990) Procedimiento de cultivo de microorganismos en un medio sólido constituido por un soporte sólido absorbente comprensible y no fermentable. Patent application MX **178723**.

- 
- Roberts D. (1981) Toxins of entomopathogenic fungi. In: *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*, H. D Burges ed., Academic Press., London, New York, Toronto. pp 442–464.
- Roberts D. (1989) World picture of biological control of insects by fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **84**: 89–100.
- Roberts D., Yendol W. (1971) Use of fungi for microbial control of insects. In: *Microbial Control of Insects and Mites*, H. D Burges and Husseys N. eds., Academic Press., New York. pp 125–149.
- Robinson T., Singh D., Nigam P. (2001) Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolites production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**: 284–289.
- Romero-Gómez S. (2001) Invertase production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. (Spanish) Doctoral thesis, México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa).
- Ropek D., Para A. (2002) The effect of heavy metal ions and their complexons upon the growth, sporulation and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **79**: 123–125.
- Roussos S., Raimbault M., Prebois J.P., Lonsane B.K. (1993) Zymotis, a large scale solid-state fermenter: design and evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **42**: 37–42.
- Salo M., Kiviranta J., Knuutila V., Kangas L., Vuorela H. (1995) Biological activity and enzymatic hydrolysis of retinoates in vitro. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, **3**:71–76.
- Samokhvalov V., Ignatov V., Kondrashova M. (2004) Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxyate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate regulation. *Biochimie*, **86**: 39–46.
- Sánchez S., Demain A. (2002) Metabolic regulations of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**: 895–906.

- 
- Sánchez-Murillo R. (2004) Estudios sobre la reproducción asexual del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de doctorado. CINVESTAV-IPN, México D.F., México.
- Sánchez-Murillo R., de la Torre-Martínez M., Aguirre-Linares J., Herrera-Estrella A. (2004) Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology*, **150**: 311–319.
- Sarker S.D., Laird A., Nahar L., Kumarasamy Y., Jaspars M. (2001) Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry*, **57**: 1273–1276.
- Shapiro S. (1989) Nitrogen assimilation in actinomycetes and the influence of nitrogen nutrition on actinomycete secondary metabolism. In: *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*. Shapiro S., ed., CRC Press, Boca Raton, FL., pp 135–211.
- Schomburg D., Schomburg I., Chang A., Bänisch C. BRENDA the Information System for Enzymes and metabolic Information. Universität zu Köln, Germany. (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>).
- Shima M. (1955) On the metabolic products of the Silkworm Muscardines. *Bulletin of Sericulture Experimental Station*, **14**: 427–449.
- Slininger P.J., Silman C. W., Jackson M. A. (1993). Oxygen delivery requirements of *Colletrichum truncatum* during germination, vegetative growth and sporulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **39**:744–749.
- Smith P. (1993) Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information*, **14**: 71–78N.
- Smits N., Fargues J., Rougier M. (1997) Modelling the persistence of quiescent conidia of the entomopathogenic hyphomycete *Paecilomyces fumosoroseus* exposed to solar radiation. *Bioncontrol Science and Technology*, **7**: 365–375.
- Soccol C., Vandenberghe L. (2003) Overview of applied solid–state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, **13**: 205–218.
- St Leger R., Joshi L., Roberts, D. (1998). Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 709–713.

- 
- St Leger R., Nelson J., Screen S. (1999) The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*, **145**: 2691–2699.
- Stephan D., Zimmermann G. (1998) Development of a Spray-drying technique for submerged spores of entomopathogenic fungi. *Bioncontrol Science and Technology*, **8**: 3–11.
- Stephanopoulos G.N., Aristidou A.A., Nielsen J. (1998) Metabolic pathway synthesis. In: *Metabolic Engineering. Principles and methodologies*; Academic Press: San Diego, California, pp 285–308.
- Suryanarayan S. (2003) Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. *Biochemical Engineering Journal*, **13**: 189–195.
- Taborsky V. (1992) Small-scale processing of microbial pesticides. *FAO Agricultural Services Bulletin*, N° **96**.
- Thibault J., Pouliot K., Agosin E., Pérez-Correa R. (2000) Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and  $k_{La}$  in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **36**: 9–18.
- Thomas K.C., Khachatourians G.G., Ingledew W.M. (1987) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, **33**: 12–20.
- Ulloa M., Herrera T. (1994). Etimología e iconografía de géneros de hongos. *Cuadernos del Instituto de Biología* N° **21**. UNAM. Ed., México, pp 300.
- Vandenberg J., Jackson M., Lacey L. (1998) Relative efficacy of blastospores and aerial conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* against the Russian wheat aphid. *Journal of Invertebrate Pathology*, **72**: 181–183.
- Vey A., Matha V., Dumas C. (2002) Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune. *Journal of Invertebrate Pathology*, **80**: 177–187.

- 
- Vidal C., Fargues J., Lacey L.A., Jackson M.A. (1998) Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycopathology*, **143**: 33–46.
- Vilcinskas A., Jegorov A., Landa Z., Götz P., Matha V. (1999) Effects of beauverolide L and cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Comparative biochemistry and physiology Part C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **122**: 83–92.
- Vilcinskas A., Matha V., Götz P. (1997)<sup>a</sup> Inhibition of phagocytic activity of plasmatocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *Journal of Insect Physiology*, **43**: 475–483.
- Vilcinskas A., Matha V., Götz P. (1997)<sup>b</sup> Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology*, **43**: 1149–1159.
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., Romero-Gómez S.J., Díaz-Godínez G., Augur C. (2002) Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, **3643**: 1–11.
- Voet D., Voet G. *Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed.; John Willey & Sons, Inc: USA, 1995.
- Wang C., Skrobek A., Butt T.M. (2004) Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**: 168–174.
- Wei-Zhen L., Boucias D.G., McCoy C.W. (1995) Extraction and characterization of the insecticidal toxin Hirsutellin A produced by *Hirsutella thompsonii* var. *thompsonii*. *Experimental Mycology*, **19**: 254–262.
- Winkelmann, G. (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions*, **30**: 691–695.

- Wold W.S.M., Suzuki I. (1976) Regulation by zinc and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate of growth and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, **22**: 1093–1098.
- Yoon J.J., Hattori T., Shimada M. (2002) A metabolic role of the glyoxylate an tricarboxylic cycles for development of the copper-tolerant brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*. *FEMS Microbiology Letters*, **217**: 9–14.
- Zahn J., Higgs R., Hilton M. (2001) Use of direct-infusion electrospray mass spectrometry to guide empirical development of improved conditions for expression of secondary metabolites from actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 377–386.
- Zhonghu B., Harvey L.M., Mc Neil B. (2003) Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, **23**: 267–302.

---

---

## ANEXOS

### A.1. Efecto del oxígeno sobre la formación de propágulos de *P. fumosoroseus* en fermentación líquida

#### A.1.1. Introducción

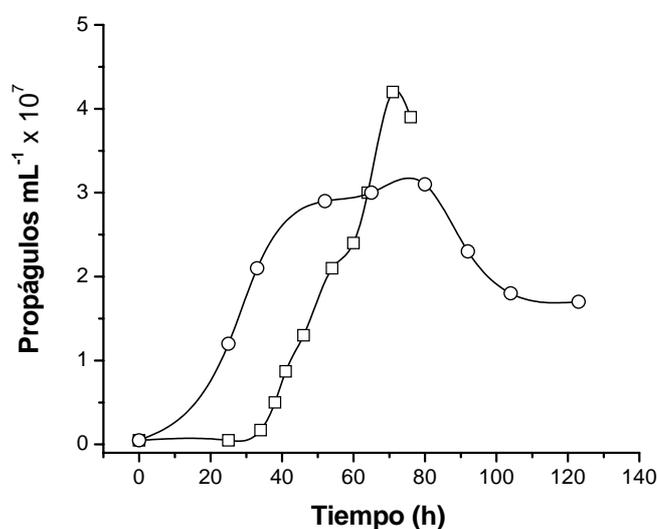
En los experimentos realizados para estudiar los efectos de los medios de cultivo, niveles de oxígeno disuelto y sistemas de fermentación sobre el desempeño del hongo, se investigó también su incidencia sobre la producción de propágulos infectivos por el hongo.

Puesto que la denominación de las unidades infectivas, como blastosporas o conidios sumergidos, que produce *P. fumosoroseus* en FL resulta subjetiva al basarse simplemente en diferencias de tamaño y forma, en muchos casos difíciles de discernir, estas estructuras serán referidas en los párrafos posteriores indistintamente como propágulos infectivos.

#### A.1.2. Efecto del oxígeno durante el cultivo en fermentador

Paralelamente a los estudios de crecimiento y producción de DPA y OXA por *P. fumosoroseus* en fermentador, con y sin limitación de oxígeno, descritos en la Tabla 17, se evaluó su efecto sobre la producción de propágulos infectivos sumergidos. Los resultados se presentan en la Figura 17.

Sin limitación de oxígeno, la producción de propágulos infectivos siguió una cinética similar a la del crecimiento (Fig. 10), alcanzando un máximo de  $4.3 \times 10^7$  propágulos  $\text{mL}^{-1}$  a las 71 h. Bajo limitación de oxígeno, la producción de propágulos alcanzó un máximo de  $3.2 \times 10^7$  propágulos  $\text{mL}^{-1}$  a las 80 h, para luego empezar a descender paulatinamente hasta  $2 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Este descenso se debió a que muchos de estos propágulos iniciaron un crecimiento miceliar. La disminución de la población de propágulos entre las 60 y 80 horas de cultivo ya había sido observado en otros trabajos con la misma cepa pero en condiciones y medio de cultivo diferentes [de la Torre y Cárdenas-Cota, 1996].



**Figura 17.** Producción de propágulos sumergidos de *P. fumosoroseus* en fermentador  
 □ Oxígeno disuelto > 60%. ○ Oxígeno disuelto 0%.

En ambos casos, las concentraciones máximas de propágulos infectivos obtenidas resultan bajas en relación a concentraciones del orden de  $10^8$  reportadas por otros autores en otros medios [Jackson y col., 1999; de la Torre y Cárdenas-Cota, 1996].

Los rendimientos específicos máximos de formación de propágulos para el cultivo sin limitación de oxígeno fueron de  $6.1 \times 10^9$  propágulos  $g^{-1}$  (biomasa) o  $2.1 \times 10^9$  propágulos  $g^{-1}$  (glucosa + glutamato), mientras que bajo limitación de oxígeno, estos rendimientos fueron de  $1.4 \times 10^{10}$  esporas  $g^{-1}$  (biomasa) u  $8.0 \times 10^9$  propágulos  $g^{-1}$  (glucosa + glutamato). El rendimiento específico de propágulos en base a biomasa bajo limitación de oxígeno fue 2.3 veces más alto que el obtenido sin limitación de oxígeno, mientras que el rendimiento en base a sustrato total (glucosa + glutamato) resultó casi 4 veces mayor. Este mismo rendimiento fue 2.5 veces superior al reportado por otros autores [de la Torre y Cárdenas-Cota, 1996]. Esto quiere decir que bajo condiciones de limitación de oxígeno, además de que el C se utiliza preferentemente para la formación de biomasa (Tabla 17), esta tiene una mayor proporción de propágulos infectivos en relación a micelio. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Fernández-Sumano (2002), quien encontró que durante el cultivo de la misma cepa de *P. fumosoroseus* en un fermentador de 3 L, en un medio de características similares

---

aunque con una relación C:N de 88.3:1, a un nivel de oxígeno disuelto del 100%, la máxima concentración de propágulos fue alcanzada a las 96 h, con un rendimiento específico de  $2.86 \times 10^{10}$  esporas  $g^{-1}$  (biomasa), mientras que a un nivel de oxígeno disuelto del 5%, la máxima concentración de propágulos fue alcanzada a las 132 h, con un rendimiento específico de  $3.64 \times 10^{10}$  esporas  $g^{-1}$  (biomasa). Sin embargo, el efecto del nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de propágulos infectivos durante la FL de hongos entomopatógenos, tiene efectos contradictorios dependiendo de la especie de hongo. Por ejemplo, se reportó que durante el cultivo sumergido por lotes de *Colletotrichum truncatum*, la producción de propágulos infectivos se incrementó en un 600% al elevar la concentración de oxígeno desde  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $2.5 \times 10^6$  propágulos $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) hasta  $3.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $1.5 \times 10^7$  propágulos  $\text{mL}^{-1}$ ) [Slininger y col., 1993]. Por el contrario, en un estudio con *Aspergillus nidulans* en cultivo continuo, se observó que sólo se produjeron propágulos tipo conidios al reducir la presión parcial de oxígeno por debajo de 467 Pa, que equivale a menos de  $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de oxígeno disuelto [Carter y Bull, 1971].

Mientras que en FL se ha sugerido que el efecto del oxígeno sobre la formación de propágulos sumergidos está más bien relacionado con una limitación en el metabolismo de la glucosa (respiración), más que a un efecto del oxígeno por sí mismo [Carter y Bull, 1971], en FS, la producción de esporas en *Neurospora crassa*, se encuentra correlacionada con estados de hiperoxidación celular provocados por especies reactivas de oxígeno como el singulete [Hansberg y col., 1993].

En el caso particular de *P. fumosoroseus*, el hecho de que cultivos en FL bajo limitación de oxígeno presenten rendimientos específicos de propágulos infectivos (en relación a biomasa o sustratos) mayores que en cultivos sin limitación de oxígeno, podría tener importantes implicaciones biotecnológicas, ya que dentro del control biológico, son el producto final buscado. La formación preferente de estas estructuras en relación al micelio en condiciones de baja oxigenación resulta muy interesante sobre todo a nivel de la economía del proceso, ya que por un lado permitiría la reducción de materias primas y por otro disminuiría los costos de operación referidos a la aireación del sistema, así como los costos de los procesos “downstream” para la separación del producto final y formulación, gracias a la menor cantidad de micelio formado.

Los resultados obtenidos indican que además de los factores tradicionalmente considerados que inciden sobre el rendimiento específico de formación de propágulos infectivos en FL, existen otros muy importantes como el nivel de oxigenación, más aún considerando que durante el cultivo de hongos, el desarrollo miceliar disminuye en una relación hiperbólica la capacidad de transferencia de oxígeno [Atkinson y Mavituna, 1983].

Como una consideración final cabe señalar, de acuerdo a los resultados obtenidos, que son necesarios estudios más profundos para poder discernir si al margen de las diferencias de tamaño y forma entre los llamados conidios sumergidos y blastosporas, existen otras que permitan afirmar que los primeros son verdaderas estructuras de resistencia como los conidios aéreos y no son en realidad, al igual que las blastosporas, estructuras de crecimiento dimórfico del hongo. Por ejemplo, Fernández-Sumano (2002) intentó encontrar diferencias a nivel de pared celular, para lo cual ensayó sin éxito diversos métodos de tinción y marcaje que incluyeron tinciones con colorantes, tinción con diacetato de fluoresceína, lectinas marcadas con fluoresceína (FITC) y microesferas hidrófobas de polietileno. Únicamente encontró diferencias entre los conidios aéreos y los propágulos sumergidos, que incluyen a conidios sumergidos y blastosporas. De igual manera se encontró que el desarrollo de *P. fumosoroseus* durante el proceso infectivo dentro de un insecto se dio a través de micelio, propágulos similares a los conidios aéreos y blastosporas [Cantone y Vandenberg, 1999].

---

---

## A.2. Efecto del zinc y el sistema de cultivo sobre la formación de propágulos infectivos de *P. fumosoroseus*

Se siguió también la producción de propágulos sumergidos en fermentador en un cultivo sin limitación de oxígeno (> 60%), pero a una baja concentración de zinc (1  $\mu\text{M}$ ). Se encontró que al igual que a una alta concentración de zinc (100  $\mu\text{M}$ ), su producción se fue dando de forma paralela al crecimiento (Fig. 17), disminuyendo alrededor de las 60 h. La máxima concentración de esporas alcanzada en estas condiciones fue aproximadamente 25% menor a la máxima concentración de esporas alcanzada con una alta concentración zinc.

Por otro lado en FS, aunque no se tienen datos cuantitativos, se observó que a una concentración 1  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  se dio una formación de esporas abundante, por lo cual toda la superficie del cultivo adquirió una coloración café, característica de los conidios aéreos, mientras que a una concentración de 0.001  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ , la formación de esporas fue mucho menor, no apreciándose cambio de color en la superficie del cultivo. Si bien en FS la concentración de zinc no tuvo un efecto sobre el crecimiento, al parecer este catión si fue requerido en la esporulación. Se conoce que diferentes microelementos, entre los que se incluyen usualmente el calcio, cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc, son requeridos para el crecimiento y esporulación de hongos entomopatógenos, aunque los requerimientos nutricionales específicos varían de acuerdo a la especie o cepa fúngica en consideración [Taborski, 1992]. Se estableció que en *Neurospora crassa*, el proceso de esporulación está fuertemente regulado por dos proteínas conocidas como white collar 1 (WC-1) y white collar 2 (WC-2) [Ballario y col., 1996; Linden y Macino, 1997], las cuales son activadores transcripcionales que se unen a los promotores de genes inducidos por luz, mediante sus dominios de unión a DNA [Linden y Macino, 1997]. Los genes *wc-1* y *wc-2* presentan regiones de dedos de  $\text{Zn}^{2+}$  que confieren a sus proteínas correspondientes la capacidad de unirse específicamente al ADN. En *P. fumosoroseus* también se encontró evidencia molecular de la existencia de estos genes [Sánchez-Murillo, 2004], lo cual explica en alguna medida el requerimiento de zinc por el hongo para la conidiación en FS.

**A.3. Artículo publicado**

**Carbon distribution and redirection of metabolism in  
*Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and  
liquid fermentations.**

Asaff A., Cerda-García-Rojas C., Viniegra-González G., de la Torre M.

***Process Biochemistry* (2006) 41: 1303–1310.**

Iztapalapa, D.F., a 7 de julio de 2006

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

“Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces  
fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida”

---

que presentó

**Ali Asaff Torres**

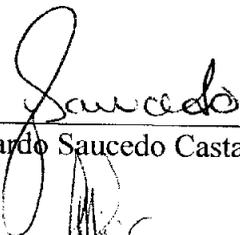
---

Comité Tutorial:

Director: Dr. Gustavo Viniestra González  
Codirectora: Dra. Mayra de la Torre Martínez  
Asesor: Dr. Carlos Cerda García-Rojas

Jurado:

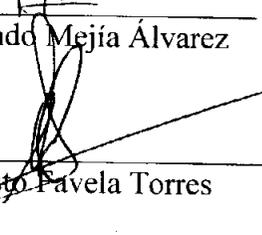
Presidente:

  
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

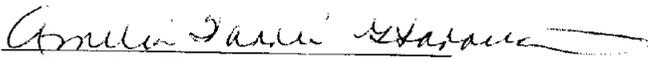
Secretario:

  
Dr. Armando Mejía Álvarez

Vocal:

  
Dr. Ernesto Pavela Torres

Vocal:

  
Dra. Amelia Farrés González