

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

TESIS

“Reutilización de sustrato (arroz-avena) para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* y *Cordyceps javanica*: efectos sobre la calidad y el rendimiento a lo largo de ciclos productivos”

PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.I Nadia Pamela Porras Fajardo

Matrícula: 2223801798

Contacto: nadhya438@gmail.com

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesores: Dra. Jazmín Edith Méndez Hernández

Dr. José Norberto Vásquez Bonilla

JURADO

Presidente: Dr. José Norberto Vásquez Bonilla

Secretario: Dr. Christian Jesús Mora Pérez

Vocal: Dr. Rafael Alejandro Ángel Cuapio

Vocal: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Iztapalapa, Ciudad de México, 05 de noviembre del 2024

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNPC) del CONAHCYT, con la referencia 001465.

Este trabajo fue realizado con apoyo del CONAHCYT (Becario 1255000).

ÍNDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Agricultura.....	10
1.2 Control Biológico	11
1.3 Hongos Entomopatógenos	12
1.3.1 <i>Cordyceps javanica</i>	13
1.3.2 <i>Beauveria bassiana</i>	13
1.4 Plaguicidas en México.....	14
1.5 Producción de Conidios.....	15
1.5.1 Factores que influyen la producción de conidios	16
1.5.1.1 pH	16
1.5.1.2 Amilasas.....	16
1.6 Conservación de Cepas	17
1.7 Zimogramas	18
2. ANTECEDENTES.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL	23
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
8. MATERIALES Y METODOLOGÍA	25
8.1 Microorganismo.....	25
8.2 Conservación de cepas	25
8.3 Sustrato.....	26
8.4 Humedad.....	26
8.5 Medición de Variables	27
8.5.1 Producción de conidios.....	28
8.5.2 pH	28
8.5.3 Humedad.....	28
8.5.4 Amilasas.....	28
8.6 Cultivos sólidos sucesivos sobre el sustrato seleccionado	29



8.6.1	Inoculación de las unidades experimentales.....	30
8.7	Zimogramas	30
8.8	Germinación.....	32
8.9	Viabilidad.....	32
8.10	Análisis Estadístico	33
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
9.1	Selección del sustrato para <i>Cordyceps javanica</i> CHE- CNRCB- 303	34
9.1.1	Producción de conidios.....	34
9.1.2	Humedad.....	35
9.1.3	pH	37
9.2	Selección del sustrato para <i>Beauveria bassiana</i> CHE- CNRCB- 431	38
9.2.1	Producción de conidios.....	38
9.2.2	Humedad.....	39
9.2.3	pH	41
9.3	Ciclos sucesivos para <i>Cordyceps javanica</i> CHE- CNRCB- 303.....	43
9.3.1	Producción de conidios.....	43
9.3.2	Humedad.....	45
9.3.3	pH	47
9.3.4	Germinación	48
9.3.5	Viabilidad.....	49
9.3.6	Producción de Amilasas	51
9.3.7	Pérdida de Peso Seco.....	52
9.3.8	Zimogramas	53
9.4	Ciclos Sucesivos <i>Beauveria bassiana</i> CHE- CNRCB- 431	55
9.4.1	Producción de conidios.....	55
9.4.2	Humedad.....	57
9.4.3	pH	58
9.4.4	Germinación	59
9.4.5	Viabilidad.....	60
9.4.6	Producción de Amilasas	62
9.4.7	Pérdida de Peso Seco.....	63
9.4.8	Zimogramas	64
10.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	69

10.1 <i>Cordyceps javanica</i> CHE-CNRCB-303	69
10.2 <i>Beauveria bassiana</i> CHE-CNRCB-431	70
11. CONCLUSIÓN	72
12. PERSPECTIVAS	73
13. BIBLIOGRAFÍA	74

RESUMEN

El rápido crecimiento demográfico, con una estimación de una población mundial en 2050 de más de 9 mil millones y en aumento, la producción agrícola deberá satisfacer necesidades alimentarias. Este crecimiento constante ha llevado a un incremento de la agricultura, especialmente en el uso de plaguicidas químicos para proteger los cultivos de plagas y enfermedades. Sin embargo, su uso excesivo puede causar graves problemas ambientales y a la salud humana, así como la resistencia de las mismas plagas a estos, por lo que encontrar alternativas sostenibles y seguras se ha convertido en una necesidad, y dentro de estas se encuentra el uso de hongos entomopatógenos.

Los hongos entomopatógenos, como *Beauveria bassiana* y *Cordyceps javanica* se han ocupado para el control biológico de plagas, como una solución prometedora, ya que, infectan, parasitan y pueden llegar a causar la muerte de insectos plaga como el gusano cogollero, ninfa de la mosca blanca, broca del café, mosca de la fruta, psílido de los cítricos mediante la adhesión de los conidios a su cutícula. No obstante, la producción masiva de conidios enfrenta desafíos importantes, especialmente en la selección de sustratos que permitan un crecimiento eficiente y sea económico en procesos de fermentación en estado sólido.

En este trabajo se examinó en tres distintos sustratos arroz, avena, y una mezcla de arroz y avena (50:50) la producción de conidios de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 y *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303, para determinar cuál proporcionaba un mayor nivel de producción en cada hongo. Se encontró que el arroz fue el sustrato óptimo tanto para *C. javanica*, como para *B. bassiana*. Con base en esta selección, se procedió a experimentar con la reutilización del sustrato seleccionado para determinar la cantidad de ciclos productivos y evaluar los efectos sobre la cantidad y calidad de los conidios producidos, en cada caso.

Los resultados obtenidos mostraron en ambos hongos un aumento significativo en su producción en el segundo ciclo reutilizando el sustrato sin adicionar operaciones unitarias (tratamiento previo al sustrato, secado, aireación constante, reinoculación). En el caso de *C. javanica* a partir del tercer ciclo se presentó una notable disminución en la calidad y cantidad de conidios hasta el cuarto y último ciclo, esto al parecer debido a cambios en la humedad y en el pH, principalmente. En el caso de *B. bassiana*, mantuvo los parámetros mínimos en cuanto a la calidad de conidios a lo largo de los 3 ciclos logrados.

En cuanto a la producción de amilasas, enzimas clave sobre la descomposición del almidón presente parte en el arroz, varió entre los dos hongos y en cada ciclo. *C. javanica* mostró una disminución progresiva en la producción de amilasas con cada ciclo de reutilización, lo que coincidió con una reducción en la calidad

de los conidios producidos. Por su parte, *B. bassiana* inicio con una baja de producción de amilasas (0.63 U/gssi y 1.3 U/gssi) durante los primeros dos ciclos, y en el último aumentó significativamente la producción (7.66 U/gssi).

En conclusión, la reutilización y la selección de sustratos para la producción de conidios de hongos entomopatógenos puede contribuir a una producción más sostenible y económica, tomando en cuenta que para su producción el control de factores clave como el pH, la humedad para mantener las condiciones de cultivo dentro de los rangos óptimos es esencial para asegurar la calidad, viabilidad y eficacia de los conidios a lo largo de los ciclos productivos. Además, el monitorear la actividad enzimática (especialmente la producción de amilasas) podría dar un panorama más amplio y certero del efecto de estas enzimas en la degradación del sustrato y la producción de conidios en cada ciclo. De este modo, esta estrategia de reutilización no solo permitiría la reducción de costos de producción, generación de residuos y minimizar la dependencia de plaguicidas químicos, promoviendo prácticas agrícolas más seguras y respetuosas con el medio ambiente.

ABSTRACT

The rapid demographic growth, with an estimated world population of over 9 billion and rising by 2050, that means agricultural production needs to achieve food demands. This constant growth has led to an increase in agriculture, especially the use of chemical pesticides to protect crops from pests and diseases. However, their excessive use can cause serious environmental and human health problems, as well as the resistance of the pests themselves to these. Therefore, finding sustainable and safe alternatives has become a necessity, within these is the use of entomopathogenic fungi.

Entomopathogenic fungi, such as *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica*, have been used for biological control as a promising solution, since they act by infecting, parasitizing and causing the death of pest insects, such as the fall armyworm whitefly nymph, coffee borer beetle, fruit fly, and citrus psyllid, by the adhesion of the conidia to their cuticle. However, mass production of conidia faces important challenges, especially in the selection of substrates that allow efficient and economical growth in solid-state fermentation.

In this study, the production of conidia by *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 and *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 was examined using three different substrates (rice, oats, and a mixture of rice and oat (50:50)) to determine which provided the highest yield for each fungus. Rice was found to be the optimal substrate for both *C. javanica* and *B. bassiana*. Based on this selection, experiments were carried out on with the reuse of the selected substrate to determine the number of production cycles and evaluate the effects on the quantity and quality of the conidia produced in each case.

The results showed a significant increase in the yield of both fungi in the second cycle by reusing the substrate without the use of additional unit operations (any pre-treatment of the substrate, drying, constant aeration, reinoculation). For *C. javanica*, it was observed a notable decrease in the quantity and quality of conidia from the third cycle to the fourth and last cycle, this apparently due to changes in humidity and pH mainly in the substrate. However, *B. bassiana*, the minimum parameters for conidia quality were maintained all through the three cycles achieved.

Regarding amylase production, key enzymes in the degradation of starch present in rice, the production varied between the two fungi and across the cycles. *C. javanica* showed a progressive decrease in amylase production with each reuse, which coincided with a reduction in the quality of the conidia produced. On the other hand, *B. bassiana* started with a low amylase production (0.63 U/gssi and 1.3 U/gssi) during the first and second cycle, but in the last one, there was a significant increase (7.66 U/gssi).

In conclusion, the reuse and selection of substrates to produce conidia from entomopathogenic fungi can contribute into a sustainable and economical production.

It is essential to control key factors such as pH and moisture to maintain optimal growing conditions, ensuring the quality, viability, and efficacy of the conidia throughout the production cycles. Additionally, monitoring enzymatic activity (particularly amylase production) could provide a wide understanding in the effect of these enzymes on substrate degradation and conidia production in each cycle. In this way, the reuse of substrates to produce conidia could be a strategy that not only can reduce production costs and waste generation but also minimize the reliance on chemical pesticides, promoting a safer environment and friendly agricultural practices.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Agricultura

La agricultura cubre alrededor del 40% de las tierras cultivables a nivel mundial y se ha catalogado como una de las actividades que contribuyen a la degradación ambiental. A pesar de los avances en las últimas décadas en la producción agrícola, existen desafíos relacionados con la hambruna y la malnutrición, por lo que la demanda de productos agrícolas sigue en aumento (Larsen *et al.*, 2021).

De Jesús Cenobio-Galindo *et al.* (2024), hacen referencia a un reporte del Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas, en el cual pronostican un aumento en la población mundial para el 2030 llegando a 8.5 mil millones de personas, para el 2050 más de 9.5 mil millones y en el 2100 más de 11 mil millones, motivo por el cual se deberá aumentar la producción agrícola para satisfacer las necesidades de una población mundial en rápido crecimiento.

Ahora bien, el aumento de enfermedades y plagas en cultivos ha llevado a los agricultores a buscar soluciones rápidas y económicas, que incluyen el uso de plaguicidas de origen químico. Sin embargo, el uso excesivo de estos productos químicos tiene consecuencias negativas, como alteraciones en el ecosistema, tales como la contaminación de suelos, canales de riego y un impacto negativo en las especies que habitan esas áreas agrícolas (Mora *et al.*, 2023).

Los plaguicidas de origen químico son absorbidos por las plantas y pasan por procesos de volatilización, lavado, degradación biótica y abiótica en el suelo, lo que conduce a la formación de nuevos productos; pudiendo ser más dañinos y persistentes que los compuestos iniciales. Como evidencia de esto, se ha detectado la presencia de plaguicidas organoclorados y metales pesados en suelos agrícolas (Mora *et al.*, 2023).

Como una de las alternativas a este problema se presenta a la agricultura orgánica para mejorar la sostenibilidad en la producción agrícola; la cual se basa en prácticas de manejo del suelo (Fig. 1), alternar cultivos, control de plagas y enfermedades que no utilizan productos químicos sintéticos, como fertilizantes y plaguicidas de origen químico. Actualmente, la agricultura orgánica cubre solo alrededor del 1.5% de las tierras destinadas a la agricultura globalmente, y se encuentra en crecimiento en cuanto a extensión y ventas. Los alimentos orgánicos contienen menos residuos de plaguicidas de origen químico; sin embargo, algunos autores reportan que la agricultura orgánica obtiene menores rendimientos y es menos eficiente que la convencional, lo que limita su capacidad para alimentar a una población creciente, aunado a que puede ser costosa y poco accesible para agricultores y consumidores (Larsen *et al.*, 2021, Aher *et al.*, 2012).

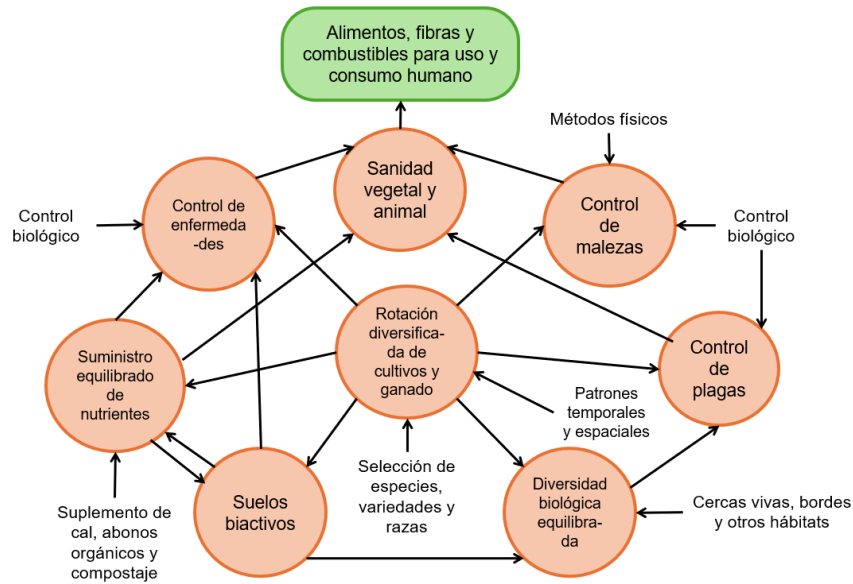


Figura 1. Prácticas de manejo en una agricultura orgánica (modificada de: Reganold y Wachter., 2016)

1.2 Control Biológico

El control biológico implica el uso y aprovechamiento de organismos, o metabolitos que produzcan, para controlar organismos no deseados y sus efectos dañinos sobre el cultivo. El uso de agentes de biocontrol es una estrategia de protección vegetal amigable con el medio ambiente dado que no afecta la salud del consumidor ni a los microorganismos beneficiosos (bacterias lácticas, levaduras, actinomicetos, hongos) (Saldaña-Mendoza *et al.*, 2023, Jwher & Ezzulddin., 2022).

Las bacterias y hongos destacan como agentes de biocontrol por su potencial para degradar agentes contaminantes, promover el crecimiento en las plantas como biofungicidas obiofungicidas y bioinsecticidas y controlando las plagas, ya sea produciendo metabolitos tóxicos específicos, o bien produciendo alguna infección patógena (Keswani *et al.* 2019). La mayoría de estos productos para el control de plagas comprenden especies de hongos y bacterias de los siguientes géneros, tales como, *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.*, *Beauveria spp.*, *Coniothyrium spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Trichoderma spp.* y *Rhizobium spp.* (Powers., 2021).

El desarrollo de nuevos bioplaguicidas está promoviendo la modernización de la agricultura y, sin duda, se espera que gradualmente replacen a muchos plaguicidas de origen químico. Algunos ejemplos de aplicaciones exitosas de bioplaguicidas incluyen el uso las bacterias, hongos, virus y protozoos, incluso agentes o plaguicidas bioquímicos, que comprenden hormonas, reguladores de crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química, que son importantes en la relación planta-insecto (Nava-Pérez *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2021).

1.3 Hongos Entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son agentes de control biológico sobre los cultivos agrícolas, contra diversas plagas, debido a su amplio rango de hospedantes, producción simple, buena persistencia y su alta capacidad infectiva. Estos se utilizan como una alternativa de control sostenible, evitando el excesivo de plaguicidas químicos (Liu *et al.*, 2022). A diferencia de hongos que descomponen materia orgánica, los entomopatógenos parasitan insectos gracias a distintos mecanismos de acción (Bihal *et al.*, 2023).

El proceso de infección de los HE inicia cuando los conidios se adhieren a la cutícula del insecto (huésped vulnerable), siendo este su punto de entrada directo. Tras la adhesión, los conidios penetran y germinan la cutícula mediante mecanismos físicos y enzimáticos. Una vez dentro del cuerpo del insecto, las hifas se desarrollan en la hemolinfa, invaden células sanguíneas provocando la muerte a través del agotamiento de nutrientes, invasión de tejidos, órganos internos y/o mediante la secreción de proteínas y/o metabolitos secundarios que poseen propiedades insecticidas (Fig. 2). En algunos casos pueden causar patologías que regulan su población sin causar directamente la muerte. (Shahbaz *et al.*, 2024; Karthi *et al.*, 2024).

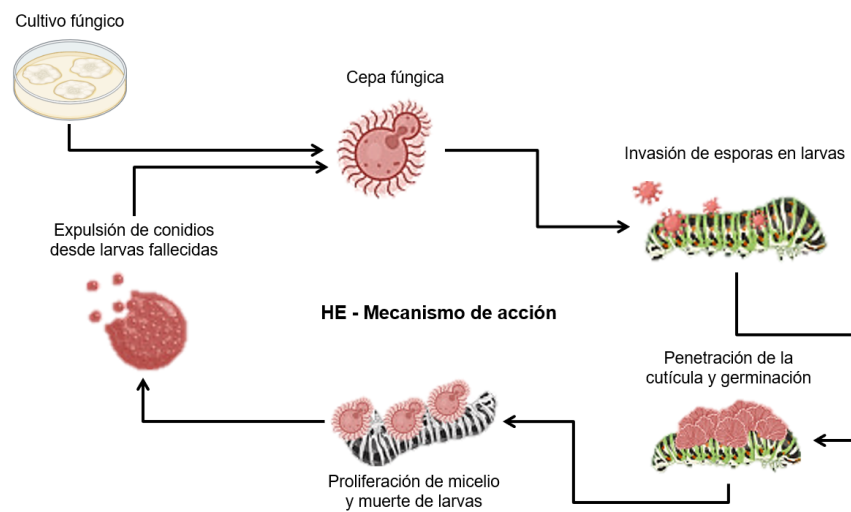


Figura 2. Vista esquemática del método de acción de hongos entomopatógenos (modificada de: Karthi *et al.*, 2024)

Se han reportado más de 700 especies de hongos pertenecientes a unos 90 géneros clasificados como patógenos para insectos, dentro de los géneros más importantes se encuentran: *Metarhizium spp.*, *Beauveria spp.*, *Aschersonia spp.*, *Entomophthora spp.*, *Zoophthora spp.*, *Erynia spp.*, *Eryniopsis spp.*, *Akanthomyces spp.*, *Fusarium spp.*, *Hirsutella spp.*, *Hymenostilbe spp.*, *Paecilomyces spp.* y *Verticillium spp.*, según la FAO, los géneros de importancia son *Metarhizium spp.*, *Beauveria spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Verticillium spp.*, *Rhizopus spp.* y *Fusarium spp.*, estas, estos géneros se encuentran disponibles en una variedad de formulaciones comerciales, incluidos polvos humectables, soluciones líquidas y gránulos

suspendidos, incluso hay estudios que dan evidencia de que pueden colonizar a las plantas y establecerse como endófitos en los tejidos sin causar patogenicidad (Motta *et al.*, 2011; Panwar & Szczepaniec., 2024).

Los conidios de los HE se producen en procesos de cultivo sólido a pequeña, mediana y gran escala (Méndez-González *et al.*, 2022; Muñiz-Paredes *et al.*, 2017). Esta producción implica investigaciones que involucran disciplinas como la patología, ecología, genética y fisiología, así como técnicas para la producción masiva, formulación y estrategias de aplicación (Motta *et al.*, 2011).

1.3.1 *Cordyceps javanica*

El género *Isaria*, ahora *Cordyceps*, es un grupo extenso de HE con un número diverso de especies. La mayoría de las cepas del género *Cordyceps* infectan larvas, pupas y adultos de una amplia gama de órdenes de insectos (Fig. 3). Se ha reportado que *Cordyceps javanica* cuenta con un amplio rango de hospedadores, infectando insectos de 12 géneros en 3 órdenes tales como *Bemisia tabaci*, *Diaphorina citri*, *Empoasca pirusuga*, *Lymantria dispar* y *Spodoptera litura* (Wang *et al.*, 2022; Xing *et al.*, 2022; Ramírez *et al.*, 2018). Bajo condiciones favorables, *Cordyceps spp.* puede causar una reducción significativa en las poblaciones de plagas de insectos (Huang *et al.*, 2010), otra ventaja es su bajo costo de producción y seguridad para los seres humanos y otros organismos (Ali *et al.*, 2017). En México, en el periodo del 2009-2014 se aplicó la cepa de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 para el control del pulgón de café de los cítricos en 11, 782 ha, también del 2012-2018 las cepas de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y CHE-CNRCB 307 a través de campañas fitosanitarias se aplicaron en más de 66,000 ha por el gobierno mexicano (Dirección General de Sanidad Vegetal, s.f., p. 8; Ordaz-Hernández *et al.*, 2024).

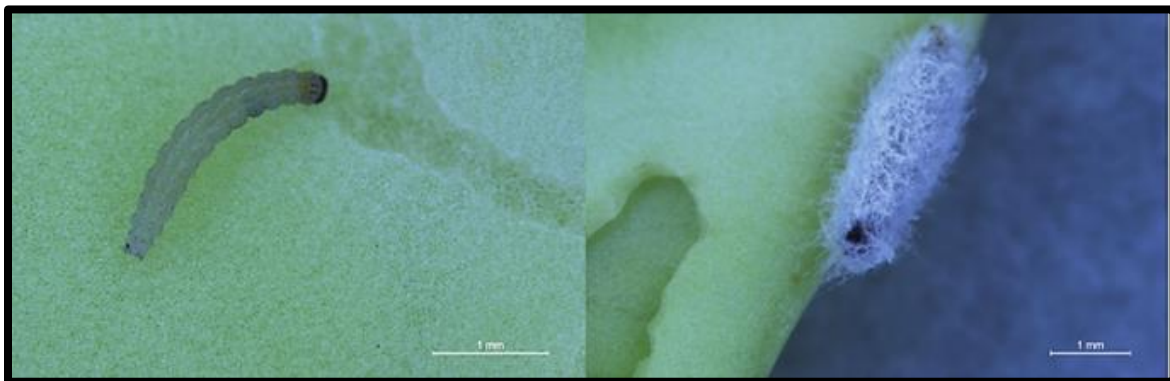


Figura 3. *Plutella xylostella* sana e infectada por *Cordyceps javanica*, respectivamente [escala 1mm]. (Xing *et al.*, 2022)

1.3.2 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo que posee una capacidad dual biológica, ya que actúa como endófito y como entomopatógeno; es capaz de producir distintas enzimas en cantidades significativas como las

quitinasas, proteasas, lipasas, amilasas, lacasas, etc, con propiedades bioquímicas variadas. Como entomopatógeno, diferentes cepas de *B. bassiana* durante su ciclo de vida se adaptan a sus huéspedes invertebrados; mientras que, como endófitos sostienen una relación simbiótica con sus huéspedes vegetales. *B. bassiana* es mayormente conocido por su uso para el control biológico de plagas de insectos como garrapatas, moscas blancas, psílidos de los cítricos, gorgojos rojos de las palmas y huéspedes nematodos a nivel mundial (Fig. 4) (Amobonye *et al.*, 2020 y 2021; Gutiérrez *et al.*, 2024).

Una de las características que distingue a *B. bassiana* es su relativa seguridad para los humanos, animales y el medio ambiente, pero sobre todo su eficacia como agente de control biológico, aunque depende de distintos aspectos como la producción de conidios, su tolerancia a distintos tipos de estrés, y la patogenicidad contra los hospedadores, abarca todas las etapas de desarrollo de plagas (larvianas y adultas). Parte de sus mecanismos de acción implica competir con patógenos por nutrientes y espacio, alterando al mismo tiempo sus condiciones de crecimiento, aunado a que no representa una amenaza para las especies no objetivo, todo esto sin dejar residuos dañinos en el suelo, agua o cultivos (Cai *et al.*, 2024; Zampiroli *et al.*, 2019; Gutiérrez *et al.*, 2024).

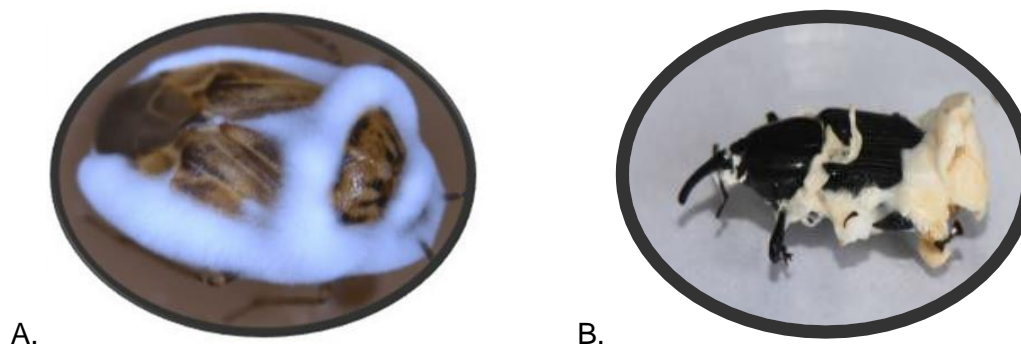


Figura 4. A. *Lygus lineolaris* infectado por *Beauveria bassiana* (George *et al.*, 2024); B. *Odoiporus longicollis* infectado por *Beauveria bassiana*. (Viswakethu *et al.*, 2022)

1.4 Plaguicidas en México

En México, la producción de plaguicidas es una actividad relevante, De acuerdo con el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INEEC) en su registro en el 2018, más de 230 empresas reportaron la producción de más de 2,070 principios activos. Estos datos resaltan la importancia de esta actividad a nivel nacional. A pesar de la participación de México en convenios internacionales como el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2019), el Convenio de Rotterdam (2010), el Convenio de Estocolmo (SEMARNAT, 2017) y el Protocolo de Montreal (PNUMA, 2016) que regulan el uso de plaguicidas, se han encontrado productos tóxicos documentados por organismos internacionales en registros sanitarios con vigencia indefinida, a pesar de ser reportados por su daño ambiental. Adicionalmente, se han aprobado

más de 180 ingredientes activos en plaguicidas, de los cuales 140 están prohibidos o no aprobados en otros países y 65 son altamente peligrosos (Moo-Muñoz *et al.*, 2020).

No obstante, a pesar de los compromisos internacionales, México presenta un alto consumo de plaguicidas. En 2020 la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) registró un total de 41,681.11 toneladas de plaguicidas para uso agrícola en ese año (FAOSTAT., 03/04/2023). En el periodo del 2010-2019, el INECC informó el análisis de 36 sustancias que tuvieron movimientos registrados durante ese período, de las cuales sus importaciones finales ascendieron a \$15,901.63 millones USD, mientras que las exportaciones finales en el mismo período ascendieron a \$796.81 millones USD, resaltando la importancia económica y dependencia a estos productos químicos.

Estos datos destacan la necesidad de explorar alternativas más sostenibles y amigables con el medio ambiente. Alternativas como el uso de agentes de control biológico, como bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos son ejemplo de ello. Esto se puede notar en un producto comercial a base de *B. bassiana*, en una presentación de 450 gramos tienen un valor aproximado de \$2,600.00 MXN, y puede aplicarse en más de dos hectáreas (BotaniGard 22WP Biological Insecticide, 28/03/2023). Comparado con un producto químico, tiene un costo aproximado de \$275.00 MXN por litro, cubriendo únicamente media hectárea (AgroGenial Faena Clásica, 28/03/2023). Por esta razón, los bioplaguicidas no solo se presentan como una alternativa amigable con el medio ambiente, sino también como una solución más económica.

1.5 Producción de Conidios

La producción de conidios en masa comúnmente se realiza por procesos de fermentación en estado sólido (FES), utilizando granos de cereales esterilizados como sustrato con un rango de humedad entre el 40-70% para su crecimiento (Mascarin & Jaronski., 2016; Rashid *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2010; Maurya *et al.*, 2012). Algunos factores que tienen una influencia importante en la producción de conidios son: transferencia de calor, tamaño y tipo de partícula del sustrato, actividad de agua, pH, temperatura, la exposición a la luz. Además, en los reactores puede acumularse CO₂ como producto del metabolismo del hongo, lo que podría inhibir el crecimiento dependiendo de la naturaleza metabólica del hongo (Garza *et al.*, 2011; Muñiz-Paredes *et al.*, 2017).

La disponibilidad de agua influye en la producción de conidios, debido a la relación superficie-volumen o área-volumen de las hifas de los hongos, ya que son susceptibles a la desecación, lo que afecta la germinación de los conidios, el crecimiento de las hifas y la producción de metabolitos (Krishnamurthy *et al.*, 2020).

Comúnmente, se utiliza el grano de arroz como sustrato sólido para la producción masiva de HE debido a que mantiene condiciones físicas adecuadas (humedad, el tamaño de partícula, aireación, temperatura), una superficie efectiva para el crecimiento micelial, un balance nutricional adecuado. Además del arroz, otros sustratos utilizados incluyen cebada, avena, frijol, sorgo, trigo, soya, mijo, cacahuate, garbanzo, lenteja, chícharo, caupí (frijol africano) y estiércol de vaca (Rodríguez-Gámez *et al.*, 2017). La reutilización del sustrato es una estrategia importante para reducir los costos de producción y mejorar la sostenibilidad de esta actividad. Se ha estimado que para la producción de conidios se consume entre el 5% y 20% del sustrato como mínimo, es decir, el sustrato aún tiene suficientes nutrientes para su reuso (Cando-Narvaez *et al.*, 2021).

Algunas empresas, han adoptado para su producción a gran escala, el uso de bandejas o bolsas para la producción de conidios. La eficacia del proceso depende de la velocidad de secado para obtener los conidios; en algunos casos se desprenden los conidios del sustrato mediante lavados con líquidos surfactantes, después la suspensión se centrifuga y seca, este factor es importante para una vida útil aceptable, aunque la temperatura, y la humedad relativa al inicio y final del proceso también son parámetros importantes para garantizar su utilización en formulaciones (Mascarin & Jaronski., 2016).

La producción de conidios en bandejas o bolsas no requieren una inversión inicial alta y son accesibles tecnológicamente; sin embargo, presentan variaciones sobre la productividad y calidad de los conidios debido al limitado control de las condiciones del proceso (Méndez-González *et al.*, 2022). De igual manera, el control de la temperatura es un desafío, especialmente en el escalamiento, lo que limita la eficacia de los procesos (Sala *et al.*, 2023).

1.5.1 Factores que influyen la producción de conidios

1.5.1.1 pH

El pH del medio puede influenciar significativamente el crecimiento del hongo y la actividad de las enzimas extracelulares que produzca para poder degradar la cutícula en el proceso de infección, pero también en su esporulación. En un cultivo sólido donde la esporulación es favorable, el pH se convierte en una variable difícil de controlar de manera uniforme debido a limitaciones técnicas (Zhu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2023).

1.5.1.2 Amilasas

Los HE producen una gran variedad de enzimas que son de utilidad para su acción infectiva sobre el hospedero, o bien para su crecimiento en medios de cultivo (Flórez *et al.*, 2005). Una de ellas son las amilasas, enzimas que catalizan las reacciones hidrolíticas del almidón presente en medios de cultivo o

sustratos ricos en este (Moreno *et al.*, 2011), proporcionando una fuente de carbono esencial que favorece el crecimiento y esporulación del hongo (Amobonye *et al.*, 2020; Fernandes *et al.* 2012).

El almidón está compuesto por una mezcla de amilosa (polímero lineal, interconectado con enlaces glucosídicos α (1 \rightarrow 4)) y amilopectina (misma conformación de la amilosa, pero con ramificaciones a través de enlaces α (1 \rightarrow 6)) en una proporción de ~20–30% a 70–80% respectivamente, ambos son muy poco solubles en agua (Pesek & Silaghi-Dumitrescu., 2024). Esto destaca la importancia de las amilasas, puesto que los HE con mayor capacidad de producción de estas enzimas tendrían una mayor capacidad para utilizar sustratos ricos en almidón, incluso en ciclos de producción en el reúso.

Se dividen en tres grupos (BRENDA Enzyme Database):

- α -amilasas (3.2.1.1): Actúan sobre el almidón, glucógeno, polisacáridos y oligosacáridos al azar en los enlaces del interior del sustrato. El término " α " se refiere a la configuración del anómero inicial del grupo azúcar liberado y no a la configuración del enlace hidrolizado.
- β -amilasas (3.2.1.2): Actúa sobre el almidón, el glucógeno y los polisacáridos y oligosacáridos relacionados, hidrolizando enlaces α -1,4-D-glucosídicos para liberar β -maltosa.
- Glucoamilasas (3.2.1.3): Liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores del sustrato, pueden llegar a hidrolizar rápidamente enlaces 1,6- α -D-glucosídicos cuando el siguiente enlace en la secuencia es 1,4, y algunas hidrolizan enlaces 1,6- y 1,3- α -D-glucosídicos en otros polisacáridos.

Es importante resaltar que aproximadamente el 80% del peso del arroz seco (Arroz crudo - Calorías y valores nutricionales., 2023) está compuesto por una alta proporción de carbohidratos. En el caso de la avena, cerca del 65% de su peso seco (FatSecret, 16/06/2023) también contiene una considerable cantidad de carbohidratos. Ambos granos se clasifican como alimentos almidonados debido a que contienen más del 60% de almidón en su composición (Composición Química de los Cereales.,16/06/2023).

1.6 Conservación de Cepas

Muchos países e instituciones han fomentado el establecimiento de colecciones de cultivos, ya sea con fines educativos, de investigación o para asegurar su la calidad en diversos procesos industriales, evaluación de materias primas y productos. Para conservar estos cultivos durante largos periodos de tiempo, actualmente se utilizan distintos métodos que aseguran la viabilidad, pureza y estabilidad de estas mismas (Acosta., 2019).

En México el Departamento de Control de Biológico, antes Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB), inició un programa para obtener aislados de HE para su aplicación sobre plagas de importancia agrícola, cumpliendo con los estándares de calidad internacional. Desarrollando técnicas y métodos de conservación que permitan la preservación permanente de especies o cepas bajo estrictos estándares de pureza, viabilidad y control de la integridad genómica, así como el monitoreo de los posibles cambios morfológicos de los hongos durante su almacenamiento, con el fin de evitar poner en riesgo el éxito del control biológico de plagas en la agricultura. (Montesinos-Matías *et al.*, 2015).

Algunos métodos de conservación se describen a continuación (Montesinos-Matías *et al.*, 2015):

- Agua Estéril: Consiste en mantener cultivos los cultivos sumergidos en agua estéril durante largos periodos, hasta 18 meses. Este método de es una opción económica, sencilla y segura para preservar la viabilidad de hongos que no toleran la liofilización o ultracongelación.
- Aceite Mineral: Los cultivos fúngicos se recubren con aceite mineral para evitar la evaporación y mantener la viabilidad durante más de 25 años a 4 °C. Es adecuado para hongos que no toleran la liofilización, tienen baja esporulación o cuando la ultracongelación no es una opción.
- Gel de Sílice: Es utilizado para hongos que tienen un bajo contenido de humedad y pueden sobrevivir períodos de desecación, reactivándose cuando se restablecen las condiciones de humedad. permite la conservación de las cepas durante más de 10 años.
- Liofilización: Consiste en la deshidratación por congelación a temperaturas de -50 °C. Es uno de los métodos más efectivos actualmente, para la conservación del germoplasma fúngico, conservando las propiedades de los conidios en estado latente durante largos períodos tiempo. Sin embargo, no todos los hongos sobreviven a este proceso de liofilización, y es un método costoso que requiere infraestructura y equipo especializado.

1.7 Zimogramas

La zimografía es una técnica electroforética mediante la cual la actividad enzimática puede visualizarse directamente en un gel de poliacrilamida nativo como bandas discretas (Upadhyay *et al.*, 2006). La detección zimográfica de la actividad de amilasa mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) con almidón, se usa ampliamente en fermentaciones fúngicas. Solo las amilasas capaces de renaturalizarse son detectables en este zimograma. Además, la separación electroforética de proteínas nativas (enzimas) en función de su carga y su diferencia de tamaño se utiliza para separar las diferentes enzimas presentes en una muestra. La principal ventaja es que las enzimas

se conservan en su conformación original, por lo que la actividad enzimática se puede detectar directamente después de la separación electroforética (Dojnov & Vujčić., 2012).

Para la visualización de la actividad de amilasas, un paso fundamental es la interacción del almidón no hidrolizado por estas enzimas con una solución de Lugol. El complejo almidón-yodo produce una coloración característica azul intensa, que depende de la longitud de cadenas de glucosa y el tipo de enlace glucosídico. El almidón está conformado por mezcla de amilosa y amilopectina, la amilosa puede adoptar distintas conformaciones, una de ellas es la forma V, que posee una cavidad interna para alojar moléculas hidrófobas como el yodo provocando esta coloración azul. Por otro lado, la amilopectina, debido a sus ramificaciones, forma complejos menos estables con una coloración que puede variar desde el rojo al violeta (Pesek & Silaghi-Dumitrescu., 2024).

2. ANTECEDENTES

El Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSAA) de México, en el 2019, determinó que alrededor del 35% de la producción alimentaria en el país se pierde o desperdicia, dentro de ellos está el maíz (31.23%), el arroz (37.20%) y el frijol (27.13%). Estas pérdidas pueden ser ocasionadas por distintos factores (plagas, enfermedades de cultivos, condiciones climáticas, prácticas agrícolas ineficientes). A causa de estos factores, presentaron un programa para la aplicación de una bioeconomía agrícola, siendo que impulse un desarrollo sostenible, mediante el aprovechamiento y transformación de productos, para obtener servicios con valor agregado, dirigido por conocimientos en la ciencia, y tecnologías de innovación (De Agricultura Y Desarrollo Rural., 2024).

En este contexto, la reutilización de sustratos se presenta como una estrategia viable para mitigar estas pérdidas y fomentar una producción más sostenible de conidios de hongos entomopatógenos. Con todo y lo anterior, se han evaluado alternativas como es el caso de Barra-Bucarei *et al.* (2016), evaluaron la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en arroz precocido nuevo (NPR) y reutilizado (RPR) como sustratos. El RPR se reutilizó después de la recuperación en seco de conidios, se lavó, secó y reinoculó. En el estudio observaron un ligero aumento en la producción de conidios con el arroz reciclado (2.67×10^9 con/g) en comparación con el arroz nuevo (2.41×10^9 con/g), destacando que la reutilización del sustrato puede ser una alternativa viable para reducir costos en la producción industrial de hongos entomopatógenos.

Por su parte, Da Cunha *et al.* (2020), examinaron el escalado y la reducción de costos en la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425. Utilizando como sustrato arroz y una mezcla de arroz-bagazo de caña de azúcar en una proporción de 9:1 (p/p), en un biorreactor de lecho empacado angosto (NBR). Con el uso único de cada sustrato obtuvieron $1.95 \times 10^9 \pm 2.4 \times 10^7$ con/gss (arroz) y $3.47 \times 10^9 \pm 2.5 \times 10^7$ con/gss (arroz-bagazo). Al realizar ciclos sucesivos se demostró que la reutilización del sustrato, en este caso la mezcla de arroz con bagazo de caña (9:1), era viable hasta en tres ciclos adicionales. Tras cada ciclo, el sustrato fue secado a 50 °C por 24 horas y reinoculó antes de ser colocado nuevamente en el biorreactor. Al final de los tres ciclos, se obtuvo una producción total de 1.05×10^{10} con/gss, aumento significativamente mayor en comparación con un el uso único del sustrato.

Ahora bien, Cando-Narvaez *et al.* (2021), llevaron a cabo tres ciclos de producción de conidios de *Trichoderma asperellum* Th-T4 y *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 utilizando el mismo sustrato (10g de arroz), midiendo la producción de conidios; esto sin ser sometido a distintos procesos de tratamiento previo en cada ciclo (lavado, secado o una reinoculación). Se encontró que la producción de conidios aumento

significativamente en el segundo ciclo en ambos hongos, mientras que a partir del tercero hubo una disminución debido a un exceso de humedad en el sustrato residual. En total, se produjeron casi cinco veces más conidios que en un proceso convencional de un solo ciclo (Tabla 1 y 2), esto demostró que el arroz puede reutilizarse de manera efectiva sin tratamientos adicionales.

Tabla 1. Conidios por gramo de sustrato seco de arroz de *Trichoderma asperellum* Th-T4 (3) (Cando-Narvaez et al., 2021)

<i>Trichoderma asperellum</i> Th-T4 (3)		
Conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi)		
Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3
$1.0 \times 10^9 \pm 2.1 \times 10^8$	$2.9 \times 10^9 \pm 4.4 \times 10^8$	$9.9 \times 10^8 \pm 1.7 \times 10^8$

Tabla 2. Producción de conidios de *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1 registrados por gramo de sustrato seco (Cando-Narvaez et al., 2021)

<i>Metarhizium robertsii</i> Xoch-8.1			
Conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi)			
Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
$5.7 \times 10^8 \pm 6.7 \times 10^7$	$1.4 \times 10^9 \pm 3.0 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^8$	$6.0 \times 10^8 \pm 6.2 \times 10^7$

Finalmente, en el trabajo de García Valdés. (2023) reutilizó el arroz en bolsas con 50 g para los hongos *M. robertsii* Xoch-8.1 y *T. asperellum* Th-T4 (3), logrando 4 y 2 ciclos sucesivos respectivamente, esto sin la adición de tratamientos o reinoculación en el sustrato. El estudio mostró una disminución significativa en la producción de conidios en los ciclos tres y cuatro, particularmente para *M. robertsii*, lo que sugiere que la capacidad de reutilización del sustrato disminuye con el tiempo, aunque aún se presenta viable en los primeros ciclos. En ambos casos la pérdida de sustrato al final de los ciclos fue cercana el 50%. Logrando una producción acumulada de 6.54×10^9 con/gssi para *M. robertsii* Xoch-8.1 y de 7.41×10^9 con/gssi para *T. asperellum* Th-T4 (3).

3. JUSTIFICACIÓN

Se tiene estimado que para el 2050 el aumento en la población alcanzará los 9 mil millones de habitantes, por consiguiente, la demanda en los alimentos podrá llegar a tener un incremento entre un 70-100 %. Durante esta creciente demanda se puede llegar a ver afectada la producción agrícola debido a las afectaciones por insectos plaga o enfermedades, que actualmente son controladas mediante el uso de productos químicos, los cuales en exceso ocasionan la resistencia de las mismas plagas a largo plazo, generan graves problemas ambientales e incluso en la salud humana.

Ahora bien, el control biológico se presenta como una alternativa sostenible ayudando a reducir la dependencia a productos químicos en la producción agrícola. El uso de HE forma parte de las actividades dentro del control biológico de plagas, siendo patógenos naturales de insectos y artrópodos, utilizados con éxito para controlar diversas plagas en cultivos de frutas y verduras en distintas regiones alrededor del mundo. En México su aplicación y producción aún requiere de una mayor colaboración entre centros de investigación, instituciones educativas y el sector industrial.

Una de las tecnologías que se utilizan para obtener compuestos valiosos; en este caso los conidios de HE, es la fermentación en estado sólido (FES), siendo esta estrategia idónea debido a sus características económicas y sostenibles. La FES permite mantener un ambiente controlado y rico en nutrientes que favorece el crecimiento y conidiación de los hongos, aprovechando sustratos tales como residuos orgánicos ayudando a reducir costos en la producción.

En este trabajo se propone utilizar un sustrato como el arroz, avena y una mezcla de ambos (50:50) para mejorar la producción de conidios que mantengan parámetros de calidad aceptables, es decir, que los conidios obtenidos a lo largo de ciclos de reuso sean viables y capaces de infectar. Durante la FES las amilasas producidas son cruciales para la hidrólisis del almidón presente en sustratos como el arroz y la avena, liberando azúcares reductores como la glucosa que favorece el crecimiento microbiano y la esporulación de HE.

El uso de estos sustratos muestra potencial, ya que son accesibles y posiblemente puedan ser reutilizables, lo que minimiza la necesidad de adquirir nuevos insumos, disminuyendo gastos asociados. Además, esta técnica tendría un impacto positivo en el medio ambiente, al disminuir la generación de residuos y el continuo uso de nuevos sustratos en cada producción.

4. HIPÓTESIS

La producción continua de lotes de conidios de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 y *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 durante la reutilización del sustrato (arroz-avena), se limita debido a los cambios en el perfil de amilasas, pH y humedad del sustrato, restringiendo así el número de ciclos de producción de conidios y afectando su calidad.

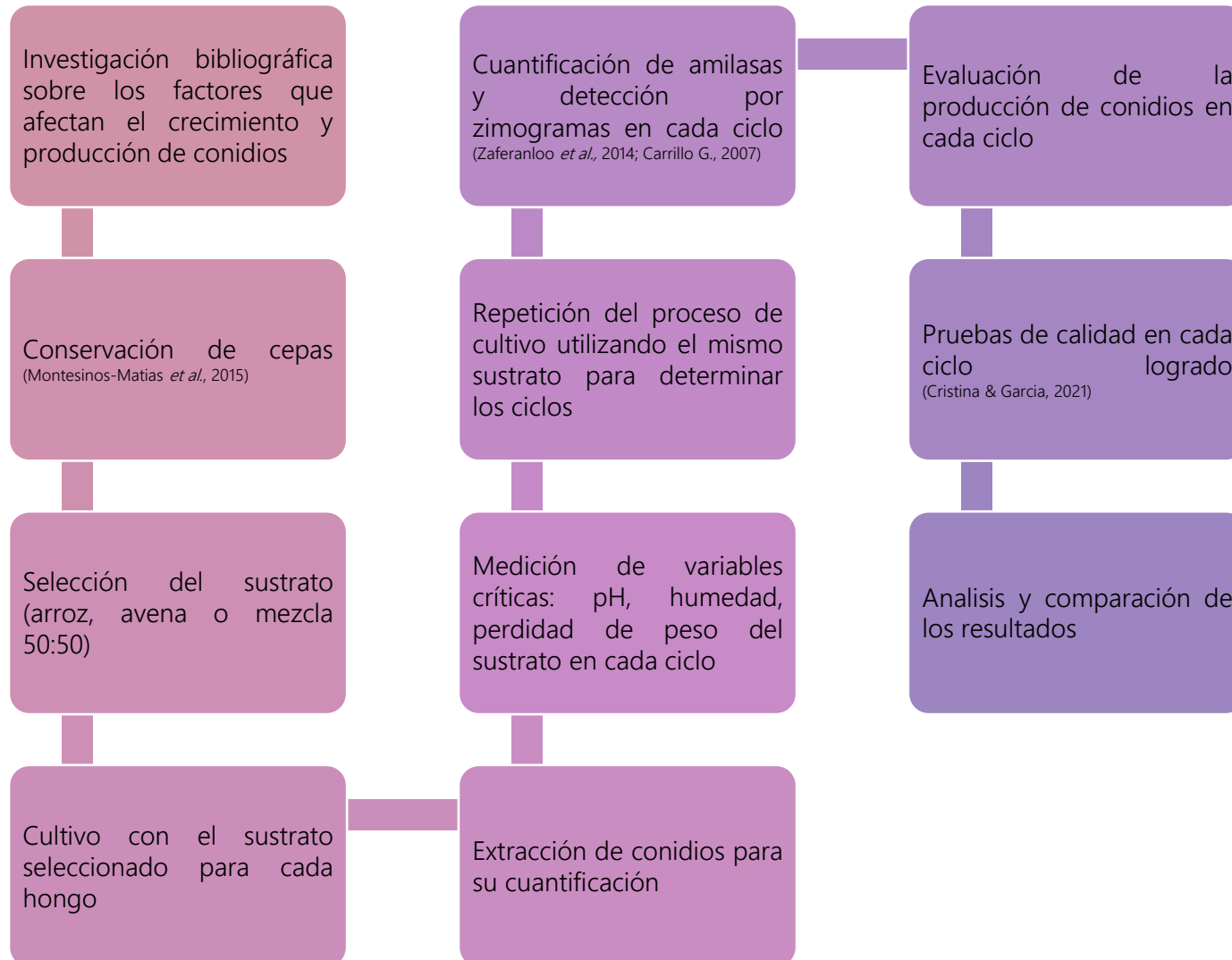
5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el número de ciclos de reúso de sustrato para obtener conidios de *Beauveria bassiana* y *Cordyceps javanica* con niveles de producción constantes y calidad aceptable.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conservar las cepas con agua destilada estéril (mediano plazo).
- Comparar y seleccionar el mejor sustrato (arroz o avena) para producir conidios en procesos de FES.
- Determinar el número de ciclos que mantengan los niveles de producción y calidad de los conidios.
- Comparar los cambios en el perfil de amilasas para relacionar los niveles de producción en los ciclos logrados.
- Identificar las variables susceptibles de modificarse para mantener la producción de conidios con calidad aceptable al final de los ciclos establecidos.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



(Cando-Narvaez et al., 2021; Méndez-González et al., 2020; Ye et al., 2006; Barra-Bucarei et al., 2016; Rodríguez-Gámez et al., 2017)

8. MATERIALES Y METODOLOGÍA

8.1 Microorganismo

Se trabajó con las cepas *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 (Fig. 5.A) y *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (Fig. 5.B), provenientes de la colección de HE del Departamento de Control Biológico, antes Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, del SENASICA-SADER en Tecomán, Colima. La cepa del hongo *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 se propagó en cajas de Petri sobre medio SDAYS, el cual contiene en g/L: Agar Dextrosa Sabouraud (10), polipeptona (1), extracto de levadura (1), cutícula de chapulín (SPHEQUIT®) (1) y Agar Bacteriológico (15) (Montesinos-Matías *et al.*, 2015); en el caso de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 se propagó únicamente en medio SDA (Agar Dextrosa Sabouraud). Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C con un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad (12L/12D).

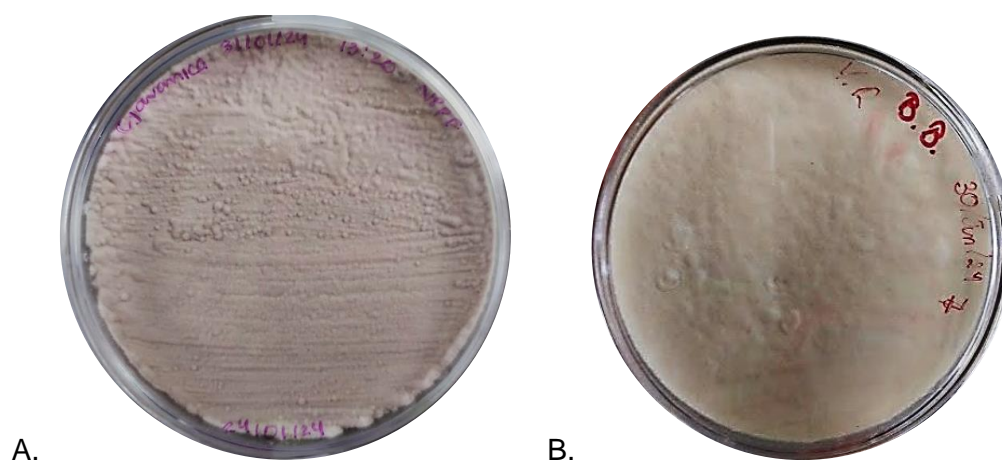


Figura 5. A. *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 en medio SDAYS; B. *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 en medio SDA.

8.2 Conservación de cepas

Como método de conservación de los HE, se realizó en agua destilada estéril que implica el cultivo de hongos maduros (10 días) en cajas de Petri, con una espátula metálica se cortaron de 4 a 5 cuadros (1 cm²) del agar con conidios y se colocaron en los viales con 5 mL de agua destilada estéril, se etiquetaron y almacenaron en refrigeración (Fig. 6) (Montesinos-Matías *et al.*, 2015).

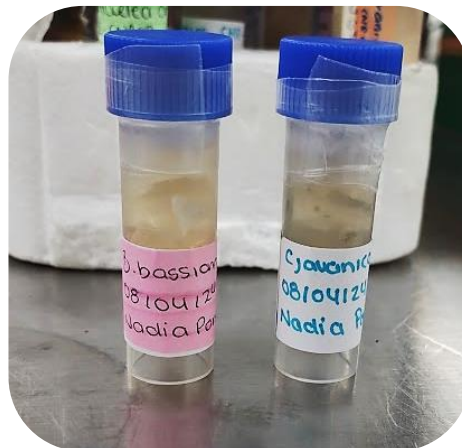


Figura 6. Método de conservación en agua estéril (viales)

8.3 Sustrato

Para seleccionar el sustrato que proporcione la mayor producción de conidios, tanto para *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 como *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303, se realizaron tres experimentos con diferentes mezclas de sustratos: arroz (100 %, verde valle-impermeable), avena (100 %, granvita-integral) y avena-arroz (50:50), cada uno con un mínimo de tres réplicas. Se estableció un testigo negativo con cada tipo de sustrato sin inocular, que permaneció libre de contaminación durante los cultivos, si se presentaba contaminación en estos testigos, se iniciaba un nuevo cultivo.

Para cada réplica se colocaron 50 g de sustrato en una bolsa de polipapel con medidas de 25 cm x 18.5 cm (unidad experimental), se esterilizaron en la autoclave en condiciones estándar por 20 min y se ajustó la humedad inicial en un promedio máximo del 25 %. Cada bolsa se inoculó con 1 mL de una suspensión con 1×10^8 conidios por mililitro (con/mL), equivalente a 2×10^6 conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi). La concentración de conidios en la suspensión se determinó mediante un conteo con una cámara de Neubauer y los valores de inóculo fueron seleccionados con base en reportes anteriores (Cando-Narvaez *et al.*, 2022; Méndez-González *et al.*, 2020).

8.4 Humedad

Para ajustar la humedad inicial en las unidades experimentales de cada sustrato sin ningún tipo de lavado previo, se llevó a cabo una evaluación para determinar la cantidad de agua destilada necesaria para los 50 g de sustrato contenido en las bolsas. Se tomó una muestra de aproximadamente 1 g del sustrato antes de la esterilización y se colocó en una charola de aluminio en una termobalanza (MA 35 Sartorius®) durante 15 minutos a 130 °C para registrar la humedad del sustrato.

Posteriormente, las bolsas se esterilizaron en la autoclave durante 20 minutos sin agregar agua.

Después de esterilizar, se tomó otra muestra de 1 g y se colocó nuevamente en la termobalanza a 130 °C durante 15 minutos para registrar la humedad del sustrato ya esterilizado. Utilizando la ecuación 1, se calculó la cantidad de agua requerida para que cada sustrato alcanzara aproximadamente un 25 % de humedad máxima, después de la esterilización. Cada registro de humedad se realizó por triplicado (López Cruceño., 2016; Paiva- Guimarães *et al.*, 2020).

Ecuación 1:

$$A = \frac{B * (C - D)}{100 - C}$$

A = Cantidad de agua requerida

B = Cantidad del sustrato (g)

C = Humedad del sustrato después de la esterilización (% humedad que se busca)

D = Humedad del sustrato previo a la esterilización

8.5 Medición de Variables

Después de siete, diez y catorce días de incubación a una temperatura de 29 ± 2 °C, de las bolsas en cada sustrato se realizaron cosechas, para esto se adicionó 120 mL de Tween 80 al 0.05% a un matraz con un agitador magnético para obtener una suspensión con los conidios (Fig. 7). Posteriormente, se transfirió la suspensión a un tubo Falcon con ayuda de una espátula, evitando que el sustrato llegara a este (Cando-Narvaez *et al.*, 2022; Rodríguez-Gámez *et al.*, 2017; García Valdés 2023).

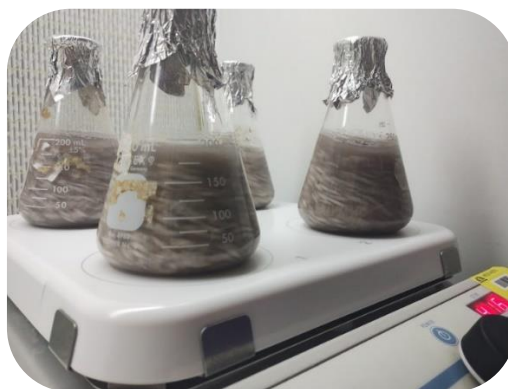


Figura 7. Método de extracción de conidios

8.5.1 Producción de conidios

El conteo de conidios se llevó a cabo utilizando una cámara de Neubauer en un microscopio óptico a 40x (VE-T2, Microscopio Triocular VELAB). Para diferenciar entre los conidios y los restos del sustrato, se agregaron 15 μ L de solución de Lugol en 1 mL de la suspensión de conidios extraída con Tween 80 al 0.05% (Fig. 8). Los resultados obtenidos se reportaron en conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi).

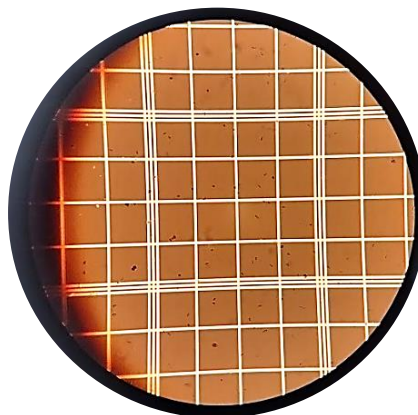


Figura 8. Visualización de conidios con cámara de Neubauer a 40 x

8.5.2 pH

En el día cero (día de la inoculación), se tomó 1 g del sustrato en condiciones asépticas y se colocó en 5 mL de Tween 80 al 0.05%. La mezcla fue agitada en un vórtex durante 2 minutos, posteriormente se midió el pH de la suspensión utilizando un potenciómetro (Oakton PC-700). En los días posteriores de cada cosecha, la suspensión de conidios extraída de las bolsas se transfirió a un tubo Falcon y se midió utilizando el potenciómetro. Todas estas medidas se realizaron por triplicado para cada sustrato.

8.5.3 Humedad

Se tomó una muestra de 1 g del sustrato antes de la extracción, se colocó en una charola de aluminio previamente pesada en una termobalanza (MA 35 Sartorius®) por 15 minutos a 130 °C. El análisis se realizó por triplicado para cada sustrato (López Cruceño., 2016).

8.5.4 Amilasas

La cuantificación de las amilasas totales se realizó mediante la medición de los azúcares reductores liberados como resultado de la hidrólisis del almidón soluble por la acción de estas enzimas. Se utilizó 100 μ L de una solución de almidón soluble 1% (p/v) (Starch from rice, Sigma S7260-500G), 50 μ L de CaCl₂ 5 mM, 250 μ L de amortiguador de acetato de sodio 50 mM a un pH de 5.5 y 150 μ L de extracto crudo enzimático. La reacción se llevó a cabo a 37 °C durante 7.5 minutos. Posteriormente, se detuvo

añadiendo 750 μL de DNS (ácido 5-dinitrosalicílico) y se incubó en un baño de agua durante 5 minutos, después de lo cual se transfirió a un recipiente con agua fría para alcanzar la temperatura ambiente en el contenido de los tubos. La absorbancia se midió a 640 nm (Espectrofotómetro, Thermo Fisher Scientific G10S UV-VIS) utilizando una curva patrón de una solución de glucosa (Fig. 9) (Carrillo, 2017; Moreno *et al.*, 2011).

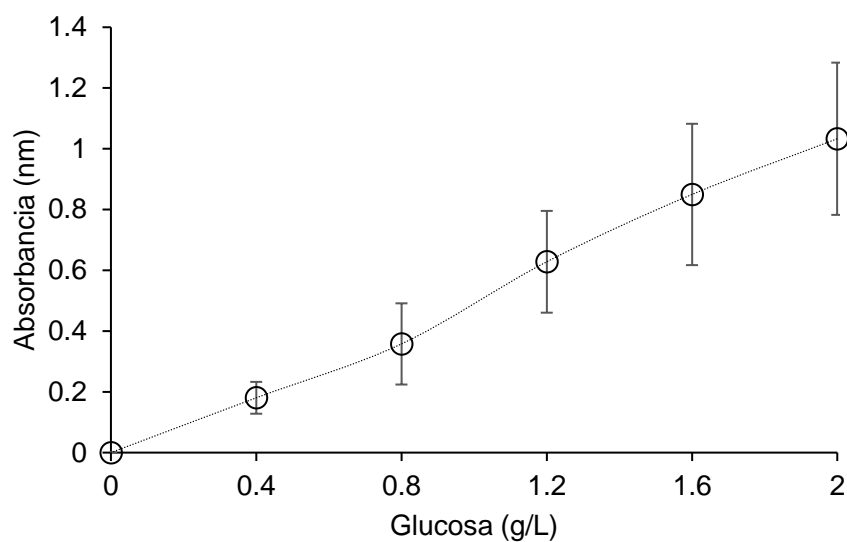


Figura 9. Curva estándar con glucosa para el método de azúcares reductores.

A partir de los resultados obtenidos se compararon los niveles de producción de los conidios en cada sustrato, con objeto de determinar aquel que proporciona fuera significativamente mayor para cada hongo (*B. bassiana* y *C. javanica*). En el caso de que dos tratamientos no presenten alguna diferencia significativa en la producción, se elegiría el sustrato donde la calidad de los conidios fuese mejor (germinación).

8.6 Cultivos sólidos sucesivos sobre el sustrato seleccionado

Una vez seleccionado el sustrato a utilizar para *B. bassiana* y *C. javanica*, se elaboró un diseño experimental para determinar los ciclos de reúso que permitieran una producción de conidios eficiente, al finalizar cada ciclo se evaluaron las distintas variables tales como el pH (potenciómetro digital), humedad antes y después de la extracción del ciclo en curso, la actividad de amilasas (azúcares reductores), la visualización de las amilasas presentes (zimogramas), la cantidad de sustrato que se pierde en peso a largo de cada ciclo (secado), y para el control de calidad de los conidios se realizaron pruebas de germinación y viabilidad; además de la cuantificación en la producción de conidios en cada ciclo logrado.

8.6.1 Inoculación de las unidades experimentales

De igual modo que para la selección del sustrato, las unidades experimentales que se utilizaron contenían 50 g de sustrato. Se esterilizaron a 15 psi por 20 min en autoclave, posteriormente se inoculó con 1 mL de una suspensión de 1×10^8 con/mL, equivalente a 2×10^6 con/gssi, agregando 15 mL de agua destilada estéril para alcanzar una humedad inicial máxima de 25% en cada bolsa, se incubaron a 29 ± 2 °C. También se establecieron testigos negativos sin inocular para verificar que los cultivos estuvieran libres de contaminación.

Transcurridos 10 días se realizó la extracción de conidios (1er ciclo), se colocó el sustrato ya conidiado en un matraz de 250 mL con 120 mL de Tween 80 al 0.05 % (v/v) en agitación por 5 min. Se decantó y dejó escurrir en una coladera metálica por unos 3 min para eliminar la mayor cantidad de Tween 80 del sustrato, todo en condiciones de asépticas. El filtrado se colocó en un tubo Falcon de 50 mL para medir las variables antes mencionadas (producción, pH al momento de la extracción, humedad al inicio y fin de cada ciclo, perfil de amilasas).

El sustrato ya escurrido se colocó en una bolsa estéril, volviendo a mezclarlo bien. Se realizaron dos dobleces centrales y se selló la bolsa con cinta testigo, y se incubó en las mismas condiciones (Fig. 10). Este proceso se repitió hasta que en el sustrato o en la producción de los conidios no se observarían cambios significativos, deteniendo los ciclos sucesivos. En cada extracción se realizó la medición de las variables previamente mencionadas.



Figura 10. A. Bolsas con dobleces al inicio de los cultivos; B. Bolsas con dobleces a los 3 días de inoculación

8.7 Zimogramas

Se utilizó un gel de acrilamida-bisacrilamida con almidón en presencia de SDS de acuerdo con la metodología de Laemmli (1970) realizando algunas modificaciones (SDS-PAGE-almidón). La actividad en el gel se revela utilizando una solución de yodo Lugol (Sigma-Aldrich, 62650-100ML-F), donde las bandas de amilasa se visualizan como zonas blancas-transparentes contra un fondo azul oscuro de almidón teñido, esto es, sin hidrolizar. Como control positivo para el zimograma se utilizó una amilasa comercial α -Amylase (Sigma-Aldrich, *Aspergillus oryzae*) (Carrillo., 2017). El gel de

resolución fue del 10% y el de separación del 4% la composición de cada uno se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 3. Preparación gel-para zimograma (SDS-PAGE-almidón)

Gel Resolución (10%)		Gel Separación (4%)	
Tris-HCl, 1.5 M, ph 8.8	2.5 mL	Tris-HCl, 0.5 M, pH 6.8	1.25 mL
Solución 30% Acrylamide/Bis	3.3 mL	Solución 30% Acrylamide/Bis	0.65 mL
Agua destilada	2.95 mL	Agua destilada	3.05 mL
Almidón 2% p/v*	1.25 mL	SDS 10% p/v	50 µL
SDS 10% p/v	100 µL	TEMED	5 µL
TEMED	5 µL	APS 10% p/v	25 µL
APS 10% p/v	50 µL		

(Carrillo., 2017)

*Almidón 2% p/v (Starch from rice, Sigma S7260-500G) debe solubilizarse en ebullición y con agitación

El amortiguador de la muestra contenía: Tris-HCl 0.5M, SDS al 10% p/v, Glicerol, Azul de bromofenol 0.5% v/v y agua, se mezclaron 10 µL del amortiguador con 15 µL del extracto crudo enzimático, el cual se obtuvo mediante un tubo concentrador de centrifuga (SPIN-X UF, 20 mL Concentrador, 10K Tapa, CORNING) (Andrades *et al.*, 2017).

La electroforesis se llevó a cabo en las siguientes condiciones; a baja temperatura (4°C), para evitar la hidrólisis del almidón, con un voltaje de 100 v – 120 v, 0.2 A (Bio-Rad, Mini-PROTEAN Tetra Cell), hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel aproximadamente en 1 h 45 min. Después de la electroforesis los geles se colocaron en un amortiguador de lavado (Tritón x-100, 1% v/v) durante 15 min, se lavaron al menos 5 veces con agua destilada y se incubaron en un buffer de revelado (Tris-HCl 50 mM, pH 7, CaCl₂ 1mM) a 37 °C por 3 h con ligera agitación. Finalmente, los geles se tiñeron con solución de Lugol (1 mL de solución de yodo de Lugol en 50 mL de agua) durante 10 min, se enjuagaron, se escaneó para su documentación, se colocaron en agua destilada para eliminar el Lugol completamente y se realizó una tinción con plata (Tabla 4) escaneándose para su documentación final (Andrades *et al.*, 2017, Moreno *et al.*, 2011; Upadhyay *et al.*, 2006, Bio-Rad. 2023).

Tabla 4. Componentes y proceso para la Tinción de plata

Tinción de Plata			
Paso	Solución	Componentes	Tiempo
Fijación del gel	1	TCA (Ácido Tricloroacético) al 12 %	1 h
	2	Metanol al 5 %	Lavar 3 veces por 20 min

	3	Na ₂ S ₂ O ₃ (Tiosulfato de Sodio), 2 g/L	1 min
Enjuague	4	H ₂ O	Realizar 3 lavados de 20 s
Impregnación y Desarrollo *	5	<ul style="list-style-type: none"> ○ 35 mL H₂O ○ 5 mL Solución de Complejo de Plata ○ 5 mL Solución Moderadora de Reducción ○ 5 mL Reactivo de Revelado de Imagen ○ 50 mL Solución Aceleradora de Revelado (50 g/L) 	15 – 20 min, hasta que las bandas sean visibles
Término de Reacción	6	Ácido Acético al 5 %	15 min
Almacenamiento	7	Metanol al 5 %	-

(Aguilera Carbó., 2009, Bio-Rad. 2023)

* Soluciones y reactivos del Kit Silver Stain Plus (Bio-Rad)

8.8 Germinación

Los conidios producidos y obtenidos en cada ciclo se contabilizaron utilizando una cámara de Neubauer; se realizaron diluciones de la suspensión para obtener una concentración de 1×10^6 con/mL, se agregaron 50 μ L de la suspensión en cajas de Petri con medio agar-agua, se distribuyeron homogéneamente y se incubaron durante 16-18 h a 28 ± 2 °C. Posteriormente a la incubación se cortaron cuadros de aproximadamente 2 cm² del agar y colocaron en un portaobjetos, utilizando un microscopio óptico a 40 x se buscaron conidios germinados, para calcular el porcentaje de germinación, se contaron 100 conidios totales diferenciando entre los germinados y no germinados por triplicado (Fig. 11). Los conidios se consideraron germinados cuando la longitud del tubo germinativo es mayor al doble del diámetro del conidio (Cando-Narvaez *et al.*, 2021, López Cruceño., 2016, Miranda-Hernández *et al.*, 2013).

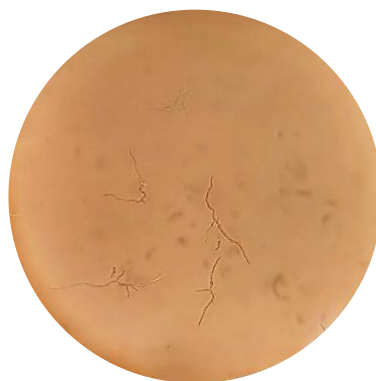


Figura 11. Conidios germinados de *C. javanica* CHE-CNRCB-303 de 18 h de incubación en medio agar-agua

8.9 Viabilidad

Los conidios producidos y obtenidos en cada ciclo se contabilizaron utilizando una cámara de

Neubauer; se realizaron diluciones de la suspensión para obtener una concentración de 1×10^3 con/mL, se agregaron 50 μL de la suspensión equivalente a 50 UFC, se distribuyeron homogéneamente en cajas Petri que contenían medio SDA con desoxicolato de sodio (0.1%), las cajas se sellaron con PARAFILM® e incubaron a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ aproximadamente por 72 h o hasta que se visualicen unidades formadoras de colonias (UFC) para su conteo (Fig. 12), determinando así el porcentaje de viabilidad (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017, Montesinos-Matías *et al.*, 2015).

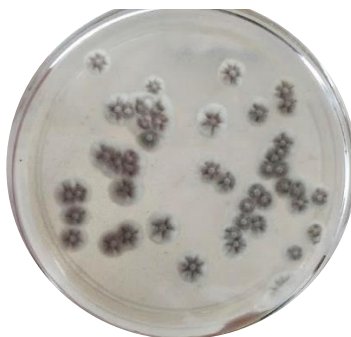


Figura 12. Conidios viables de *C. javanica* CHE-CNRCB-303 de 7 días de incubación en medio SDA c/ desoxicolato de sodio

8.10 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa GraphPad PRISM (versión 7.0) para Windows. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se presentaron con media \pm desviación estándar. Se elaboraron pruebas con análisis de varianza de una y dos vías, prueba Tukey para comparaciones múltiples (selección de sustrato), y correlación de Pearson (producción de cada ciclo, con las distintas variables medidas). En todos los análisis el valor de significancia α fue de 0.05.

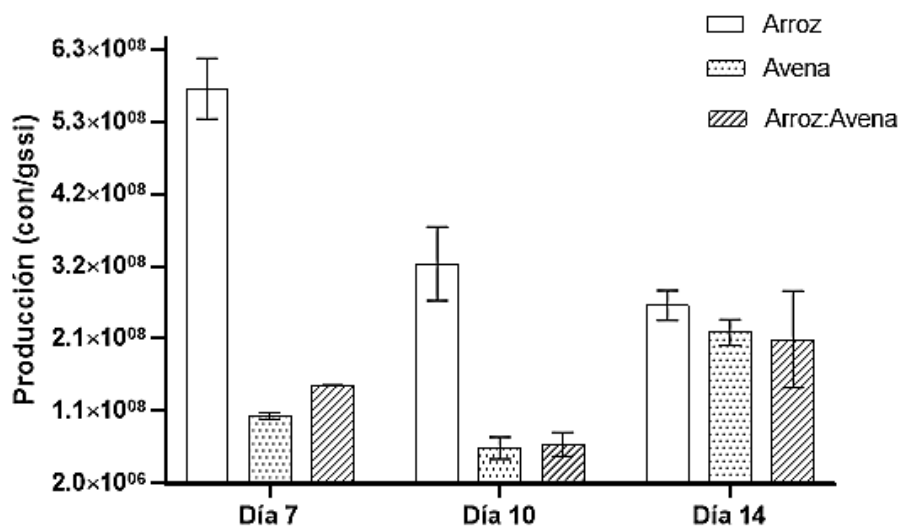
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de medición de variables para la selección del sustrato para *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 y *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431.

9.1 Selección del sustrato para *Cordyceps javanica* CHE- CNRCB- 303

9.1.1 Producción de conidios

El recuento de conidios se realizó a los 7, 10 y 14 días después de la inoculación, se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), seguido de una prueba Tukey ($P < 0.05$). Se observaron diferencias significativas en los niveles de producción de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 al utilizar arroz como sustrato en los días 7 ($5.7 \times 10^8 \pm 4.37 \times 10^7$ con/gssi) y 10 ($3.21 \times 10^8 \pm 5.34 \times 10^7$ con/gssi), obteniéndose valores de producción superiores en comparación con la avena y la mezcla de arroz con avena (50:50) en esos dos días. Para el día 14 la avena y la mezcla arroz: avena alcanzaron su mayor producción $2.21 \times 10^8 \pm 1.83 \times 10^7$ con/gssi y $2.11 \times 10^8 \pm 7.07 \times 10^7$ con/gssi, respectivamente, mientras que el arroz disminuyó a $2.60 \times 10^8 \pm 2.15 \times 10^7$ con/gssi. En este último día no se observaron diferencias significativas entre los tres sustratos (Gráfica 1).



Gráfica 1. Producción de conidios de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 en tres distintos sustratos

En cuanto a la productividad, el análisis mostró un patrón similar a la producción, destacando que el arroz presentó diferencias significativas con valores superiores en los días 7 y 10, en comparación con los otros dos sustratos. Por esta razón, se sugiere que el arroz es un sustrato adecuado para obtener una mayor producción de conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB-303 e iniciar su uso en

experimentos de ciclos sucesivos de cultivo, debido a las diferencias significativas observadas con respecto a la avena y la mezcla de arroz: avena, especialmente en los primeros días.

La Tabla 5 se presenta valores de referencia de estudios sobre la producción de conidios de *C. javanica* en arroz y avena, con los cuales los resultados obtenidos en esta sección son comparables. En el caso de los valores reportados por Kim et al. (2014) con arroz integral enriquecido con CaCO_3 y CaSO_4 son significativamente más altos (3.05×10^{10} conidios/gss) en comparación con nuestro trabajo y con estudios que utilizaron arroz sin aditivos, como el de Xie et al. (2016) y Ordaz-Hernández et al. (2024), cuyos valores fueron de 2.2×10^9 y 1.3×10^8 conidios/gss, respectivamente. Este contraste sugiere que el tipo de arroz, así como la adición de compuestos, puede influenciar en el aumento de la producción. Aunque los resultados obtenidos fueron satisfactorios, hay posibilidades de mejorar la producción de conidios.

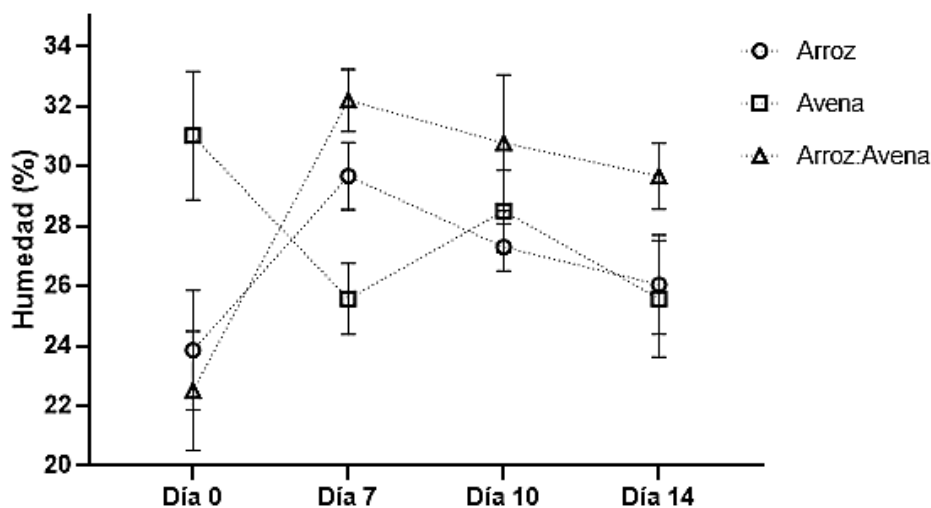
Tabla 5. Producción reportada de conidios de *Cordyceps javanica* por gramo de sustrato seco

<i>Cordyceps javanica</i>		
con / gss	Sustrato	Referencia
2.2 x10 ⁹	Arroz	Xie et al. (2016)
3.05 x10 ¹⁰	Arroz integral*	Kim et al. (2014)
6 x10 ⁸ – 10 x10 ⁸	Avena	Park et al. (2018)
4.5 x10 ⁸ - 7.5 x10 ⁸	Arroz integral	
1.3 x10 ⁸	Arroz	Ordaz- Hernández et al. (2024)

*Adicionaron 2% (p/v) CaCO_3 y 2% (p/v) CaSO_4

9.1.2 Humedad

En la Gráfica 2 se muestran los cambios de humedad a lo largo del estudio. En el caso del arroz, la humedad inicial fue de 23.86 ± 2.00 %, alcanzando un 26.05 ± 1.65 % al día 14. La avena, por su parte, comenzó con un contenido superior al arroz, con un 31.01 ± 2.15 % y finalizó en 25.58 ± 1.95 %. En cuanto a la mezcla de arroz y avena, se inició con un 22.50 ± 1.99 %, incrementándose hasta 29.67 ± 1.10 % al término del período analizado, esto posiblemente se deba a los procesos metabólicos propios del hongo, o las condiciones ambientales en las que se llevó a cabo el experimento.



Gráfica 2. Porcentaje de Humedad de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 en tres distintos sustratos

Mediante un análisis de Tukey ($P < 0.05$), se observó en el día 10 una diferencia significativa entre el arroz y la mezcla de arroz con avena. Sin embargo, en el día 14, solo el arroz y la avena no mostraron diferencias significativas. El almidón en el arroz representa aproximadamente un 90% en materia seca, mientras que en la avena es alrededor del 60%. Esta variación depende de la proporción de amilosa y amilopectina presentes en el sustrato. Diversos estudios han demostrado que esta proporción influye en las propiedades fisicoquímicas y reológicas del almidón. En el caso de la avena, los gránulos de almidón son relativamente pequeños, lo que facilita las interacciones entre el almidón y las enzimas, lo cual puede repercutir en la disponibilidad de agua para la actividad enzimática del hongo (Żołek-Tryznowska & Kałuża, 2021; Zhu et al., 2017; Patindol et al., 2014; Li et al., 2017).

La Tabla 6 presenta los valores iniciales de humedad para diversos sustratos distintos al arroz en la producción de conidios de *C. javanica* y *C. fumosorosea*. La humedad inicial y a lo largo de los ciclos logrados en nuestra experimentación se encuentra por debajo de estos estudios. Por ejemplo, Silva et al., (2018) con una humedad del 65 %, obtuvieron una producción de 2.9×10^9 con/gssi en torta de palmiste, esto fue mayor a la producción en cada uno de los tres sustratos que evaluamos. Sugiriendo, que la elección del sustrato también es un factor obtener una mayor conidiación, inclusive se trabaje con el mismo hongo (género y especie).

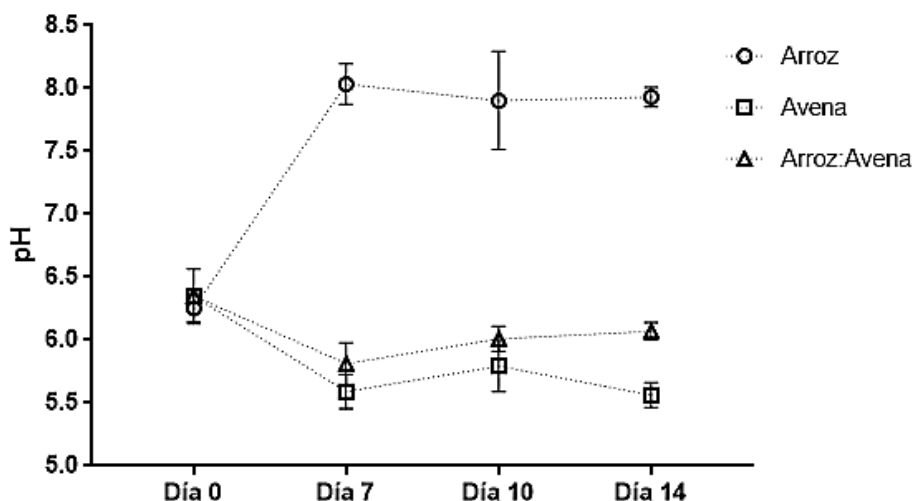
Tabla 6. Valores de Humedad reportados para *Cordyceps javanica* y *Cordyceps fumosorosea*

<i>Cordyceps javanica</i>		
Sustrato	% Humedad	REFERENCIA
Torta de palmiste	65 %	Silva et al. (2018)
Salvado de arroz	60 - 70 %	Awan et al. (2021)

<i>Cordyceps fumosorosea</i>		
Granos de mijo	40 %	Stephan <i>et al.</i> (2020)

9.1.3 pH

El día de inoculación los tres sustratos no presentaron diferencias significativas, conteniendo un pH cercano a 6. El arroz mostró un aumento en los valores de pH, alcanzando 8.03 ± 0.16 (día 7), 7.90 ± 0.39 (día 10) y 7.93 ± 0.08 (día 14), presentando diferencias significativas en comparación con los otros dos sustratos. En contraste, tanto el caso de la avena como la mezcla de arroz: avena mantuvieron un pH relativamente constante en los días 7 y 10, sin diferencias significativas. Para el día 14, la avena finalizó con un pH de 5.6 ± 0.10 , mientras que la mezcla alcanzó un pH de 6.1 ± 0.07 (Gráfica 3).



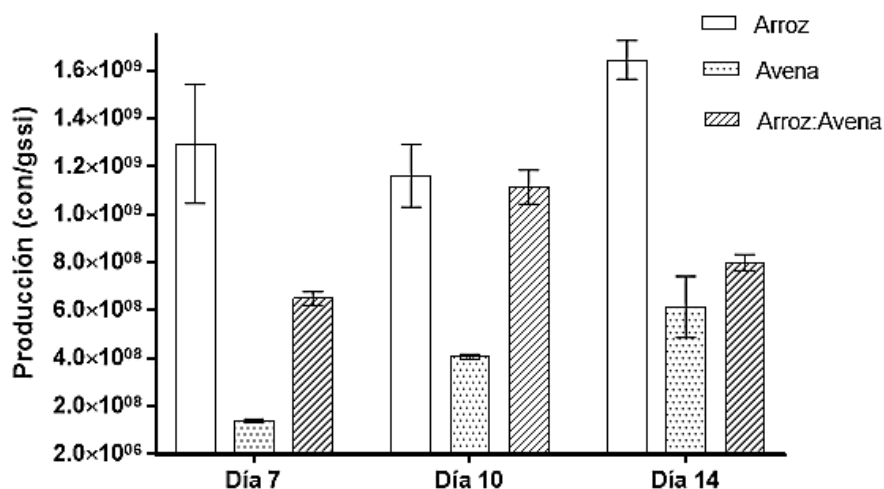
Gráfica 3. Valores de pH de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 en tres distintos sustratos

El aumento de pH en el arroz podría atribuirse a la producción de compuestos alcalinos, por parte del hongo, tal como menciona St Leger *et al.* (1999) donde observaron cepas de *M. anisopliae* que modificaron el pH de su entorno mediante la producción de amoníaco, siendo parte de un mecanismo de adaptación que les permite optimizar su crecimiento. Aunque los valores de pH obtenidos en este estudio se encuentran dentro del rango reportado para *C. javanica* entre 6 -9 de acuerdo con Xing P *et al.* (2022), es posible que este incremento en el arroz haya influido en la producción de conidios, a diferencia de los otros sustratos donde se mantuvo relativamente constante.

9.2 Selección del sustrato para *Beauveria bassiana* CHE- CNRCB- 431

9.2.1 Producción de conidios

De la misma manera que para *C. javanica* CHE-CNRCB-303, el recuento de conidios se realizó en los días 7, 10 y 14 días después de la inoculación de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431. El arroz en los días 7 y 14, mostró niveles de producción de conidios significativamente mayor de $1.29 \times 10^9 \pm 2.49 \times 10^8$ con/gssi y $1.65 \times 10^9 \pm 8.15 \times 10^7$ con/gssi, respectivamente, en comparación con la avena y la mezcla de arroz: avena. Sin embargo, en el día 10, el arroz ($1.16 \times 10^9 \pm 1.32 \times 10^8$ con/gssi) y la mezcla de arroz: avena ($1.12 \times 10^9 \pm 7.28 \times 10^8$ con/gssi) no mostraron diferencias significativas entre sí. En los tres días de extracción, la avena presentó niveles de producción significativamente menores en comparación con los otros dos sustratos (Gráfica 4).



Gráfica 4. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 en tres distintos sustratos

El análisis de la productividad mostró un comportamiento similar a la producción, siendo el arroz el sustrato con mayor productividad en los días 7 ($1.85 \times 10^8 \pm 3.56 \times 10^7$ con/gssi *día) y 14 ($1.18 \times 10^8 \pm 4.05 \times 10^6$ con/gssi *día). En el día 10, la mezcla de arroz: avena alcanzó su mayor productividad ($1.12 \times 10^8 \pm 7.28 \times 10^6$ con/gssi *día), sin diferencias significativas respecto al arroz ($1.16 \times 10^8 \pm 1.32 \times 10^7$ con/gssi *día). La avena, hasta el día 14, presentó una productividad de $4.4 \times 10^7 \pm 9.09 \times 10^6$ con/gssi *día, significativamente inferior a la de los otros dos sustratos. Por tanto, los niveles de producción como la productividad indican que el arroz puede ser un sustrato eficiente para realizar ciclos sucesivos en la producción de conidios de *B. bassiana* CHE-CNRCB-431.

La producción de conidios es comparable a lo reportado por Xie *et al.* (2012), quienes obtienen una producción de 2.7×10^9 con/gssi para el arroz. Comparado con Baris & Er (2021), obtuvieron hasta

9.62x10¹¹ con/gssi en arroz integral; sin embargo, cabe señalar que ellos, como el Dhar & Kaur (2011), que reportan valores de producción más elevados en otros derivados de arroz, como el arroz partido, alcanzando una producción de 1.02x10¹¹ con/gssi, se deben a la incorporación de nutrientes, como extracto de levadura y sales, lo cual no fue considerado en el presente estudio. Además, factores como el tamaño de partícula y las condiciones de cultivo podrían haber influido en las diferencias observadas.

En el caso de la avena, la producción de conidios fue inferior a lo obtenido con el arroz, lo que concuerda con los resultados reportados por Gámez *et al.* (2017) y Mejía-Maldonado (2018), quienes también observaron niveles de producción más bajos en avena, de 5.0x10⁸ y 9.8x10⁸ con/gssi, respectivamente.

Tabla 7. Producción de conidios de *Beauveria bassiana* por gramo de sustrato seco reportados.

<i>Beauveria bassiana</i>		
con/ gssi	Sustrato	Referencia
5.0 x 10 ⁸	Avena	Gámez <i>et al.</i> (2017)
3.5 x 10 ⁸	Arroz	
9.8 x 10 ⁸	Avena	Mejía Maldonado. (2018)
5.5 x 10 ⁸	Arroz	
6.0 x 10 ⁸	Cascarilla de arroz	Sala <i>et al.</i> (2023)
9.62 x 10 ¹⁰	Arroz integral	Bariş & Er (2021) *
1.02 x 10 ¹¹	Arroz partido	
1.62 x 10 ¹⁰	Arroz	Dhar & Kaur (2011) **
2.88 x 10 ¹⁰	Arroz: Salvado de trigo	
2.7 x 10 ⁹	Arroz	Xie <i>et al.</i> (2012)
2.4 x 10 ⁹	Arroz	Ye <i>et al.</i> (2006)

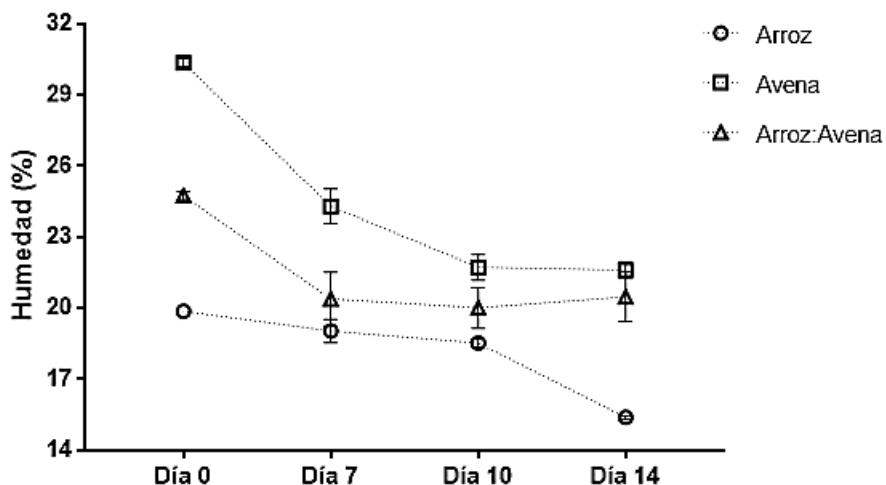
*Agregaron 1.5 g CaSO₄ y 1.5 g CaCO₃ a 100 g de sustrato

**Agregaron 1.5% de extracto de levadura

9.2.2 Humedad

La humedad inicial del arroz (19.86 ± 0.12 %), la avena (30.35 ± 0.19 %) y la mezcla arroz: avena (24.74 ± 0.16%) fue significativamente diferente. La Gráfica 6 ilustra los cambios de humedad a lo largo del estudio, mostrando que el arroz, hasta el día 14, tuvo diferencias significativas con los otros días finalizando con una humedad del 15.38 ± 0.09 %. La avena presentó diferencias a partir del día 7, terminando con una humedad del 21.6 ± 0.35 %; mientras que la mezcla arroz: avena también mostró diferencias significativas desde el día 7, alcanzando una humedad del 20.47 ± 1.05 % al final

del periodo analizado.



Gráfica 6. Porcentaje de Humedad de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 en tres distintos sustratos

En este contexto, la humedad se refiere como la cantidad de agua en el sustrato (granos), y es importante destacar que no toda esta agua es aprovechada por el hongo. En estudios con *Aspergillus flavus* se observaron tasas de crecimiento superiores en arroz integral en comparación con arroz pulido, a pesar de tener valores similares de humedad y actividad de agua (A_w). Este fenómeno sugiere que la composición química y estructural del sustrato, así como la cantidad de almidón presente, pueden influir la utilización del agua presente en el sustrato por parte del hongo (Mousa *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2019; Dhungana *et al.*, 2019). En nuestro experimento, los valores de A_w , obtenidos al inicio para el arroz (0.9833 ± 0.0025), avena (0.9836 ± 0.0073) y la mezcla de arroz: avena (0.9831 ± 0.0033), no mostraron diferencias significativas entre sí.

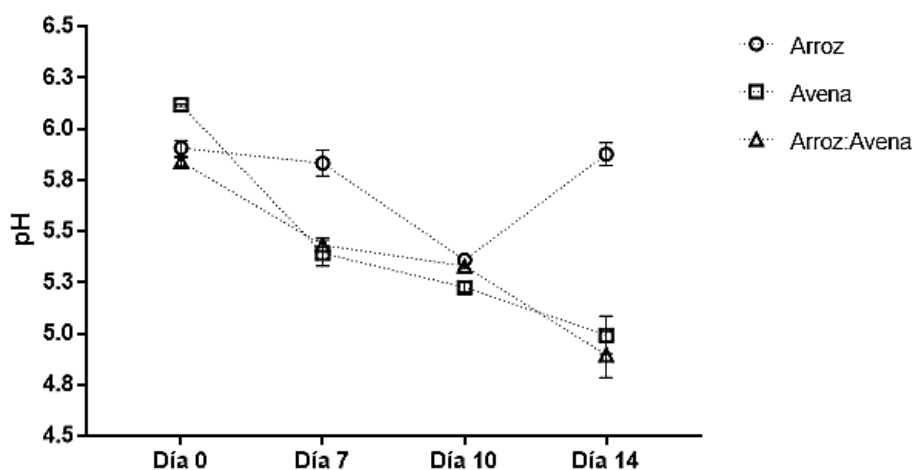
La Tabla 8 presenta los valores iniciales de humedad reportados para *B. bassiana* en diversos sustratos. Los valores de humedad obtenidos en esta selección de sustrato se encuentran por debajo de los rangos reportados en la tabla. Esto se puede notar comparando los resultados obtenidos en nuestro trabajo con el arroz, Mascarin *et al.* (2013) informaron que, con un 44 % de humedad inicial, cuatro aislados de *B. bassiana* produjeron un promedio de $0.9\text{--}2.3 \times 10^9$ con/gssi, la producción de conidios obtenida se encuentra dentro de este rango ($1.29 \times 10^9 \pm 2.49 \times 10^8$ con/gssi) a una humedad menor. Esto podría permitir mantener un nivel adecuado de humedad para la producción de conidios en ciclos sucesivos de *B. bassiana*.

Tabla 8. Valores de Humedad reportados para *Beauveria bassiana*

<i>Beauveria bassiana</i>		
Sustrato	% Humedad	Referencia
Torta de palmiste: Fibra de palma	60 %	Silva <i>et al.</i> (2023)
Arroz	44%	Mascarin <i>et al.</i> (2013)
Cascara de arroz	65-70 %	Sala <i>et al.</i> (2023)
Arroz	70 %	Paiva-Guimarães <i>et al.</i> (2020)

9.2.3 pH

El día de la inoculación, el valor del pH en avena (6.1 ± 0.01) presentó diferencias significativas en comparación con el arroz (5.9 ± 0.04) y la mezcla arroz: avena (5.8 ± 0.02). La Gráfica 7 muestra los cambios de pH a lo largo de 14 días. En el caso del arroz, los valores de pH no mostraron diferencias significativas entre el día de inoculación (5.9 ± 0.04), el día 7 (5.7 ± 0.06) y el día 14 (5.9 ± 0.06), pero hubo una disminución notable en el día 10 (5.3 ± 0.02). En contraste, tanto la avena como la mezcla de arroz: avena presentaron una disminución significativa del pH a partir del día 7 (5.4 en ambos casos), ya al día 14, la avena (5.0 ± 0.09) y la mezcla (4.9 ± 0.11) mostraron valores inferiores al del arroz (5.9 ± 0.06).



Gráfica 7. Valores de pH de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 en tres distintos sustratos

Los resultados obtenidos se ajustan con lo que informa Phan *et al.* (2023), donde indican que los valores para una producción eficiente de conidios de *B. bassiana* se sitúan en un rango de pH entre 5 -8, argumentando que estos hongos prosperan y producen conidios de manera eficiente en un ambiente ligeramente ácido a neutro. En nuestro estudio, el pH de los tres sustratos en el día de inoculación fue alrededor de 6, lo que indica que se encontraba en un entorno adecuado para la producción de conidios.

Aunque se presentaron disminuciones en el pH en los sustratos, estos no cayeron por debajo de los límites que podrían inhibir la actividad metabólica y la producción de conidios. Sin embargo, el arroz mantuvo valores al parecer más adecuados que con la avena. Esto destaca la importancia de mantener un equilibrio adecuado en el pH para maximizar la producción de conidios.

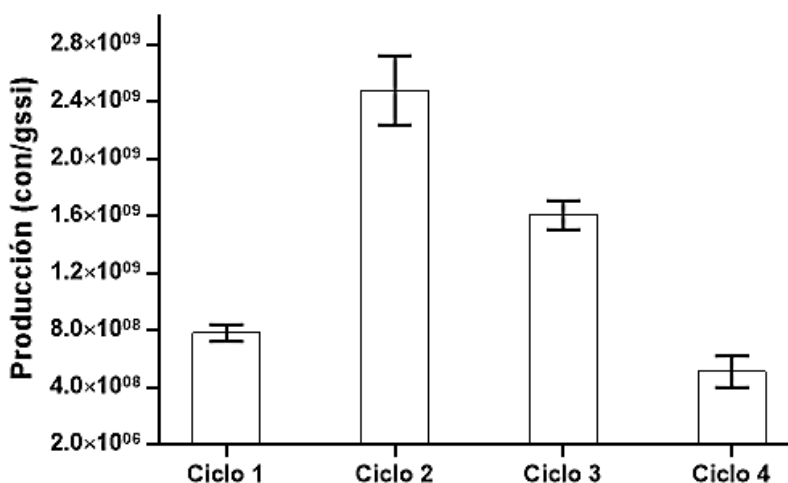
9.3 Ciclos sucesivos para *Cordyceps javanica* CHE- CNRCB- 303

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se eligió el arroz para llevar a cabo ciclos sucesivos con *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB- 303

9.3.1 Producción de conidios

En el primer ciclo de producción de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303, con una duración de 10 días, se alcanzó una producción promedio de $7.8 \times 10^8 \pm 6.0 \times 10^7$ con/gssi, lo que corresponde a una productividad de $7.8 \times 10^7 \pm 6.0 \times 10^6$ con/gssi*día, a los 7 días de incubación posterior al primer conteo (segundo ciclo), se observó un aumento significativo en comparación al primer ciclo, alcanzando un promedio de $2.48 \times 10^9 \pm 2.42 \times 10^8$ con/gssi, equivalente a una productividad de 3.54×10^8 con/gssi*día.

En el tercer ciclo, la producción disminuyó respecto al segundo, a un promedio de $1.61 \times 10^9 \pm 1.00 \times 10^8$ con/gssi después de 10 días de incubación, lo que corresponde a una productividad de $1.61 \times 10^8 \pm 1.00 \times 10^8$ con/gssi*día. Sin embargo, el sustrato se visualizó relativamente intacto, lo cual concuerda con los datos de producción donde el hongo aún podía aprovechar los nutrientes (Figura 11.C), siendo así fue sometido a un cuarto ciclo de 10 días, donde se obtuvo un promedio de $5.1 \times 10^8 \pm 1.08 \times 10^7$ con/gssi, con una productividad de $5.1 \times 10^7 \pm 1.08 \times 10^6$ con/gssi*día, este último ciclo no presentó diferencias significativas con el primero. Sin embargo, se observó una mayor ruptura del arroz (Figura 11.D), lo que podría explicar la disminución en la producción.



Gráfica 8. Producción de conidios de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 en arroz precocido durante cuatro ciclos sucesivos

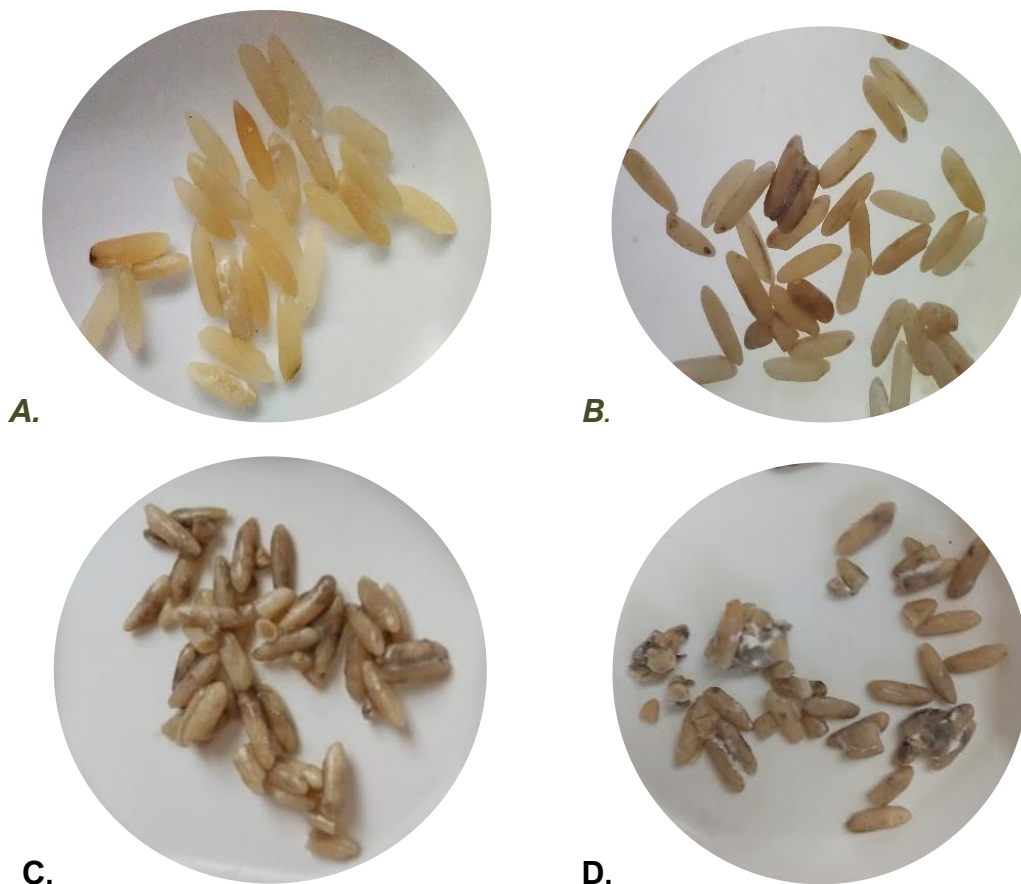


Figura 11. Arroz después de la extracción de conidios de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 (A. Ciclo 1, B. Ciclo 2, C. Ciclo 3, D. Ciclo 4)

Se lograron realizar cuatro ciclos sucesivos de producción, alcanzando una producción total acumulado de 5.38×10^9 con/gssi. Awan *et al.* (2021), evaluaron las condiciones de FES para la optimización en la producción de *C. javanica* F-HY002-ACPHali en salvado de arroz, obteniendo una producción de 4.9×10^8 con/gssi después de 12 días, lo que representa una producción 10 veces menor que el acumulado en nuestros cuatro ciclos. De igual manera, Xie *et al.* (2016), inocularon 100 g de arroz integral con una cepa de *Isaria javanica* Pf04 en bolsas de polietileno durante 15 días, tras remojar el arroz por 30 min y escurrirlo por una hora, logrando una producción de 1.2×10^9 con/gssi, aproximadamente cuatro veces menor que el nuestro en los cuatro ciclos logrados.

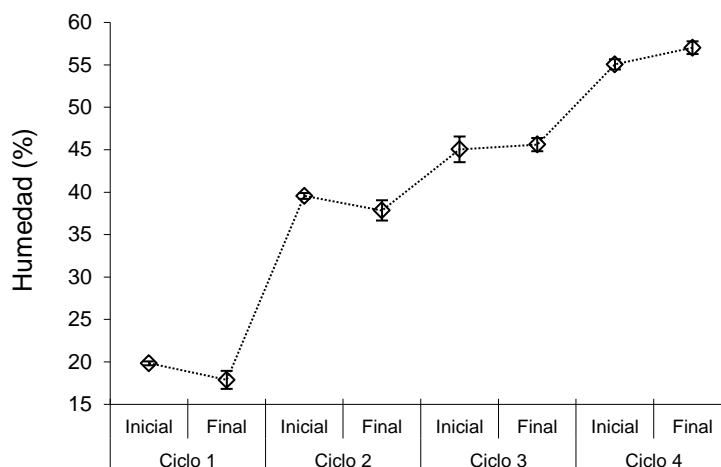
Mascarin *et al.* (2018), aislaron y caracterizaron 11 cepas de *C. javanica*, evaluando su producción en arroz precocido por 8 días. Dos aislados (CG1228 y CG1326) destacaron significativamente alcanzando más de 7×10^9 con/gssi, mientras que los otros 9 presentaron un promedio de 2.5×10^9 con/gssi. La producción acumulada obtenida es mayor a la reportada por Kim *et al.* (2014) en 9 de las 11 cepas aisladas utilizando arroz integral, obtuvieron una producción de 3.03×10^{10} con/gssi de un

aislado de *I. javanica* de Corea después de 15 días. La diferencia con nuestros resultados podría atribuirse al contenido nutricional, la humedad inicial y estructura del arroz (porosidad), que favorecen la conidiación en el arroz integral, a diferencia del arroz precocido utilizado en este experimento.

García Valdés (2023) llevó a cabo cuatro ciclos sucesivos en arroz con *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, obteniendo un acumulado de 6.54×10^9 con/gssi. a partir del tercer ciclo, se observó una disminución en su producción; sin embargo, fue mayor a la obtenida con *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303. Aunque no se han encontrado reportes sobre la reutilización de sustratos para la producción de conidios del género *Cordyceps*, los resultados acumulados son favorables y superiores en algunos de los mencionados en las referencias anteriores, así como en la Tabla 9 de la sección de selección de sustrato.

9.3.2 Humedad

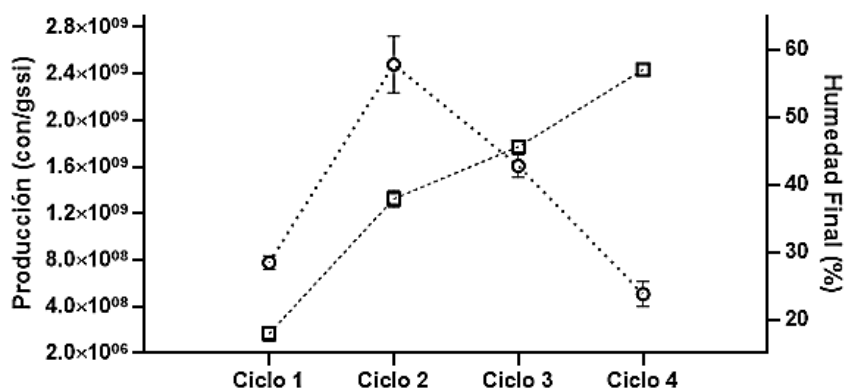
La humedad inicial del primer ciclo fue del 19.83 ± 0.23 %, aumentando en los ciclos subsiguientes. Es importante mencionar que, tras la extracción de los conidios con Tween 80, el sustrato se dejó escurrir en condiciones durante aproximadamente 5 min para eliminar la mayor cantidad de agua posible, antes de colocar en una nueva bolsa estéril para iniciar el siguiente ciclo; en ese momento también se tomó una muestra para medir la humedad final (después de la extracción). Así, la humedad inicial del segundo ciclo fue del 39.18 ± 0.34 %, en el tercer ciclo inició con un 45.05 ± 1.51 %, y finalmente para el cuarto ciclo, se registró un 55.06 ± 0.60 %. La humedad final en cada ciclo se midió antes de la extracción de conidios, finalizando el primer ciclo con un 17.89 ± 1.06 %, el segundo con un 37.85 ± 1.19 %, el tercero con un 45.6 ± 0.78 % y el cuarto ciclo con un 57.02 ± 0.75 %. En cada ciclo, no se encontraron diferencias significativas entre la humedad inicial y final (Gráfica 9).



Gráfica 9. Humedades a lo largo de los cuatro ciclos sucesivos de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 en arroz precocido

La Gráfica 10 muestra la relación entre los niveles de producción conidios (con/gssi) obtenidos para *C. javanica* CHE-CNRCB-303 en los cuatro ciclos y la humedad final de cada uno. Se observa que en el segundo ciclo (2.48×10^9 con/gssi), donde se obtuvo la mayor producción, la humedad final fue del 37.85 ± 1.19 %. Sin embargo, a partir del tercer ciclo, la humedad total en el arroz continuó aumentando por encima del 40 %, lo que afectó negativamente la producción de conidios, disminuyendo.

Incorporar estrategias como la adición de sustrato nuevo, en este caso arroz con un menor porcentaje de humedad o algún texturizante, podría ayudar a controlar la humedad por debajo del 40 %, donde se observó la mayor producción. Además, al contar con sustrato nuevo, el hongo podría aprovecharlo para mantener o incluso aumentar los niveles de producción alcanzados en el segundo ciclo.

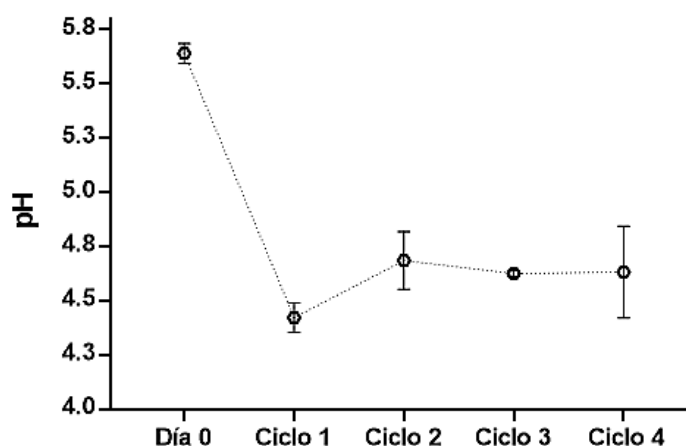


Gráfica 10. ○ Producción de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 (con/gssi), y □ % Humedad Final (eje secundario derecho) en cada ciclo

Awan et al. (2021) para la producción de conidios de *C. javanica* F-HY002-ACPHali en salvado de arroz, llevaron a cabo la fermentación con una humedad del 60%. Según la bibliografía referenciada en la Tabla 6 de la sección de selección de sustrato, las humedades en cada ciclo se encuentran dentro del rango óptimo para lograr una conidiación adecuada del género *Cordyceps*. Esto plantea la interrogante de si el sustrato, después del segundo ciclo, aunque mantenga una humedad ideal, se ve afectado por alguna otra variable que limite la producción constante de conidios. Mascarin et al. (2018) mencionan que la capacidad de cepas de *C. javanica* para producir conidios y blastosporas está influenciada por factores ambientales como la radiación UV, el estrés por calor, así como por factores nutritivos, oxidativos y osmóticos (Gráfico 10).

9.3.3 pH

En la Gráfica 11 se muestra los cambios de pH a lo largo de los cuatro ciclos. Al inicio, en el día de inoculación, el pH era de 5.6 ± 0.05 . Durante el primer ciclo, el pH descendió y se mantuvo constante, sin diferencias significativas entre los ciclos posteriores, con valores cercanos a 4.5. En un estudio realizado por Robert *et al.* (2023), se llevaron a cabo cultivos repetidos en medio líquido con *C. javanica*, completando hasta 60 ciclos consecutivos con reinoculación en medio fresco. En este estudio, se reportó que el pH para el crecimiento fue en promedio inferior a 6.5 en todos los ciclos.

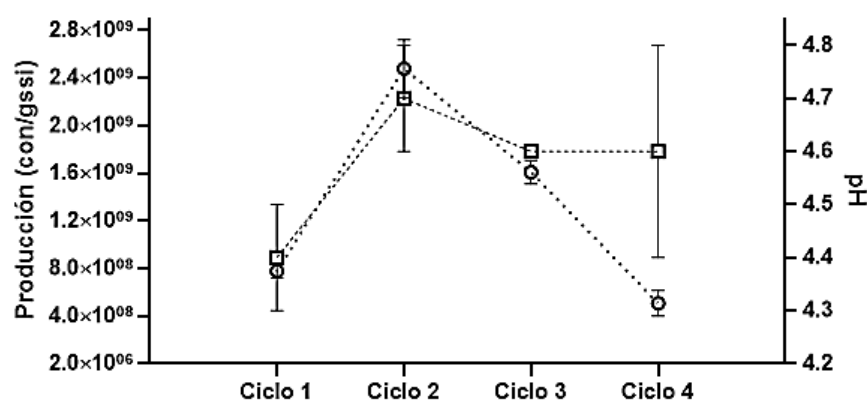


Gráfica 11. pH en el día de inoculación (día 0) y al momento de extracción en cada ciclo en arroz precocido de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303

En la Gráfica 12 se observa que en el segundo ciclo presentó la mayor producción de conidios, mientras que el pH al finalizar el segundo ciclo y al iniciar el tercero fue más alto en comparación con los demás ciclos. Sin embargo, esta diferencia no es significativa, lo que sugiere que el pH no influyó en la disminución en los ciclos posteriores. Esto podría indicar que el hongo requiere otros

compuestos, posiblemente más alcalinos, para su crecimiento. Aunque en la humedad hubo cambios a lo largo de cada ciclo, no se debe descartar la posibilidad de un impacto del pH en la conidiación.

Precisamente Peixiang Xing *et al.* (2023) mencionan que los valores adecuados de pH para *C. javanica* oscilan entre 6-9. Ajustar el pH dentro de este rango en los ciclos posteriores al segundo podría mejorar la producción de conidios, ya que se estaría proporcionando un ambiente más favorable para el crecimiento del hongo. La incorporación de soluciones amortiguadoras al momento de la extracción podría mantener los valores de pH dentro del rango óptimo. Siendo que la humedad, en conjunto con el pH, parecen ser factores importantes que considerar en futuras experimentaciones para la producción de conidios, reutilizando sustrato sin la necesidad de reinocular.



Gráfica 12. ○ Producción de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 (con/gssi), y □ pH el día de inoculación (Día 0) y en el momento de extracción de conidios (eje secundario derecho) en cada ciclo

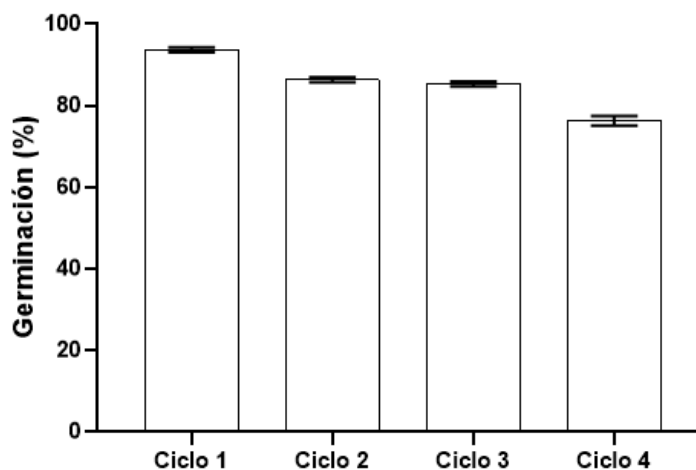
9.3.4 Germinación

Los valores de germinación superaron el 85 % en los primeros tres ciclos, pero en el cuarto ciclo se observó una disminución significativa (76.3 ± 1.15 %) (Gráfica 13). Esta reducción podría deberse a varios factores, como el agotamiento de nutrientes en el sustrato, la acumulación de metabolitos inhibitorios como ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, o una inestabilidad fenotípica de la cepa pudo haber influenciado en esta disminución, como reporta Hoang *et al.* (2023), que puede ocurrir debido a subcultivos repetidos en medios artificiales, afectando la calidad y producción.

Nuestro trabajo en comparación con el de Xie *et al.* (2016) donde la producción de conidios de *I. javanica* Pf04 en arroz integral, alcanzaron un porcentaje de germinación del $96 \pm 3.7\%$. Silva *et al.* (2018) en FES utilizando torta de palmiste en biorreactores de bandeja, para la producción de conidios de *I. javanica* CG1228, obtuvieron después 6 días de incubación y dos días más de secado un

porcentaje de germinación del $88.43 \pm 0.69\%$. Rojas *et al.* (2023) en 14 aislados de *Cordyceps fumosorosea* incubados en arroz precocido, el promedio de germinación en sus controles (sin tratamiento UV) estuvo dentro de un rango de 96 -98%.

Con la finalidad de garantizar una buena calidad de los conidios, Jenkins y Grzywacz. (2000) recomiendan que el porcentaje de germinación para una calidad aceptable debe ser igual o superior a un 85%. Los tres primeros ciclos obtenidos se encuentran por en ese rango, corroborando que la reutilización del arroz hasta estos tres ciclos no afecta en su germinación. A diferencia del cuarto ciclo como se observa en el Gráfica 13 estuvo por debajo de este porcentaje que sugiere cambios en el hongo con el sustrato, o la acumulación de algún compuesto o metabolismo que inhiba su germinación, o como se mencionó la misma degeneración de la cepa.



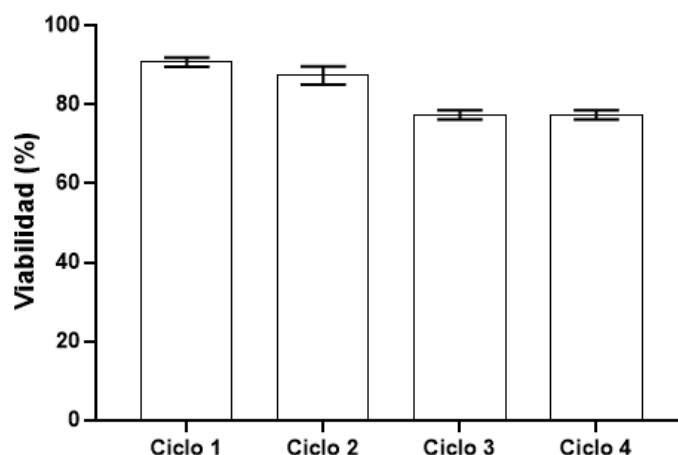
Gráfica 13. Porcentaje de germinación a lo largo de cuatro ciclos sucesivos de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303

9.3.5 Viabilidad

La viabilidad de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB 303 (Gráfica 14) en los primeros dos ciclos se encuentra por arriba de los parámetros de calidad establecidos en Jenkins y Grzywacz. (2000), el tercer y cuarto ciclo no presentaron diferencias significativas entre sí, sin embargo, se encontraron por debajo de los parámetros de calidad 77.3 % en ambos ciclos, esto podría explicarse debido a la disminución en la germinación. Ordaz- Hernández *et al.* (2024), con la misma cepa en arroz obtuvo una viabilidad de $94.6 \pm 0.8\%$ en un solo uso del sustrato.

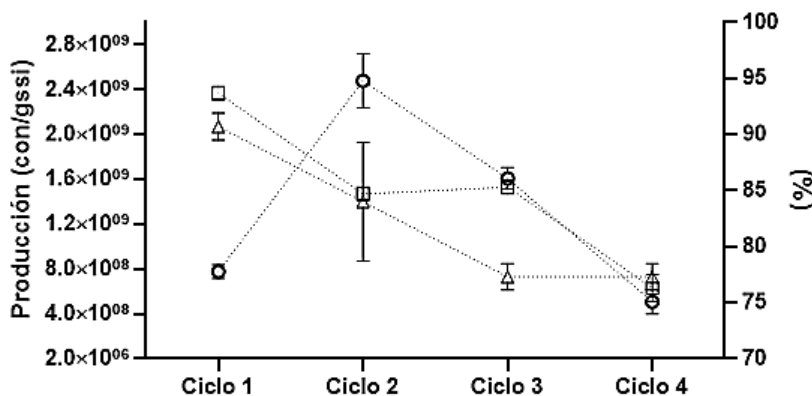
La causa de la disminución de la viabilidad no está clara, pero es posible que se deba cambios en el mismo sustrato, por ejemplo Bariş y Er (2021) evaluaron la virulencia de *Beaveria bassiana* sobre *Rhizopertha dominica*, creciendo el hongo en distintos sustratos (arroz integral, arroz partido, trigo,

bulgur/ burghul¹ y dövme¹ (alimentos elaborados a base de trigo)¹), observaron que la virulencia de los conidios después de crecer en distintos sustratos era distinta, siendo en arroz integral la mayor (80%) y la menor fue en trigo y bulgur (40%). La disminución de la viabilidad podría tener implicaciones negativas para su uso, ya que no sería lo suficientemente efectivo para controlar las poblaciones de plagas.



Gráfica 14. Porcentaje de viabilidad a lo largo de cuatro ciclos sucesivos de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303

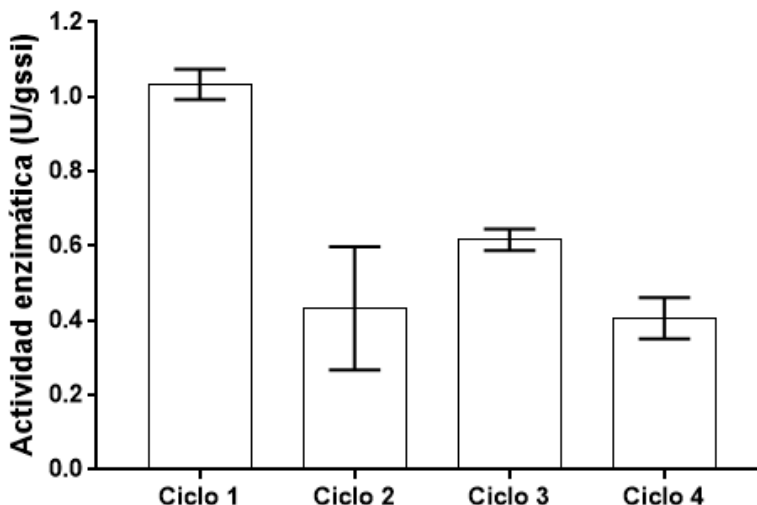
La relación entre estos dos parámetros de calidad (germinación y viabilidad) se presenta en el Gráfica 15, donde en ambos casos en el segundo ciclo hubo una disminución significativa con respecto al primero, la calidad en esos rangos es aún considerada aceptable y los niveles de producción altos puede compensar esta disminución comparada con el primer ciclo, sin embargo, se debe valorar qué factores pudieron repercutir para mantener la calidad igual que en el primer ciclo, así como su producción en cada ciclo sucesivo. En el cuarto ciclo la producción disminuyó al igual que ambos parámetros de calidad, esto sugiere una relación directa entre estos parámetros.



Gráfica 15. ○ Producción de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 (con/gssi), y valores porcentuales para □ germinación y Δ viabilidad (eje secundario derecho) en cada ciclo

9.3.6 Producción de Amilasas

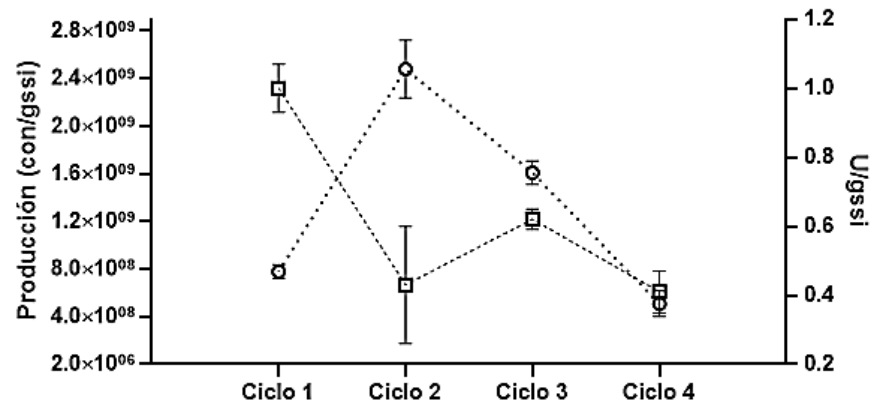
La mayor producción de amilasas en el primer ciclo fue de 1.03 ± 0.04 U/gssi. La producción disminuyó significativamente a partir del segundo ciclo a 0.43 ± 0.17 U/gssi, tuvo un ligero aumento a 0.62 ± 0.03 U/gssi en el tercer ciclo, pero no fue significativo con respecto al segundo, finalmente en el cuarto ciclo la producción volvió a disminuir a un valor de 0.41 ± 0.06 U/gssi (Gráfica 16).



Gráfica 16. Actividad enzimática de amilasas (U/gssi) al final de cada uno de los cuatro ciclos sucesivos de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303

Es importante destacar que, hasta ahora, no se ha documentado que el género *Cordyceps* produzca cantidades significativas de amilasas; no se puede descartar que la producción máxima de amilasas sea en días previos a la extracción de conidios, por lo que, sería necesario realizar un seguimiento más detallado a lo largo de los días en cada ciclo para determinar si estas enzimas desempeñan un papel clave en la degradación total del sustrato, para la obtención de azúcares más simples en la producción de conidios del hongo.

En la Gráfica 17 se observa cómo a partir del segundo ciclo, donde se presentó la mayor producción de conidios, las amilasas totales disminuyeron y se mantuvieron dentro de ese rango. Esto sugiere que hay factores influyendo en su producción en el momento de extracción, o bien como se mencionó existe un punto máximo de producción días previos a su extracción; también es probable que la variación en el pH esté afectando su producción, se empiecen acumular metabolitos o compuestos que inhiban su actividad enzimática, que se esté terminando el sustrato. Sea a modo de ejemplo, Farazi *et al.* (2024) menciona que compuestos de polifenoles y péptidos pueden inhibir la actividad de las α -amilasas.



Gráfica 17. ○ Producción de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303 (con/gssi), y □ actividad enzimática de amilasas (eje secundario derecho) en cada ciclo

9.3.7 Pérdida de Peso Seco

En el Gráfica 18, se muestra el sustrato residual a lo largo de los cuatro ciclos, con aumentos significativos a lo largo del experimento. En el primer ciclo se perdió un promedio de $11.65 \pm 1.49 \%$, en el segundo $18.81 \pm 0.99 \%$, en el tercero $24.9 \pm 0.24 \%$, y en el cuarto ciclo $39.4 \pm 2.94 \%$. Para la producción de conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB-303 se perdió entre un cuarto y la mitad del sustrato inicial, esto puede ser debido a la liberación de CO₂, el proceso de extracción de los conidios. Esta tendencia es similar al trabajo realizado por García Valdés. (2023) donde con cuatro ciclos sucesivos con *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, describe que en el proceso se pierde casi la mitad (47.96 %) del sustrato inicial.

Se optó por realizar solo cuatro ciclos sucesivos con *C. javanica* CHE-CNRCB-303, debido a que los niveles de producción y los parámetros de calidad disminuyeron significativamente en este último ciclo. La humedad aún se encontraba dentro de los rangos recomendados (Tabla 8) y el sustrato estaba visualmente en condiciones (Figura 11.C) para ser sometido a otro ciclo, con lo que se podría consumir casi el 50% del sustrato inicial, pero el resultado en cuanto a la producción, germinación y viabilidad no serían favorables para el objetivo del trabajo.

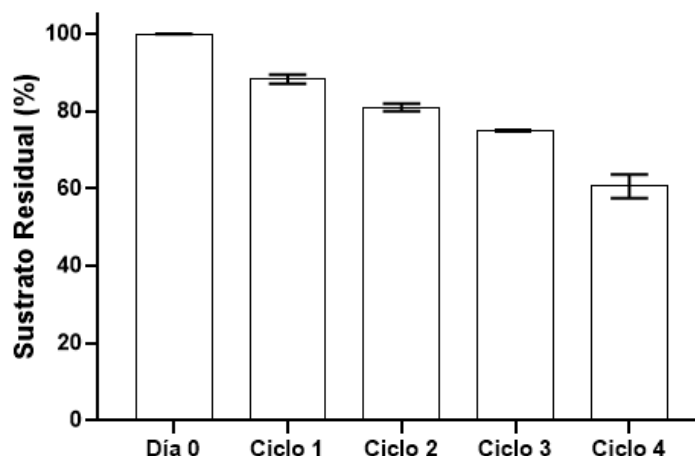


Gráfico 18. Sustrato residual (%) a lo largo de cuatro ciclos sucesivos con *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303

9.3.8 Zimogramas

En la Figura 12, se presenta el zimograma realizado con una muestra de cada ciclo logrado con *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303, solo se logra visualizar el control positivo, a diferencia del zimograma realizado para *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (Figura 18) lo que puede indicar una diferencia en la actividad y concentración de la muestra obtenida.

Ahora bien, en la Figura 13, se presenta el mismo zimograma revelado mediante tinción de plata, se optó por esta técnica dado que ofrece una sensibilidad mayor a niveles de proteína más pequeños a diferencia de la tinción con Azul de Coomassie (Merril *et al.*, 1981). En esta tinción de plata se ocuparon las mismas muestras de cada ciclo, y se observan bandas tenues, no se puede confirmar que sean correspondientes a alguna amilasa, lo que corrobora que la concentración obtenida colocada en el gel era muy pequeña, siendo que las pruebas realizadas con el control positivo, para identificar la concentración mínima requerida de la muestra para que se lograra hidrolizar el almidón en el gel y visualizarse, era mínimo de $0.5 \text{ U/mL} \equiv 0.033 \text{ mU/pozo}$.

La incapacidad de identificar si existen isoformas de amilasas a lo largo de los ciclos para *Cordyceps javanica* puede tener distintas implicaciones, algunas de ellas podría que el hongo no produce cantidades significativas de amilasas, las enzimas se degradan rápidamente o inclusive la extracción de estas enzimas requiere otro tipo de metodología

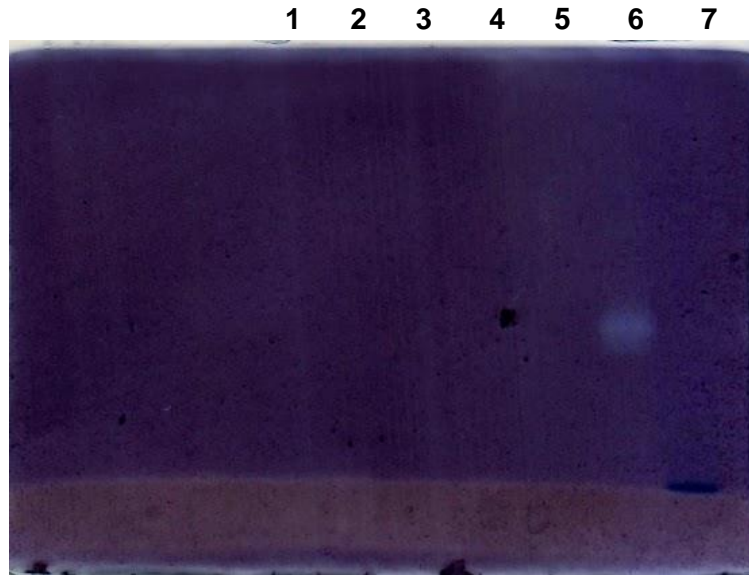


Figura 12. Zimograma revelado con solución Lugol (A cada pozo se le agregó 15 μ L. 1. Muestra ciclo 4 (0.11 U/mL \equiv 0.007 mU/pozo); 2. Muestra ciclo 3 (0.26 U/mL \equiv 0.017 mU/pozo); 3. Muestra ciclo 2 (0.26 U/mL \equiv 0.017 mU/pozo); 4. Muestra ciclo 1 (0.48 U/mL \equiv 0.032 mU/pozo); 5. Control negativo (agua); 6. Control positivo (α -Amilasa, 2.5 U/mL \equiv 0.167 mU/pozo); 7. Marcador de proteína)

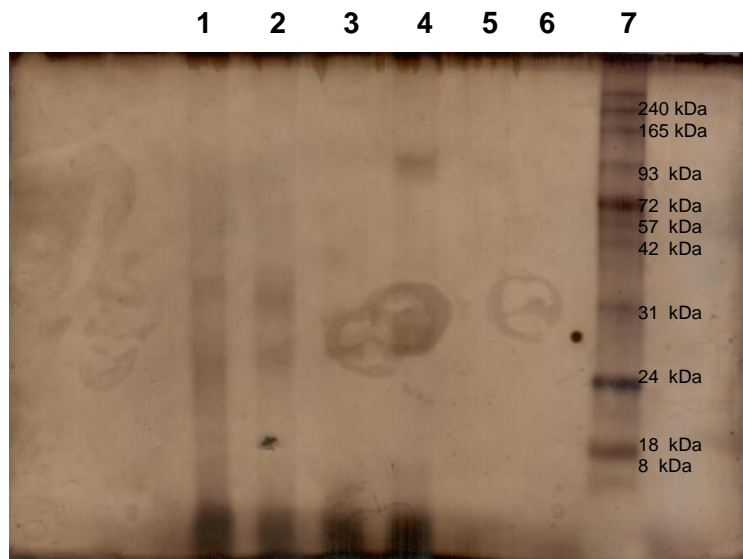


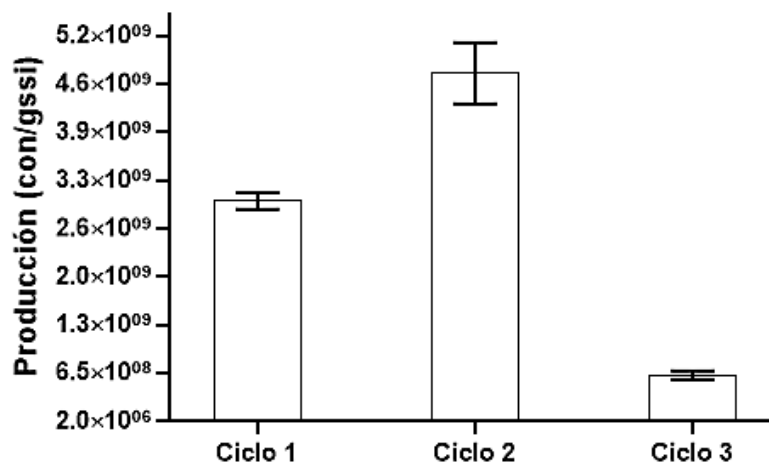
Figura 13. Zimograma con tinción de plata (A cada pozo se le agregó 15 μ L. 1. Muestra ciclo 4 (0.11 U/mL \equiv 0.007 mU/pozo); 2. Muestra ciclo 3 (0.26 U/mL \equiv 0.017 mU/pozo); 3. Muestra ciclo 2 (0.26 U/mL \equiv 0.017 mU/pozo); 4. Muestra ciclo 1 (0.48 U/mL \equiv 0.032 mU/pozo); 5. Control negativo (agua); 6. Control positivo (α -Amilasa, 2.5 U/mL \equiv 0.167 mU/pozo); 7. Marcador de proteína)

9.4 Ciclos Sucesivos *Beauveria bassiana* CHE- CNRCB- 431

A partir de los resultados obtenidos anteriormente, se eligió el arroz para llevar a cabo ciclos sucesivos con *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB- 431

9.4.1 Producción de conidios

Beauveria bassiana CHE-CNRCB-431 en su primer ciclo con una duración de 10 días obtuvo una producción promedio de $2.98 \times 10^9 \pm 1.11 \times 10^8$ con/gssi, con una productividad de $2.98 \times 10^8 \pm 1.11 \times 10^7$ con/gssi*día. Después de ocho días de incubación (segundo ciclo) hubo un aumento significativo obteniendo $4.7 \times 10^9 \pm 4.11 \times 10^8$ con/gssi, equivalente a una productividad de $5.88 \times 10^8 \pm 5.14 \times 10^7$ con/gssi*día. El tercer ciclo tuvo una duración de 7 días presentando decaimiento significativo con $6.24 \times 10^8 \pm 5.50 \times 10^7$ con/gssi, y una productividad de $8.91 \times 10^7 \pm 7.86 \times 10^6$ con/gssi*día (Gráfica 19).



Gráfica 19. Producción de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (con/gssi) a lo largo de tres ciclos en arroz precocido

Para este hongo se lograron 3 ciclos sucesivos, siendo el segundo ciclo con el mayor nivel de producción. No se sometió a un cuarto ciclo, debido a que el sustrato no se observaba en condiciones para iniciarlo, debido a la formación de biopelículas densas que aglomeraban varios granos de arroz, probablemente limitando el acceso del hongo a todo el sustrato, dificultando su crecimiento y conidiación, así como la dificultad en la extracción, ya que el arroz se terminaba de quebrar y no permitía escurrir en su totalidad el Tween (Fig. 14. D). La producción acumulada de los tres ciclos fue de 8.3×10^9 con/gssi.

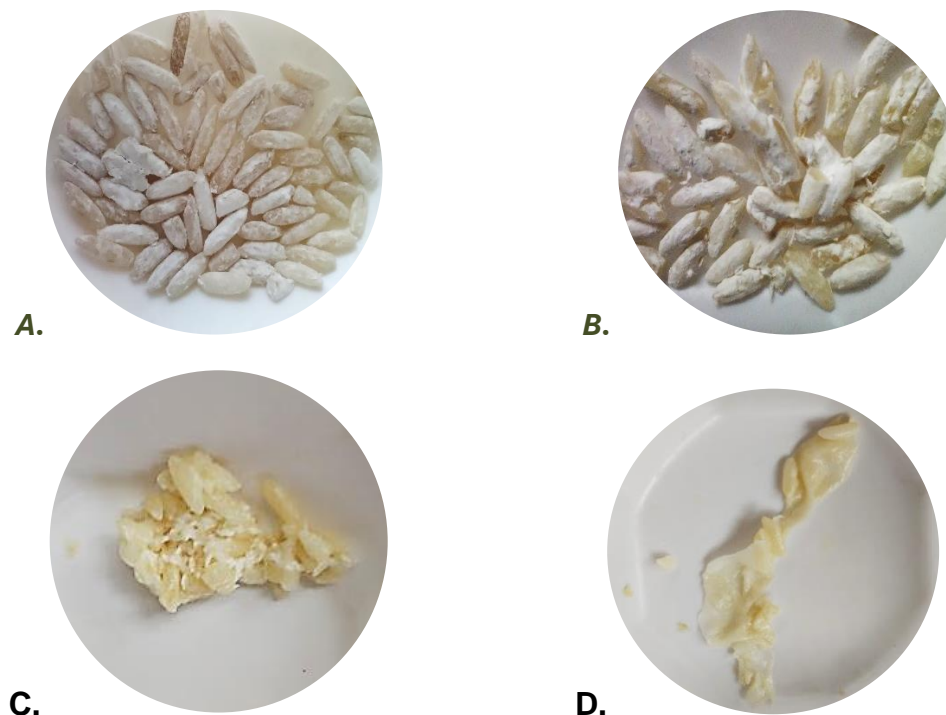


Figura 14. Arroz antes de la extracción de conidios de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (A Ciclo 1, B. Ciclo 2, C. Ciclo 3, D. Ciclo 3-Biopelícula)

Silva *et al.* (2023), evaluaron la producción de conidios para *B. bassiana* CG1229 en un biorreactor de lecho empacado con torta de palmiste (100%), así como torta de palmiste con fibra de palma (70:30) como sustratos, obteniendo 1.47×10^9 con/gssi y 4.65×10^9 con/gssi, respectivamente en un solo ciclo de producción. En este sentido, nuestra producción acumulada fue de al menos 6 y 2 veces mayor, desde el primer ciclo se logró una producción mayor al que obtuvieron con pura torta de palmiste, y el segundo ciclo tuvo resultado similar a la mezcla 70:30 de ellos. Bakr *et al.* (2024), con un aislado de *B. bassiana* (Bals.) Vuill. en matraces con 100 g de arroz hervido obtuvieron 4.89×10^7 con/gs, comparado con nuestro trabajo, los niveles de producción inclusive del tercer ciclo son superior al obtenido por estos autores. Lara-Juache *et al.* (2021) reportaron la producción de 1.24×10^9 con/gs en un reactor de biofilm, estrategia que combina una fermentación en estado líquido (FEL) y una FES con *B. bassiana* PQ2, comparando esta estrategia con la nuestra ocupando ciclos sucesivos en FES la producción obtenida fue hasta 7 veces mayor.

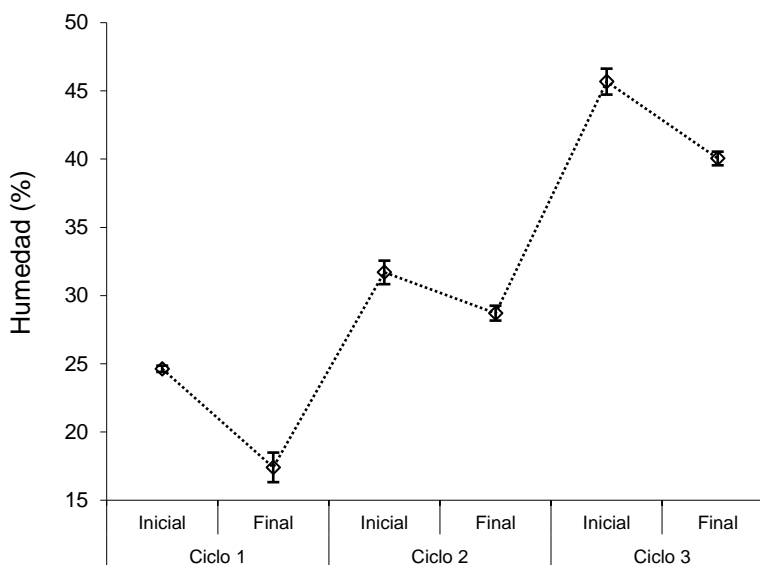
De acuerdo con García Valdés (2023), la producción de conidios de *Trichoderma asperellum* Th-T4, reutilizando el sustrato, alcanza los 7.41×10^9 con/gssi en 2 ciclos sucesivos; sin embargo, durante el tercer ciclo reporta el aglomeramiento del sustrato, impidiendo la cosecha exitosa de los conidios, este mismo fenómeno fue observado durante el final del tercer ciclo del presente estudio. Esto corroboraría

que la producción y el número de ciclos dependen del género y la cepa analizada.

A pesar de que los resultados obtenidos no se han comparado con estudios que reutilicen el sustrato para el género *Beauveria*, son en su mayoría favorables y superiores a aquellos estudios en los que el sustrato se utiliza una sola vez reportados en esta discusión y en la Tabla 7 de la sección de selección de sustrato.

9.4.2 Humedad

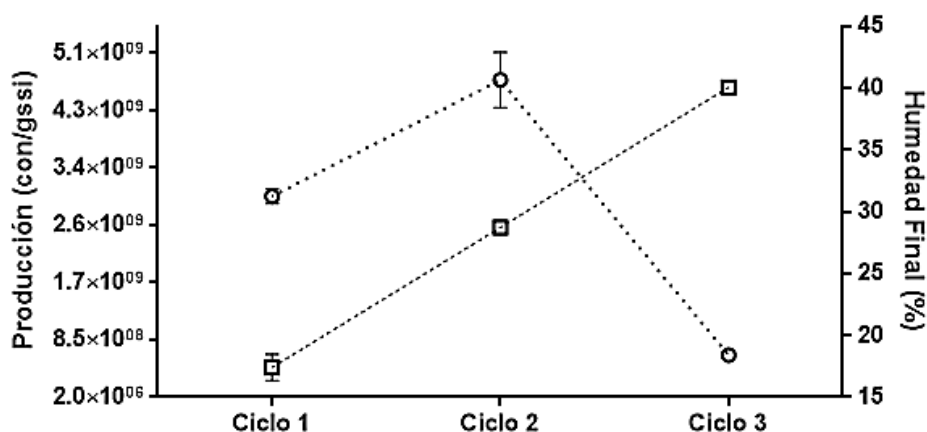
En la Gráfica 20 se presentan los perfiles de humedad a lo largo de este experimento, el día de inoculación inició con una humedad del 24.6 ± 0.23 %, disminuyendo significativamente al término del primer ciclo a 17.41 ± 1.08 %; después de la extracción el segundo ciclo la humedad fue de 31.7 ± 0.86 %, al final de este ciclo se modificó a 28.71 ± 0.54 %, y el tercer ciclo después de la extracción inició con una humedad del 45.68 ± 0.95 %, para terminar con 40.05 ± 0.50 %. Realmente la humedad aún era aceptable para someter a un cuarto ciclo; sin embargo, el sustrato al momento de extraer los conidios de este tercer ciclo comenzaba a deteriorarse e impedía el filtrado del Tween a través de la coladera para eliminar la mayor cantidad de agua.



Gráfica 20. Humedades a lo largo de los tres ciclos de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 en arroz precocido

La relación entre la producción de conidios y la humedad final a lo largo de los tres ciclos se presenta en el Gráfico 23, se puede ver que el aumento de la humedad en el último ciclo influyó en la producción; sin embargo, Silva *et al.* (2023) en un biorreactor de lecho fijo para la producción de *Beauveria bassiana* CG1229 probaron humedades del 60% - 65%. De la misma manera Silva *et al.* (2018) en biorreactores tipo bandeja para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* CG1229 la humedad inicial del

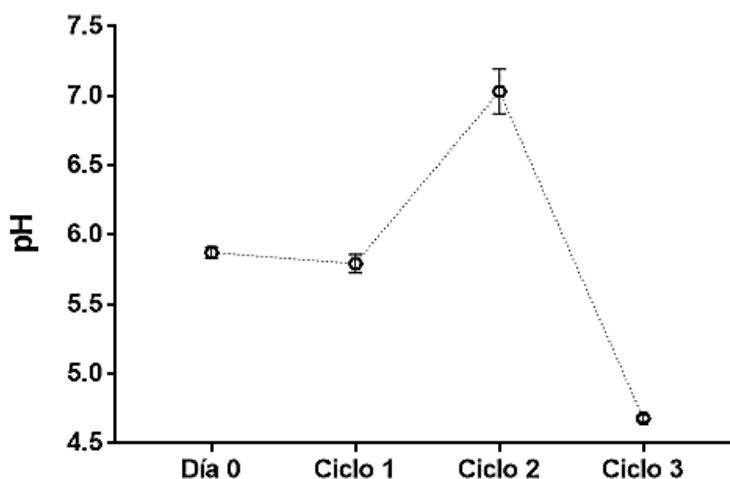
sustrato fue entre el 55 – 65%. Pham *et al.* (2010) con *Beauveria bassiana* KK5 evaluaron la producción de conidios en distintos valores de humedad (30, 35, 40 y 50%), la mayor producción se obtuvo con el valor inicial de 40%. Tomando en cuenta estas referencias, la humedad a lo largo de los ciclos se encuentra por debajo de los valores máximos que se utilizaron para producir conidios de *B. bassiana*, es decir, la reutilización está afectando la composición del arroz en el último ciclo para poder mantener o aumentar la producción de conidios, aun estando en rangos de humedad aceptables para su conidiación.



Gráfica 21. ○ Producción de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (con/gssi), y □ % Humedad Final (eje secundario derecho) en cada ciclo

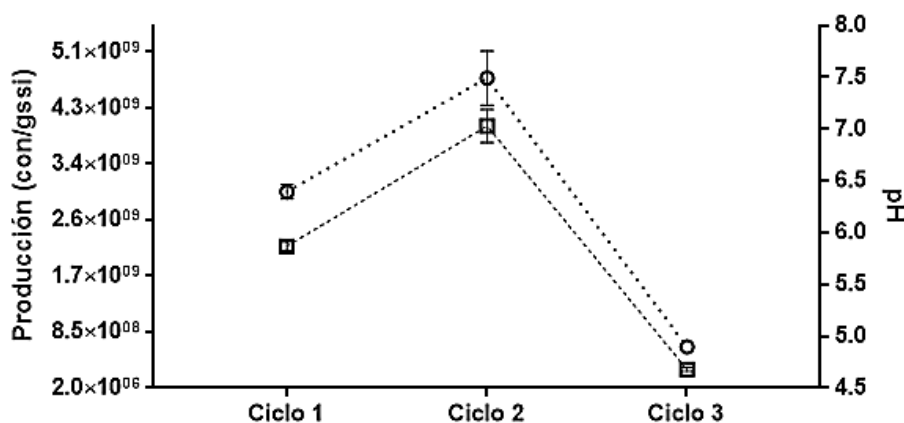
9.4.3 pH

El día de la inoculación el pH se encontraba en un valor de 5.87 ± 0.04 , para el final del primer ciclo no presentó diferencias significativas ($\text{pH} = 5.79 \pm 0.07$), en el segundo ciclo sí se elevó hasta un valor de 7.03 ± 0.16 , y en el tercer ciclo el pH tuvo un decaimiento significativo hasta 4.68 ± 0.02 (Gráfica 22). Lo obtenido, concuerda con lo reportado por Lara-Juache *et al.* (2021), quienes utilizaron un pH inicial de 6 en reactores de biofilm para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* PQ2, no detallan un seguimiento del pH a lo largo de su producción, pero obtuvieron 1.24×10^9 con/gs. En nuestro experimento el aumento en el pH favoreció la producción en el segundo ciclo, lo que sugiere que un pH ligeramente alcalino podría favorecer la producción de conidios.



Gráfica 22. pH en el día de inoculación (Día 0) y al momento de extracción en cada ciclo en arroz precocido de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431

En el Gráfica 23 se observa que conforme la producción aumenta en el segundo ciclo, también el pH, y en el tercer ciclo conforme disminuye el pH presenta el mismo fenómeno, esta disminución podría estar relacionada con la acumulación de ácidos orgánicos producidos por el hongo durante su metabolismo, o con cambios en la composición del sustrato debido a su reutilización. lo que sugiere que los cambios en el pH afectan la producción.



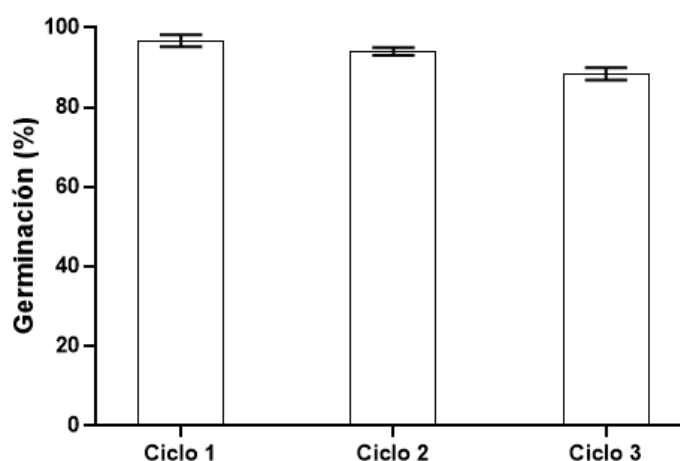
Gráfica 23. ○ Producción de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (con/gssi), y □ pH al momento de extracción en cada ciclo (eje secundario derecho)

9.4.4 Germinación

Los valores de germinación en los conidios obtenidos en los tres ciclos, de acuerdo con los parámetros de calidad que establecen Jenkins y Grzywacz. (2000); se encontraron por arriba del mínimo. El primer ciclo tuvo un 96.67 ± 1.53 % de germinación, el segundo tuvo una ligera disminución, (94.0 ± 1.00 %),

y el último ciclo presentó un 88.3 ± 1.53 % de germinación, menor con respecto a los anteriores ciclos (Gráfica 24).

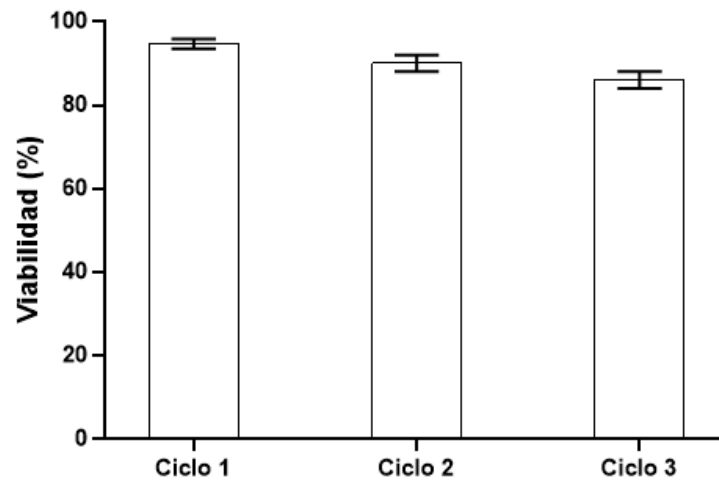
Aún con esta disminución, lo obtenido es comparable a los resultados reportados por Silva *et al.* (2018 y 2023), reportaron valores de germinación del 95% después de 16 h de incubación con un fotoperiodo de 12 h. Mascarin *et al.* (2013) en medio agar-agua (1 %p/v) obtuvieron valores en todos sus aislados (incluida *B. bassiana*) superiores al 95%. Aunque los niveles de producción en el último ciclo fueron menores a los primeros dos, la calidad en cuanto a la germinación es aceptable, a diferencia de con *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-3030 en el último ciclo logrado, puesto que situó por debajo de este parámetro, sugiriendo que la reutilización afecta de distinta manera a cada género en cuanto a su producción y calidad de conidios.



Gráfica 24. Porcentaje de germinación a lo largo de tres ciclos sucesivos de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431

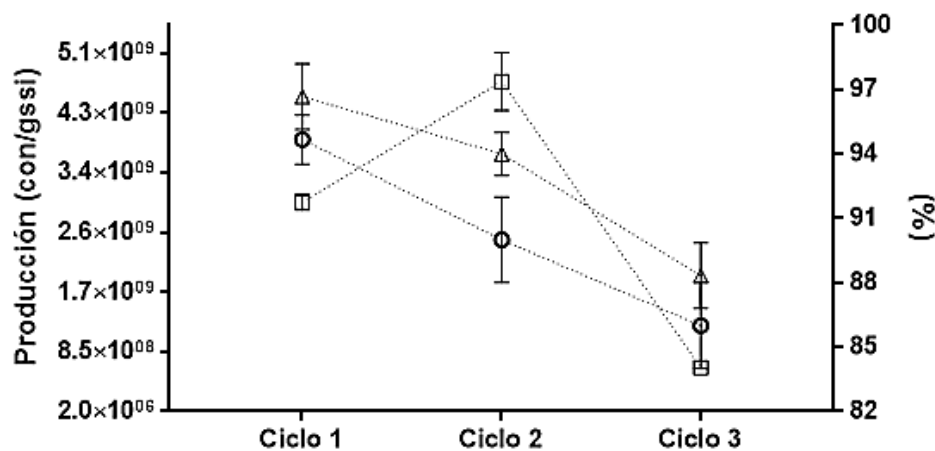
9.4.5 Viabilidad

La viabilidad de los conidios cosechados en los tres ciclos se encuentra por arriba de los parámetros de calidad mínimos establecidos en Jenkins y Grzywacz. (2000); de hecho, en el primer ciclo la viabilidad alcanzó 94.7 ± 1.15 %, para el segundo hubo una disminución a un 90 ± 2.00 %, y el tercer ciclo alcanzó 86.0 ± 2.00 %. La causa de la disminución puede ser por un agotamiento de las reservas nutricionales que contienen los conidios, en este sentido se ha documentado que la edad del cultivo o de los conidios ya cosechados afecta los parámetros de calidad (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017). García Valdés. (2023), en cultivos sucesivos con *Metarhizium robertsii* Xoch-8.1, durante cuatro ciclos la viabilidad de los conidios cosechados fue al menos de 98%, es decir, dependiendo del género del hongo, la reutilización puede afectar la capacidad para generar conidios a lo largo de cultivos consecutivos.



Gráfica 25. Porcentaje de viabilidad a lo largo de tres ciclos sucesivos de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431

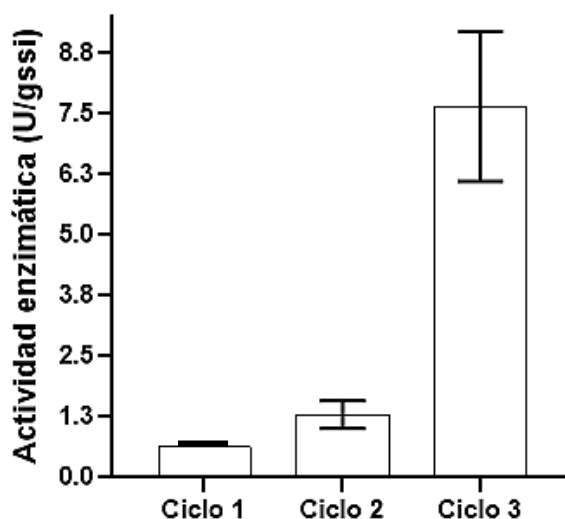
La posible relación entre estos dos parámetros de calidad (germinación y viabilidad) se presenta en el Gráfica 26, donde en ambos casos a partir del segundo ciclo disminuye significativamente con respecto al primer ciclo. No obstante, la calidad en los tres ciclos se considera aceptable y la alta producción de conidios podría compensar esta baja principalmente en el último ciclo, sin embargo, se debe valorar factores como el tipo de sustrato, los cambios en este, o la actividad de agua de cada ciclo que puede repercutir para mantener la calidad en valores aceptables (Viabilidad: 85% y Germinación: 85%) como lo establece Jenkins & Grzywacz. (2000).



Gráfica 26. □ Producción de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (con/gssi), y valores porcentuales para Δ germinación y ○ viabilidad (eje secundario derecho) en cada ciclo

9.4.6 Producción de Amilasas

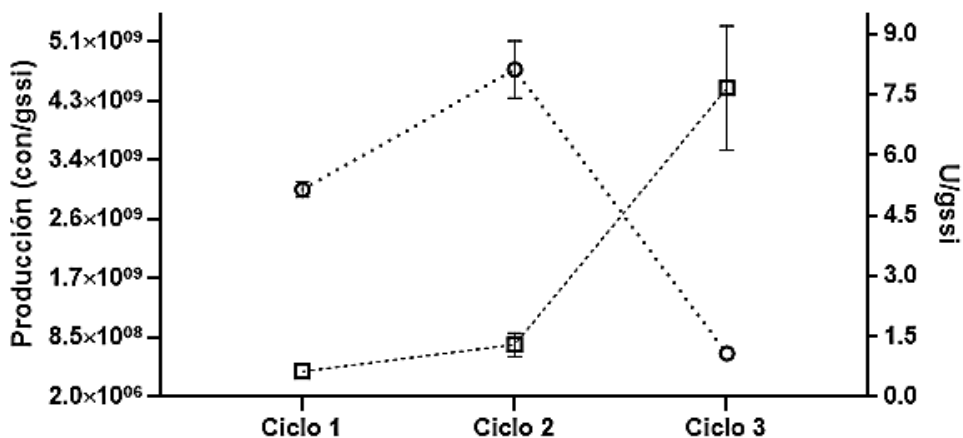
A diferencia de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303, la mayor producción de amilasas se obtuvo en el último ciclo con 7.66 ± 1.54 U/gssi. En contraste, al finalizar el primer ciclo la producción sólo alcanzó 0.63 ± 0.00 U/gssi, y en el segundo tuvo un ligero aumento, pero no fue significativo y llegó a 1.3 ± 0.29 U/gssi (Gráfico 29). Amobonye *et al.* (2020), con *Beauveria spp.* MTCC 5184 produjo 50 IU/g de amilasa en condiciones de FES, mientras que *Beauveria bassiana* SG8702 logró una actividad de 1.3 U/g en fermentación sólida. Díaz Javier (2024) evaluó la producción de amilasas a lo largo de 3 ciclos sucesivos en arroz precocido con *Trichoderma harzianum*, obteniendo valores de máximos producción en el primer ciclo de 8.5 U/gssi, en el segundo ciclo de 50.3 U/gssi, y en el tercer ciclo de 44.05 U/gssi. Esto muestra que *T. harzianum* produce cantidades mucho más elevadas de amilasas, lo que conduce a una rápida degradación del arroz, como lo observó García-Valdés (2023), en este caso con *T. asperellum* Th-T4, en donde el sustrato después del segundo ciclo no se encontraba en condiciones adecuadas para su reutilización.



Gráfica 27. Actividad enzimática de amilasas (U/gssi) al final de cada extracción en tres ciclos sucesivos de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431

La diferencia de producción de amilasas de *B. bassiana* es un hallazgo interesante, dado que la producción aumentó de manera progresiva con los ciclos, al contrario de disminuir como fue con *C. javanica*. Incluso no se puede definir una relación con los niveles de producción obtenidos para *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (Gráfica 28) como se tenía planteado, donde a una mayor producción de amilasas resultaría en una mayor producción de conidios, siendo este el caso contrario en el cual los dos primeros ciclos con mayor crecimiento no presentaron la mayor producción de amilasas totales, y el último ciclo, con el menor registró de amilasas.

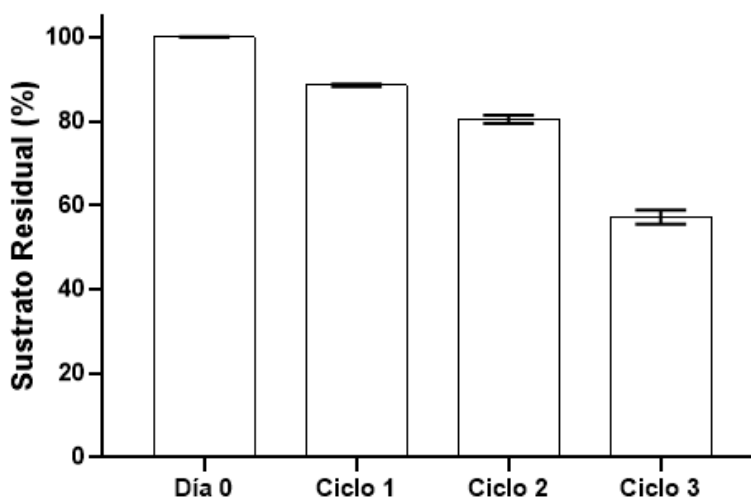
Finalmente hecho de que el último ciclo mostrara el mayor registro de amilasas a pesar de ser el ciclo con menor producción de conidios, podría ser consecuencia de la formación de las biopelículas alrededor de los granos, que estén dificultando la penetración de estas enzimas en los granos.



Gráfica 28. ○ Producción de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 (con/gssi), y □ actividad enzimática de amilasas (eje secundario derecho) en cada ciclo

9.4.7 Pérdida de Peso Seco

En el Gráfica 29, se presenta la pérdida de peso seco, como sustrato residual, a lo largo de los tres ciclos, donde en el primero se perdió un promedio de 11.57 ± 0.67 % del sustrato inicial, en el segundo ciclo la pérdida de sustrato fue ya del 15.73 ± 0.06 %, para el último ciclo fue del 42.7 ± 1.71 %. Es decir, el hongo utilizó casi la mitad del sustrato inicial a lo largo de los tres ciclos para su crecimiento. Este comportamiento se observó también con García-Valdés (2023) en los dos ciclos sucesivos donde reutilizó el arroz con *Trichoderma asperellum* Th-T4 describe que se pierde casi la mitad (49.24 %) del sustrato inicial. Esto nos sugiere que gran parte del sustrato consume, no únicamente en la producción de conidios, también puede ser en liberación CO₂, o el mismo manejo del sustrato a lo largo de los ciclos.



Gráfica 29. Sustrato residual a lo largo de 3 ciclos sucesivos con *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431

9.4.8 Zimogramas

Se realizaron distintas pruebas en las muestras obtenidas dentro de los zimogramas, en la Figura 15 se observa una de ellas donde se colocaron cuatro muestras obtenidas de distintas unidades experimentales (arroz, avena, arroz: avena) al extracto crudo enzimático se le realizó una medición de azúcares reductores para corroborar que las concentraciones tuvieran un valor mínimo de 1 U/mL de amilasas totales (recuadros rojos).

Además, se colocaron 15 μ L de amilasa comercial a dos concentraciones 0.5 U/mL y 1 U/mL respectivamente como control positivo (recuadro amarillo). Se observa que, las 4 muestras se quedaron arriba, puede ser debido a una aglomeración ocasionada entre las amilasas u otras proteínas producidas por el hongo.

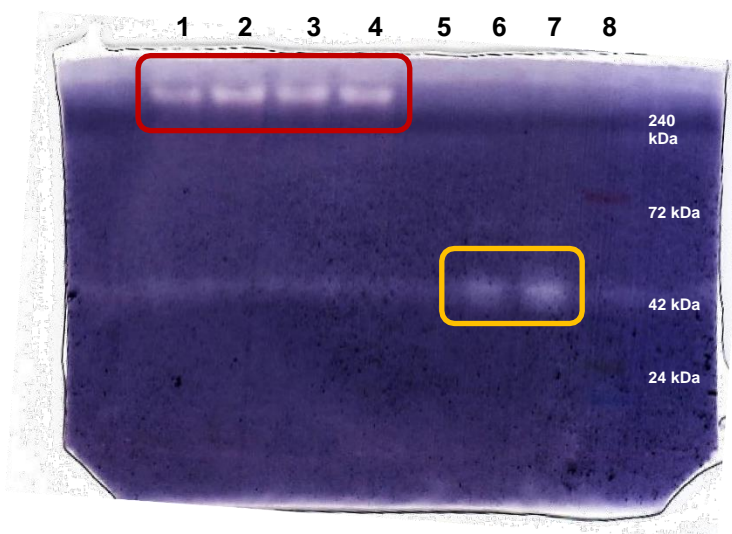


Figura 15. Visualización de 4 muestras extraídas de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB 431 (1. Muestra de arroz: avena (0.71 U/mL \equiv 0.047 mU/pozo); 2. Muestra de avena (0.8 U/mL \equiv 0.054 mU/pozo); 3 y 4. Muestras de arroz (0.92 U/mL \equiv 0.061 mU/pozo, 1.01 U/mL \equiv 0.068 mU/pozo respectivamente); 5. Control negativo (agua); 6 y 7. Controles positivos (0.5 U/mL \equiv 0.033 mU/pozo, 1 U/mL \equiv 0.067 mU/pozo respectivamente); 8. Marcador de proteínas

Para descartar la presencia de agregados en la muestra, se realizaron modificaciones en una de las cuatro muestras originales. Se agregaron distintos volúmenes de β -mercaptoetanol con el objetivo de romper puentes disulfuro quizás presentes en la muestra (0.5 μ L, 1.5 μ L y 5 μ L) al amortiguador de la muestra. De la misma manera, se separaron 50 μ L de la muestra y se sometieron a calentamiento a 80 $^{\circ}$ C en tres microtubos Eppendorf de 1 mL, durante distintos tiempos (0.5 min, 1.5 min y 5 min, respectivamente). Se utilizaron dos controles: uno positivo (recuadro amarillo), con amilasa comercial, y otro siendo la muestra original sin β -mercaptoetanol ni ser sometida a ningún calentamiento (recuadro azul) (Figura 15)

La adición de β -mercaptoetanol en diferentes volúmenes no afectó la muestra (recuadro verde), la cual permaneció en la parte superior del gel. Por otro lado, el calentamiento provocó la pérdida de actividad enzimática y la desnaturalización de la muestra (recuadro rosa) (Figura 16).

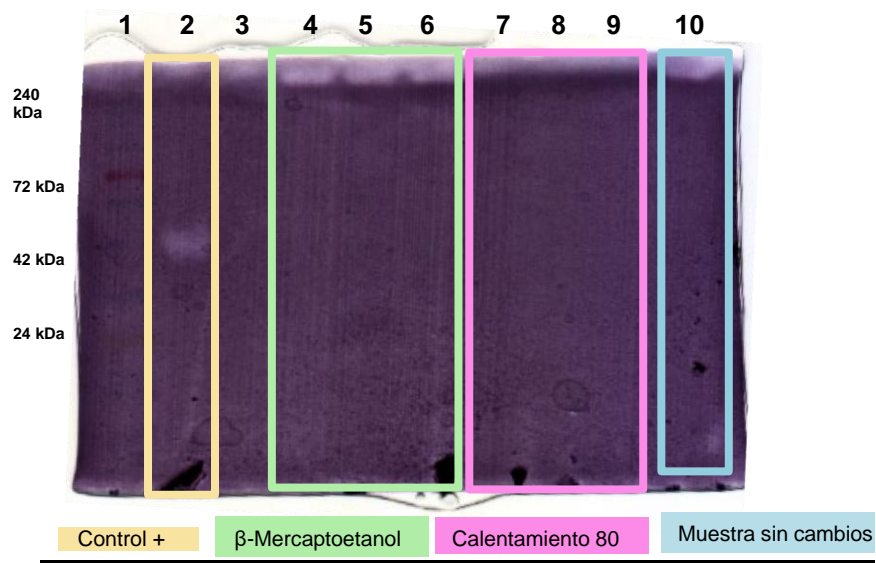


Figura 16. Visualización de una muestra de extraída de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB 431 en arroz (1.01 U/mL \equiv 0.068 mU/pozo) con distintos tratamientos (1. Marcador de proteínas; 2. Control positivo (α -Amilasa); 3. Control negativo (agua); 4. Muestra con 0.5 μ L de β -mercaptoetanol; 5. Muestra con 1.5 μ L de β -mercaptoetanol; 6. Muestra con 5 μ L de β -mercaptoetanol; 7. Muestra con 0.5 min de calentamiento; 8. Muestra con 1.5 min de calentamiento; 9. Muestra con 5 min de calentamiento; 10. Muestra sin ningún tratamiento)

La adición de β -mercaptoetanol en diferentes volúmenes no afectó el patrón de corrimiento de la muestra, además el calentamiento eliminó por completo la actividad enzimática. Por lo anterior, se optó por probar la adición de Dithiothreitol (DTT) en dos distintos volúmenes (3 μ L y 5 μ L en 100 μ L del amortiguador de muestra) y calentando la muestra a 50 °C por 1.3 min y 60 °C por 50 s (en estas temperaturas y tiempos se corroboró que no se pierde actividad enzimática); sin embargo, las muestras siguieron presentándose en la parte superior del gel (Figura 17).

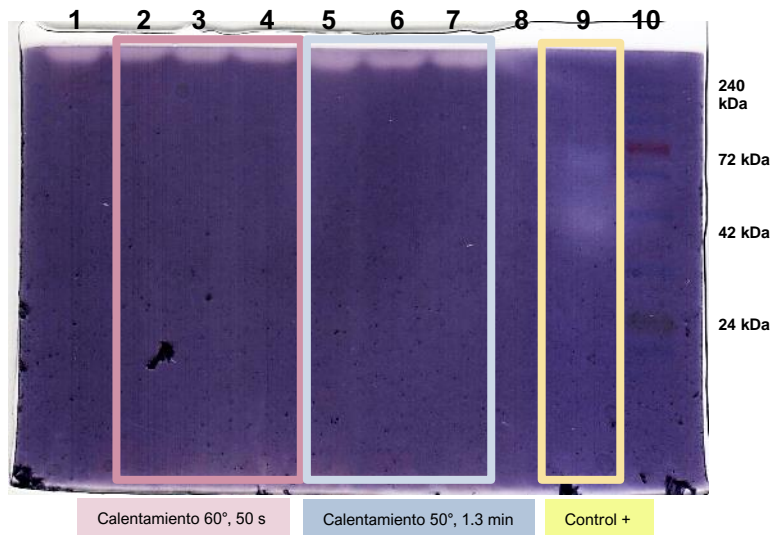


Figura 17. Visualización de muestra extraída de arroz (1.97 U/mL \equiv 0.131 mU/pozo; 1er Ciclo de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431) con DTT y calentamiento [1. 5 μ L DTT, sin calentamiento; 2. 5 μ L DTT; 3. 3 μ L DTT; 4. s/ DTT; 5. 5 μ L DTT; 6. 3 μ L DTT; 7. s/DTT; 8 Control negativo (agua); 9. Control positivo (α -Amilasa); 10. Marcador de proteínas]

finalmente después de todos los cambios con agentes químicos y físicos, sin obtener algún cambio se realizó un zimograma revelado mediante la solución de Lugol correspondiente a las muestras enzimáticas extraídas en los tres ciclos sucesivos de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 sin algún tratamiento, en contraste con el mismo gel que posteriormente se reveló utilizando tinción de plata, y las bandas en las líneas 4, 6 y 8 corresponden a las muestras desnaturalizadas con un calentamiento a 80°C por 5 min (Figura 18)

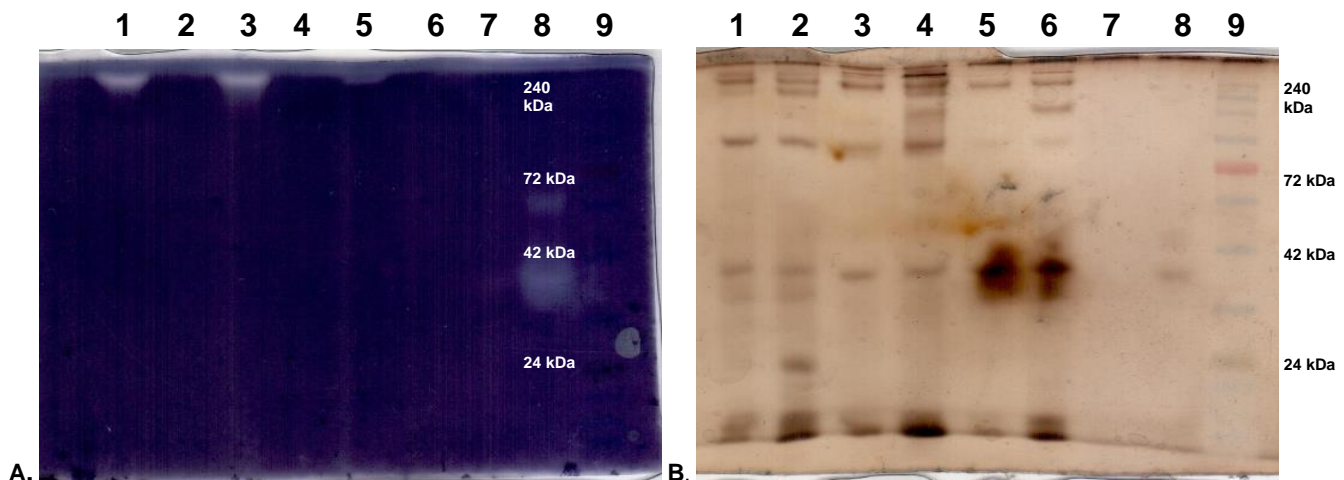


Figura 18. A. Zimograma revelado con solución de Lugol, **B.** Zimograma revelado por medio de tinción con plata, a cada pozo se le agregaron 15 μ L de la muestra: 1. Muestra ciclo 3 (10.82 U/mL \equiv 0.721 mU/pozo); 2. Muestra ciclo 3 desnaturalizada; 3. Muestra ciclo 2 (7.7 U/mL \equiv 0.513 mU/pozo); 4. Muestra ciclo 2 desnaturalizada; 5. Muestra ciclo 1 (1.97 U/mL \equiv 0.131 mU/pozo); 6. Muestra ciclo 1 desnaturalizada; 7. Control negativo (agua); 8. Control positivo (α -Amilasa, 2.5 U/mL \equiv 0.167 mU/pozo); 9. Marcador de proteínas.

Las amilasas se encuentran clasificadas bajo los siguientes números EC 3.2.1.1-3.2.1.3 según la Comisión Internacional de Enzimas. En la base de datos BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/index.php>), se encontraron enzimas clasificadas bajo el número EC 3.2.1. (Enzimas que rompen enlaces glucosídicos) para *Beauveria bassiana*, pero ninguna reportada específicamente para amilasas.

Si bien, Saranraj & Stella. (2013) reportan que los pesos moleculares de las amilasas varían según el organismo de aproximadamente 10 a 210 kDa. Ejemplo de ello es que Arunachallam *et al.* (2023) reportaron el peso molecular de una α -amilasa producida extracelularmente por *Aspergillus tamarii* MTCC5152 de aproximadamente 31 kDa, en el caso de Li *et al.* (2023) con *Ascospaera apis*, reportaron el peso molecular aproximado de una α -amilasa purificada y producida en medios sumergidos de 75 kDa. Valores distintos a los visualizados en nuestro gel, donde la muestra obtenida en los distintos ciclos está por arriba de los dos anteriores pesos moleculares mencionados en estudios para hongos, podría estimarse por arriba de los 240 kDa. Estos resultados aún dejan incógnitas que precisan más estudios para determinar si lo observado en el gel se debe a la hidrólisis del almidón presente, por las muestras de amilasas totales en cada ciclo con un peso molecular más alto de los ya registrados.

10. RESUMEN DE RESULTADOS

10.1 *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303

- La evaluación en los tres sustratos utilizados, el arroz presentó valores de producción significativamente mayores de $5.7 \times 10^8 \pm 4.37 \times 10^7$ con/gssi en el día 7, y $3.21 \times 10^8 \pm 5.34 \times 10^7$ con/gssi en el día 10 comparado en esos días con la avena y la mezcla. Para el día 14 los valores fueron similares para el arroz ($2.60 \times 10^8 \pm 2.15 \times 10^7$ con/gssi), avena ($2.21 \times 10^8 \pm 1.83 \times 10^7$ con/gssi) y la mezcla ($2.11 \times 10^8 \pm 7.07 \times 10^7$ con/gssi). Por lo que se optó en seleccionar al arroz como sustrato para realizar ciclos sucesivos en la producción de conidios de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-303.
- Se lograron 4 ciclos sucesivos con una producción acumulado de 5.38×10^9 con/gssi. En el segundo ciclo se obtuvo la mayor producción de $2.48 \times 10^9 \pm 2.42 \times 10^8$ con/gssi; sin embargo, a partir del tercer ciclo se observó una disminución en la producción de conidios. Comparando los resultados con otros estudios del mismo género la producción acumulada, en algunos casos fue mayor a los reportados, destacando la eficacia de la reutilización del sustrato.
- En cuanto a los cambios en el pH a lo largo de los ciclos, se inició con un valor de 5.6 ± 0.05 el día de la inoculación y a partir del primer ciclo disminuyó, manteniéndose alrededor de 4.5 hasta el final de los cuatro ciclos. Algunos estudios reportan valores óptimos de pH para el crecimiento de *Cordyceps javanica* entre 6 y 9, lo cual podría ser considerado para mejorar la producción en experimentos futuros.
- Se inició con una humedad del 19.83 ± 0.23 % y fue aumentando progresivamente en cada ciclo, finalizando con un 57.02 ± 0.75 %. La relación con los niveles de producción de conidios se observó cuando alcanzó su máximo en el segundo ciclo ($2.48 \times 10^9 \pm 2.42 \times 10^8$ con/gssi) con una humedad final del 37.85 ± 1.19 %. A partir del tercer ciclo, disminuyó la producción y las humedades fueron superiores al 40%. Esto coincide con algunos estudios donde reportan un rango de humedad óptimo dependiendo del sustrato para *Cordyceps spp.*
- Los valores de germinación se mantuvieron superiores al 85% durante los tres primeros ciclos, a partir del cuarto ciclo descendió 76.3 ± 1.15 %. En el caso de la viabilidad los dos primeros ciclos, superaron los estándares de calidad con valores superiores al 85%. En el tercer y cuarto ciclos, la viabilidad se redujo a 77.3%, coincidiendo con la disminución en la germinación sobre todo en el cuarto ciclo, de acuerdo con estudios el agotamiento del sustrato o cambios en la cepa podrían explicar esta reducción.

- El sustrato remanente después de los 4 ciclos fue del 61%. Esta disminución gradual del sustrato se puede adjudicar al consumo por parte del hongo durante su crecimiento y esporulación, la producción de CO₂, o bien durante el proceso de extracción. Aunque el sustrato aún presentaba condiciones adecuadas para continuar con más ciclos, la disminución en la producción y la calidad de los conidios podría sugerir que cuatro ciclos representan el límite para que el hongo pueda seguir aprovechando nutrientes aún presentes en el sustrato residual.
- La mayor producción de amilasas totales fue en el primer ciclo con 1.03 ± 0.04 U/gssi, a partir del segundo ciclo hasta el cuarto fueron valores menores a 0.6 U/gssi. No se lograron detectar isoformas de las amilasas por medio de los zimogramas debido a la poca concentración obtenida para el mínimo de 0.033 mU/pozo.

10.2 *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431

- De la igual manera que con *C. javanica*, se evaluó los niveles de producción obtenidos en los tres sustratos distintos, donde el arroz nuevamente presentó una producción de conidios mayor de $1.29 \times 10^9 \pm 2.49 \times 10^8$ con/gssi en el día 7 y $1.65 \times 10^9 \pm 8.15 \times 10^7$ con/gssi en el día 14, en comparación con la avena y la mezcla en esos mismos días. Para el día 10 los valores fueron similares para el arroz ($1.16 \times 10^9 \pm 1.32 \times 10^8$ con/gssi), y la mezcla ($1.12 \times 10^9 \pm 7.28 \times 10^8$ con/gssi).
- Se obtuvo una producción acumulada de 8.3×10^9 con/gssi con 3 ciclos sucesivos. En el segundo ciclo se obtuvo los mayores niveles de producción con $4.7 \times 10^9 \pm 4.11 \times 10^8$ con/gssi. A pesar de que en el tercer ciclo se observó una disminución, la producción acumulada fue mayor comparado con algunos de los resultados referenciados en otros estudios que utilizaron distintos sustratos o métodos de fermentación.
- En cuanto al pH se inició con un valor de pH de 5.87 ± 0.04 , y se mantuvo relativamente estable hasta el segundo ciclo, donde aumentó a un valor de 7.03 ± 0.16 , al igual que, la producción ($4.7 \times 10^9 \pm 4.11 \times 10^8$ con/gssi). Para el tercer ciclo el valor de pH disminuyó drásticamente a 4.68 ± 0.02 , así como la producción ($6.24 \times 10^8 \pm 5.50 \times 10^7$ con/gssi). Los resultados sugieren una relación entre los valores de pH en el sustrato y la producción de conidios.
- La humedad inicial del sustrato fue del 24.6 ± 0.23 % y aumentó en cada uno de los ciclos finalizando con un 40 ± 0.50 %, a pesar de encontrarse dentro de los rangos reportados para una producción de conidios de *B. bassiana*, no fue la ideal para poder mantener los niveles de producción hasta el último ciclo.

- Los valores de germinación y viabilidad de los conidios obtenidos a lo largo de los tres ciclos se encontraron por encima de los mínimos establecidos (85%), aunque se observó una ligera disminución en cada ciclo, se cumplen los parámetros de calidad establecidos en la literatura.
- El sustrato remanente después de los 3 ciclos fue del 57%, en este caso fue notoria la degradación del sustrato conforme pasaba cada ciclo.
- Caso contrario a *C. javanica*, la producción de amilasas totales fue aumentando con cada ciclo, siendo el tercer ciclo donde se obtuvo la mayor producción (7.66 ± 1.54 U/gssi), y el primero con la menor (0.63 ± 0.00 U/gssi). Se obtuvo la concentración mínima de mU/pozo para poder visualizar bandas de amilasas totales en cada ciclo en zimogramas, sin embargo, las muestras se encontraron por encima con un peso molecular de aparente mayor a 240 kDa, aun agregando agentes reductores para eliminar cualquier supuesta aglomeración entre ellas, que impidiera el recorrido de la muestra a lo largo del gel, la posición de las bandas siguió estando por arriba de ese peso molecular.

11. CONCLUSIÓN

El arroz se seleccionó como el sustrato más adecuado para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* CHE-CNRCB-431 y *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB-301, logrando 3 y 4 ciclos sucesivos respectivamente. Bajo las condiciones ensayadas, cada uno de estos hongos fue capaz de utilizar entre el 39 y 43% del sustrato inicial durante su crecimiento, respectivamente. La producción de conidios acumulada a lo largo de ciclos sucesivos para *C. javanica* fue de 5.38×10^9 con/gss y para *B. bassiana* de 8.3×10^9 con/gss, valores superiores a los reportados con el uso único de sustrato en estos hongos. El pH y la humedad se identificaron como factores que pueden estar influyendo en la producción y podrían modificarse a futuro para optimizar ciclos de producción. En el caso de los perfiles de amilasas en el momento de las cosechas no mostraron una relación directa con la producción de conidios en ambos hongos. Sin embargo, se logró detectar una posible isoforma de amilasa de alto peso molecular en *B. bassiana* con los zimogramas. Finalmente, la calidad de los conidios fue aceptable en los 3 ciclos de *B. bassiana* y en los tres primeros de *C. javanica*.

12. PERSPECTIVAS

Si bien la producción acumulada en ambos hongos fue favorable comparado con el uso único de algún sustrato, se pueden modificar variables para aumentar la producción y mantener los parámetros de calidad, como modificar a lo largo de los ciclos el pH en el momento de la extracción para mantenerlo en valores convenientes para reiniciar un cultivo utilizando soluciones amortiguadoras.

La humedad también se podría modificar, ya sea agregando sustrato nuevo estéril o algún texturizante, que evite aglomeraciones entre el sustrato y permita que el hongo tenga más área superficial para adherirse; especialmente cuando se llega al último ciclo donde se pueda el aumentar o mantener la producción de conidios es crucial. Así como el uso de residuos agrícolas como cosustrato no solo reducirían el impacto ambiental y posibles costos asociados en la producción de HE, sino que también contribuirían para el beneficio de bioplaguicidas más eficaces y consistentes.

Aún queda la incógnita del papel que puedan tener las amilasas a lo largo de los ciclos en el periodo de incubación de cada uno, convendría probar una metodología que permitiera hacer un seguimiento a lo largo de los días. Con ellos se identificarían las enzimas en diferentes etapas del cultivo, incluso por medio de una espectrometría de masas se daría una perspectiva más completa del papel tanto de las amilasas como de otras enzimas en la degradación del sustrato, en este caso el arroz, y la producción de conidios.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta Ovallos, A. (2019, June 28). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. Repositorio Universidad De Santander. <https://repositorio.udes.edu.co/entities/publication/a97bbfcf-a8da-4a4e-9399-fe792ddcc345>
- Adnan, M., Ashraf, S. A., Khan, S., Alshammari, E., & Awadelkareem, A. M. (2017). Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6133553>
- Aguilera Carbó, A. F. (2009). Producción de ácido elálgico: Estudios enzimáticos. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa]
- Aher, S., Bhaveshananda, S., & Sengupta, B. (2012). Organic agriculture: Way towards sustainable development. <https://www.semanticscholar.org/paper/Organic-agriculture%3A-Way-towards-sustainable-Aher-Bhaveshananda/4a2d91f181d0a27115055b94fe3ce86447bc236a>
- Ali, S., Zhang, C., Wang, Z., Wang, X., Wu, J., Cuthbertson, A. G. S., Shao, Z., & Qiu, B. (2017). Toxicological and biochemical basis of synergism between the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* and the insecticide matrine against *Bemisia tabaci* (Gennadius). Scientific Reports, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep46558>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Pandey, A., Singh, S., & Pillai, S. (2020). Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. Critical Reviews in Biotechnology, 40(7), 1019–1034. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805403>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2021). *Beauveria bassiana* Xylanase: Characterization and Wastepaper Deinking Potential of a Novel Glycosyl Hydrolase from an Endophytic Fungal Entomopathogen. Journal of Fungi, 7(8), 668. <https://doi.org/10.3390/jof7080668>
- Andrades, A., & Contreras, L. M. (2017). Amylase Zymography. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1626, 301–308. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7111-4_29
- Ansari, M., & Butt, T. (2011). Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. Journal of Applied Microbiology, 110(6), 1460–1469. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04994.x>
- Arunachallam, P., Kumaravel, V., & Gopal, S. R. (2023). Purification and biochemical characterization of α - amylase from *Aspergillus tamarii* MTCC5152. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 54(3), 444–453. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2235694>
- Awan, U. A., Meng, L., Xia, S., Raza, M. F., Zhang, Z., & Zhang, H. (2021). Isolation, fermentation, and formulation of entomopathogenic fungi virulent against adults of *Diaphorina citri*. Pest Management Science, 77(9), 4040–4053. <https://doi.org/10.1002/ps.6429>

- Bakr, E. M., Hassan, D. M. A., & Haron, E. N. (2024). Evaluation of some techniques for drying conidiated rice culture of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with a bioassay evaluating their eligibility. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 34(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00805-4>
- Bariş, C., & Er, M. K. (2021). *Beauveria bassiana* Konidilerinin Katı Faz Fermantasyonu ile Kitlesele Üretimi için Bazı Tahılların İncelenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım Ve Doğa Dergisi*, 24(6), 1263–1270. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogu.vi.828259>
- Barra-Bucarei, Lorena, Vergara, Pedro, & Cortes, Amparo. (2016). Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883 in different substrates. *Chilean journal of agricultural research*, 76(4), 448-454. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392016000400008>
- Bihal R, Al-Khayri JM, Banu AN, Kudesia N, Ahmed FK, Sarkar R, Abd-Elsalam KA (2023) Entomopathogenic fungi: an eco-friendly synthesis of sustainable nanoparticles and their nanopesticide properties. *Microorganisms* 11(6):1617. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061617>
- Biorad. (2023). Biorad silver stain kit user manual (Staining Manual Series, No. 10). <https://www.bio-rad.com/en-us/product/silver-stain-plus-kit?ID=02933b12-38b0-46d4-a9af-f0e96973c029>
- BRENDA Enzyme Database. (2024, May 21). <https://www.brenda-enzymes.org/>
- Cai, Q., Wang, J., Xie, J., & Jiang, D. (2024). Functional characterization of BbEaf6, a homolog of Eaf6 in *Beauveria bassiana*: Implications for fungal virulence and stress response. *Virulence*, 15(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2387172>
- Cando-Narvaez, A., Loera, O., & Méndez-Hernández, J. (2021). Rice recycling: a simple strategy to improve conidia production in solid-state cultures. *Letters in Applied Microbiology*, 74(3), 385–394. <https://doi.org/10.1111/lam.13614>
- Carrillo Sancén, G. (2017). Efecto de altas concentraciones de glucosa sobre la producción de amilasas y análisis del secretoma de *Aspergillus niger* en cultivo en medio sólido. [Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa]
- Carrillo-Rayas, M. T., & Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*, 19(2), 40–49. <https://doi.org/10.15174/au.2009.102>
- Composición química de los cereales. (16/06/2024) <http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas/index.php/que-son-los-cereales/composicion-quimica-de-los-cereales>
- Cristina, L. L. C., & Garcia, J. J. (2021). Bioensayos con entomopatógenos y uso de protocolos. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/149331>
- Da Cunha, L. P., Casciatori, F. P., Vicente, I. V., Garcia, R. L., & Thoméo, J. C. (2020). *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in

successive cultivations. *Process Biochemistry*, 97, 104-111. ISSN 1359-5113, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.002> .

- De Agricultura Y Desarrollo Rural, S. (27/06/2024). Propuesta de Estrategia Sectorial de Bioeconomía Agrícola para México. <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/propuesta-de-estrategia-sectorial-de-bioeconomia-agricola-para-mexico>
- De Jesús Cenobio-Galindo, A., Hernández-Fuentes, A. D., González-Lemus, U., Zaldívar-Ortega, A. K., González-Montiel, L., Madariaga-Navarrete, A., & Hernández-Soto, I. (2024). Biofungicides based on plant extracts: on the road to organic farming. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 6879. <https://doi.org/10.3390/ijms25136879>
- Dhar, N. P. and Kaur G. (2011). Response surface methodology for optimizing process parameters for the mass production of *Beauveria bassiana* conidiospores. *African Journal of Microbiology Research*, 5(17). <https://doi.org/10.5897/ajmr10.088>
- Dhungana, B., Ali, S., Byamukama, E., Krishnan, P., Wu, J., & Caffè-Tremli, M. (2019). Effects of temperature, water activity, and fungal isolate on ochratoxin A accumulation in oat grain inoculated with *Penicillium verrucosum* and development of a methodology to screen oat cultivars for ochratoxin A accumulation. *Cereal Chemistry*, 96(5), 950–957. <https://doi.org/10.1002/cche.10199>
- Díaz Javier, L. E. (2024). Determinación del perfil de producción de amilasas de *Trichoderma harzianum* durante su crecimiento en ciclos sucesivos de reciclaje de arroz. [Reporte en proceso. Proyecto de Investigación. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa]
- DIRECCIÓN GENERAL DE SANIDAD VEGETAL. (s.f.). Programa para el manejo del pulgón café de los cítricos. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Centro Nacional de Referencia de Control Biológico, México. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/hongos-entomopatogenos>
- Dojnov, B., & Vujčić, Z. (2012). Fast and reliable method for simultaneous zymographic detection of glucoamylase and α -amylase in fungal fermentation. *Analytical Biochemistry*, 421(2), 802–804. doi:10.1016/j.ab.2011.11.039
- FAOSTAT - Plaguicidas Uso. (03/04/2023). <https://www.fao.org/faostat/es/>
- Farazi, M., Houghton, M. J., Cardoso, B. R., Murray, M., & Williamson, G. (2024). Inhibitory effect of extracts from edible parts of nuts on α -amylase activity: a systematic review. *Food & Function*, 15(10), 5209–5223. <https://doi.org/10.1039/d4fo00414k>
- Fernandes, E. G., Valério, H. M., Feltrin, T., & Van Der Sand, S. T. (2012). Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 827–833. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822012000200049>
- Flórez-M., M. C., López-N., J. C., & Valencia-Jiménez, A. (2005). -Amylase activity from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* growing in liquid medium. *Revista Colombiana De Entomología*, 31(2), 123–126. <https://doi.org/10.25100/socolen.v31i2.9431>

- Gámez, L. a. R., Gandarilla-Pacheco, F. L., Blanco, M. G. M., Zapata, I. Q., Ramos, L. H. M., Alvarez, J. H. A., & Santos, M. E. (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. (hypocreales: Cordycipitaceae) en cultivo bifásico. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6182644>
- García Valdés, A. (2023). Producción a escala semipiloto de conidios usados en control biológico empleando una estrategia sencilla de reúso de sustrato. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa]
- George, J., Glover, J. P., Perera, O. P., & Reddy, G. V. P. (2024). Role of Endophytic Entomopathogenic Fungi in Mediating Host Selection, Biology, Behavior, and Management of Tarnished Plant Bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Plants*, 13(15), 2012. <https://doi.org/10.3390/plants13152012>
- Gutiérrez, Y., Alarcón, K. A., Ortiz, C., Santos-Holguín, J. M., García-Riaño, J. L., Mejía, C., Amaya, C. V., & Uribe-Gutiérrez, L. (2024). Isolation and characterization of a native strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for the control of the palm weevil *Dynamis borassi* (Coleoptera: Curculionidae) in the neotropics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04044-5>
- Hoang, C. Q., Dương, G. H., Trần, M. H., Vu, T. X., Tran, T. B., & Hằng, T. N. P. (2023). Molecular Mechanisms Underlying Phenotypic Degeneration in *Cordyceps militaris*: Insights from Transcriptome Reanalysis and Osmotic Stress Studies. *bioRxiv* (Cold Spring Harbor Laboratory). <https://doi.org/10.1101/2023.08.29.555252>
- Huang, Z., Ali, S., Ren, S., & Wu, J. (2010). Effect of *Isaria fumosoroseus* on mortality and fecundity of *Bemisia tabaci* and *Plutella xylostella*. *Insect Science*, 17(2), 140–148. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.01299.x>
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). (2018). Estudios sobre el uso de plaguicidas en México: Compilación 1980-2018. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141_2022_Estudios_plaguicidas_Mexico_1980-2018.pdf
- Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC). (junio, 2020). Perspectivas de las importaciones y exportaciones de plaguicidas en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/559746/PerspectivasImportacionesExportacionesPlaguicidas.pdf>
- Jaronski, S., & Mascarin, G. (2017). Mass production of fungal entomopathogens. In Elsevier eBooks (pp. 141–155). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803527-6.00009-3>
- Jwher, D., & Ezzulddin, T. (2022). Beneficial Microorganisms in Animal Production and environment. *Journal of Applied Veterinary Sciences/Journal of Applied Veterinary Sciences*, 0(0), 0. <https://doi.org/10.21608/javs.2022.137968.1147>
- Karthi, S., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Han, Y. S., Shivakumar, M. S., Murali-Baskaran, R. K., Kalaivani, K., Radhakrishnan, N., Park, K. B., & Malafaia, G. (2024).

Entomopathogenic fungi promising biocontrol agents for managing lepidopteran pests: Review of current knowledge. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, 103146. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103146>

- Keswani, C., Singh, H. B., Hermosa, R., García-Estrada, C., Caradus, J., He, Y., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Vinale, F., & Sansinenea, E. (2019). Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(23–24), 9287–9303. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10209-2>
- Kim, J. J., Xie, L., Han, J. H., & Lee, S. Y. (2014). Influence of Additives on the Yield and Pathogenicity of *Conidia* Produced by Solid State Cultivation of an *Isaria javanica* Isolate. *Mycobiology*, 42(4), 346–352. <https://doi.org/10.5941/myco.2014.42.4.346>
- Krishnamurthy R, Padma P, Dhandapani K (2020) Antagonistic efficiency of *Aspergillus giganteus* as a biocontrol agent against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* infecting maize. *J Pure Appl Microbiol* 14:527–539. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.55>
- Lara-Juache, H. R., Ávila-Hernández, J. G., Rodríguez-Durán, L. V., Michel, M. R., Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., Veana, F., Aguilar-Zárate, M., Ascacio-Valdés, J. A., & Aguilar-Zárate, P. (2021). Characterization of a Biofilm Bioreactor Designed for the Single-Step Production of Aerial Conidia and Oosporein by *Beauveria bassiana* PQ2. *Journal of Fungi*, 7(8), 582. <https://doi.org/10.3390/jof7080582>
- Larsen, A. E., Powers, L. C., & McComb, S. (2021). Identifying and characterizing pesticide use on 9,000 fields of organic agriculture. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25502-w>
- Li, C., Oh, S., Lee, D., Baik, H., & Chung, H. (2017). Effect of germination on the structures and physicochemical properties of starches from brown rice, oat, sorghum, and millet. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 931–939. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.123>
- Li, J., Liu, S., Yang, C., Keyhani, N. O., Pu, H., Lin, L., Li, X., Jia, P., Wu, D., Pan, J., Stevenson, P. C., Fernández-Grandon, G. M., Zhang, L., Chen, Y., Guan, X., & Qiu, J. (2023). Characterization of an α -Amylase from the Honeybee Chalk Brood Pathogen *Ascosphaera apis*. *Journal of Fungi*, 9(11), 1082. <https://doi.org/10.3390/jof9111082>
- Liu, Y., Yang, Y., & Wang, B. (2022). Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* play roles of maize (*Zea mays*) growth promoter. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19899-7>
- López Cruceño, B. (2016). Producción y formulación de conidios de hongos entomopatógenos aislados del territorio de la Ciudad De México [Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa]
- Lv, C., Jin, J., Wang, P., Dai, X., Liu, Y., Zheng, M., & Xing, F. (2019). Interaction of water activity and temperature on the growth, gene expression and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy and polished rice. *Food Chemistry*, 293, 472–478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.009>

- Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Mascarin, G. M., Kobori, N. N., Quintela, E. D., & Delalibera, I. (2013). The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. *Biological Control*, 66(3), 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.05.001>
- Maurya, D. P., Singh, D., Pratap, D., & Maurya, J. P. (2012). Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Journal of environmental biology*, 33(1), 5–8.
- Mejía Maldonado, C. N. (2018). Potenciación de conidios de *Beauveria bassiana* como principio activo de un bioplaguicida para el control de larvas de *Diatraea* spp. Tesis de grado de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Méndez-González, F., Castillo-Minjarez, J. M., Loera, O., & Favela-Torres, E. (2022). Current developments in the resistance, quality, and production of entomopathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03301-9>
- Méndez-González, F., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Favela-Torres, E. (2020). Forced aeration promotes high production and productivity of infective conidia from *Metarhizium robertsii* in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 156. <https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.bej.2020.107492>
- Merrill, C. R., Goldman, D., Sedman, S. A., & Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*, 211(4489), 1437–1438. <https://doi.org/10.1126/science.6162199>
- Miranda, A. V. C., Del Carmen Berrios Espejo, Y., Salas, J. L. T. F., Gonzales, H. H. S., Aguilera, J. G., & Martínez, L. A. (2021). Bioplaguicidas: Mecanismos de acción biocida en insectos plaga. *Research Society and Development*, 10(7), e42010716893. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16893>
- Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., & Loera, O. (2013). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Management Science*, 70(4), 661–666. <https://doi.org/10.1002/ps.3605>
- Montesinos-Matías, Roberto & Ayala-Zermeño, Miguel & Berlanga-Padilla, Angélica. (2015). Manual para la conservación y mantenimiento de hongos entomopatógenos (Manual for the conservation and maintenance of entomopathogenic fungi).
- Moo-Muñoz, A., Azorín-Vega, E., Ramírez-Durán, N., & Moreno-Pérez, P. (2020). Estado De La Producción Y Consumo De Plaguicidas En México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2). <https://doi.org/10.56369/tsaes.3225>
- Mora, M. C., De Castro, I. A., & Pedraza, M. C. E. (2023). Evaluación de técnicas para el

control biológico en cultivos agrícolas del municipio de Monterrey- Casanare, Colombia. revistas.eia.edu.co. <https://doi.org/10.24050/reia.v20i39.1621>

- Moreno, L. P., Abad, M. F., Villazón, C. O., & Barragán, J. C. A. (2011). Efecto de la variación del pH en un medio de cultivo a base de salvado de trigo para la producción de amilasa por *Paecilomyces lilacinus*. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/SCIENDO/article/view/543>
- Motta-Delgado, P. A., & Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. Revista Ambiente e Água, 6(2), 77–90. <https://doi.uam.elogim.com/10.4136/ambi-agua.187>
- Mousa, W., Ghazali, F. M., Jinap, S., Ghazali, H. M., & Radu, S. (2013). Modeling Growth Rate and Assessing Aflatoxins Production by *Aspergillus flavus* as a Function of Water Activity and Temperature on Polished and Brown Rice. Journal of Food Science, 78(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02986.x>
- Moussi, K., Azzouz, Z., Benhoula, M., Hamma, S., Boucherba, N., Benallaoua, S., Kernou, O., & Bettache, A. (2024). Enhanced protease production by *Aspergillus candidus* strain MKA05 using response surface methodology. Biomass Conversion and Biorefinery. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-06004-3>
- Muñoz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. World Journal of Microbiology & Biotechnology Incorporating the MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology/World Journal of Microbiology & Biotechnology, 33(3). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: Una Opción Para El Control Biológico De Plagas. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177003>
- Ordaz-Hernández, A., Montesinos-Matías, R., Mellín-Rosas, M. A., Pérez-Aguirre, T., Loera, O., & Angel-Cuapio, A. (2024). Improvement of the production and quality of *Cordyceps javanica* conidia for the control of *Diaphorina citri* adults. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 40(4). <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03922-2>
- Paiva-Guimarães, A. G. L., Freire, K. R. L., De Melo Santos, S. F., De Almeida, A. F., & De Sousa, A. C. B. (2020). Alternative substrates for conidiogenesis of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Brazilian Journal of Biology, 80(1), 133– 141. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.195711>
- Panwar, N., & Szczepaniec, A. (2024). Endophytic entomopathogenic fungi as biological control agents of insect pests. Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.8322>
- Park, S. E., Kim, J. C., Lee, S. J., Lee, M. R., Kim, S., Li, D., Baek, S., Han, J. H., Kim, J. J., Koo, K. B., Shin, T. Y., & Kim, J. S. (2018). Solid cultures of thrips-pathogenic fungi *Isaria javanica* strains for enhanced conidial productivity and thermotolerance. Journal of Asia-Pacific Entomology, 21(4), 1102–1109. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2018.08.005>

- Patindol, J. A., Siebenmorgen, T. J., & Wang, Y. (2014). Impact of environmental factors on rice starch structure: A review. *Starch - Stärke*, 67(1–2), 42–54. <https://doi.org/10.1002/star.201400174>
- Pesek, S., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2024). The Iodine/Iodide/Starch supramolecular complex. *Molecules*, 29(3), 641. <https://doi.org/10.3390/molecules29030641>
- Pham, T. A., Kim, J. J., & Kim, K. (2010). Optimization of Solid-State Fermentation for Improved Conidia Production of *Beauveria bassiana* as a Mycoinsecticide. *Mycobiology*, 38(2), 137. <https://doi.org/10.4489/myco.2010.38.2.137>
- Phan Nha Hoa, Ngo Duc Hoa, Tran Kim Diep, Pham Van Huyen¹, Truong Binh Nguyen (2023) The effects of temperature, pH, and media on mycelium growth of *Isaria tenuipes* (Peck.) Samson (DL0099) from Lang Biang Mountain, Lam Vien Plateau, Vietnam. *Asian Journal of Agriculture and Biology*. <https://doi.org/10.35495/ajab.2022.179>
- Powers, M. (2021). Food and the global political economy. *Ethics & International Affairs*, 35(1), 99-117. doi: <https://doi.org/10.1017/S0892679421000058>
- Ramirez, J. L., Muturi, E. J., Dunlap, C., & Rooney, A. P. (2018). Strain-specific pathogenicity and subversion of phenoloxidase activity in the mosquito *Aedes aegypti* by members of the fungal entomopathogenic genus *Isaria*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28210-6>
- Rashid, J. I. A., Samat, N., & Yusoff, W. M. W. (2011). Optimization of Temperature, Moisture Content and Inoculum Size in Solid State Fermentation to Enhance Mannanase Production by *Aspergillus terreus* SUK-1 using RSM. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14(9), 533–539. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2011.533.539>
- Reganold, J. P., & Wachter, J. M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature Plants*, 2(2). <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.221>
- Riaño, J. L. G., Barrera, G. P., Hernández, L. C., & Villamizar, L. F. (2024). Microsclerotia from *Metarhizium robertsii*: Production, ultrastructural analysis, robustness, and insecticidal activity. *Fungal Biology*, 128(2), 1643–1656. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.01.006>
- Rodríguez-Gámez, A., Gandarilla-Pacheco, F. L., Maldonado-Blanco, M. G., Quintero-Zapata, I., Morales Ramos, L. H., Alfaro Alvarez, J. H., & Elías-Santos, M. (2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) en cultivo bifásico. *Interciencia*, 42(11), 739-743.
- Saddam, B., Idrees, M. A., Kumar, P., & Mahamood, M. (2024). Biopesticides: Uses and importance in insect pest control: A review. *International Journal of Tropical Insect Science*. <https://doi.org/10.1007/s42690-024-01212-w>
- Sala, A., Barrena, R., Meyling, N. V., & Artola, A. (2023). Conidia production of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* using packed-bed bioreactor: Effect of substrate biodegradability on conidia virulence. *Journal of Environmental Management*, 341, 118059. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118059>

- Saldaña-Mendoza, S. A., Pacios-Michelena, S., Palacios-Ponce, A. S., Chávez-González, M. L., & Aguilar, C. N. (2023). *Trichoderma* as a biological control agent: mechanisms of action, benefits for crops and development of formulations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(10). <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03695-0>
- Saranraj, P., & Stella, D. (2013). Fungal amylase—a review. *International Journal of Microbiology Research*, 4(2), 203-211. DOI: 10.5829/idosi.ijmr.2013.4.2.75170
- Shahbaz, M., Palaniveloo, K., Tan, Y. S., Palasuberniam, P., Ilyas, N., Wiart, C., & Seelan, J. S. S. (2024). Entomopathogenic fungi in crops protection with an emphasis on bioactive metabolites and biological activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(7). <https://doi.org/10.1007/s11274-024-04022-x>
- Sharma, S., Kaur, S., Dar, B. N., & Singh, B. (2011). Storage stability and quality assessment of processed cereal brans. *Journal of Food Science and Technology*, 51(3), 583–588. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0537-3>
- Silva, J. D. N., Mascarín, G. M., Gomes, I. C. D. S., Tinôco, R. S., Quintela, E. D., Castilho, L. D. R., & Freire, D. M. G. (2018). New cost-effective bioconversion process of palm kernel cake into bioinsecticides based on *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2595–2606. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8805-z>
- St Leger, R. J., Screen, S. E., & Nelson, J. O. (1999). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. *Microbiology*, 145(10), 2691–2699. <https://doi.org/10.1099/00221287-145-10-2691>
- Stephan, D., Bernhardt, T., Buranjadze, M., Seib, C., Schäfer, J., Maguire, N., & Pelz, J. (2020). Development of a fluid-bed coating process for soil-granule-based formulations of *Metarhizium brunneum*, *Cordyceps fumosorosea* or *Beauveria bassiana*. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 307–320. <https://doi.org/10.1111/jam.14826>
- Upadhyay, M. K., Sharma, R., Pandey, A. K., & Rajak, R. C. (2006). An improved zymographic method for detection of amylolytic enzymes of fungi on polyacrylamide gels. *Mycologist*, 19(04), 138. <https://doi.org/10.1017/s0269915x05004015>
- Verduzco-Oliva, R., & Gutierrez-Urbe, J. A. (2020). Beyond enzyme production: solid state fermentation (SSF) as an alternative approach to produce antioxidant polysaccharides. *Sustainability*, 12(2), 495. <https://doi.org/10.3390/su12020495>
- Viswakethu, V., Ramasamy, V., Krishnamoorthy, S., Segar, T., Ramaraj, A., Kuttithodika, M. A., Narayanasamy, B., Balakrishnan, P., & Rajagopal, R. (2022). Effect of entomopathogenic fungi against banana pseudostem weevil *Odoiporus longicollis* (Olivier) and elucidation of infection process. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-022-00611-w>
- Wang, W., Wang, Y., Dong, G., & Chen, F. (2022). Development of *Cordyceps javanica* BE01 with enhanced virulence against *Hyphantria cunea* using polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.972425>

- Wen, T. C., Li, G. R., Kang, J. C., Kang, C., & Hyde, K. D. (2014). Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*. *Chiang Mai J. Sci.*, 41(4), 858-872.
- Xie, L., Han, J. H., Kim, J. J., & Lee, S. Y. (2016). Effects of culture conditions on conidial production of the sweet potato whitefly pathogenic fungus *Isaria javanica*. *Mycoscience*, 57(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.09.002>
- Xing, P., Diao, H., Wang, D., Zhou, W., Tian, J., & Ma, R. (2022). Identification, Pathogenicity, and Culture Conditions of a New Isolate of *Cordyceps javanica* (Hypocreales: Cordycipitaceae) From Soil. *Journal of Economic Entomology*, 116(1), 98–107. <https://doi.org/10.1093/jee/toac199>
- Ye, S. D., Ying, S. H., Chen, C., & Feng, M. G. (2006). New Solid-State fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*, 28(11), 799–804. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9004-z>
- Zaferanloo, B., Bhattacharjee, S., Ghorbani, M. M., Mahon, P. J., & Palombo, E. A. (2014). Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-55>
- Zampiroli, R., De Alvarenga, C. B., Vieira, B. S., Prado, J. R. D., Rinaldi, P. C. N., & Júnior, L. F. H. (2019). Effect of phytosanitary spray solution storage time on the viability of *Beauveria bassiana* conidia. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4955513>
- Zelaya-Molina, L. X., Chávez-Díaz, I. F., De Los Santos-Villalobos, S., Cruz-Cárdenas, C. I., Ruíz-Ramírez, S., & Rojas-Anaya, E. (2022). Control biológico de plagas en la agricultura mexicana. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 27, 69–79. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i27.3251>
- Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Fan, L., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2012, January 1). Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentation of wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. Document - Gale Academic OneFile. <https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA286971404&sid=sitemap&v=2.1&it=r&p=AONE&sw=w&userGroupName=anon%7E3420ee20&aty=open-web-entry>
- Zhao, X., Chai, J., Wang, F., & Jia, Y. (2023). Optimization of Submerged Culture Parameters of the Aphid Pathogenic Fungus *Fusarium equiseti* Based on Sporulation and Mycelial Biomass. *Microorganisms*, 11(1), 190. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010190>
- Zhu, F. (2017). Structures, properties, modifications, and uses of oat starch. *Food Chemistry*, 229, 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.064>
- Zhu, J., Ying, S., & Feng, M. (2016). The Pal pathway required for ambient pH adaptation regulates growth, conidiation, and osmotolerance of *Beauveria bassiana* in a pH-dependent manner. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(10), 4423–4433. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7282-5>

- Żołek-Tryznowska, Z., & Kałuża, A. (2021). The influence of Starch Origin on the properties of Starch Films: packaging performance. *Materials*, 14(5), 1146.
<https://doi.org/10.3390/ma14051146>



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00314

Matrícula: 2223801798

Reutilización de sustrato (arroz-avena) para la producción de hongos de *Beauveria bassiana* y *Cordyceps javanica*: efectos sobre la calidad y el rendimiento a lo largo de ciclos productivos.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 5 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. JOSE NORBERTO VASQUEZ BONILLA
- DR. SERGIO HUERTA OCHOA
- DR. RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO
- DR. CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: NADIA PAMELA PORRAS FAJARDO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:


Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



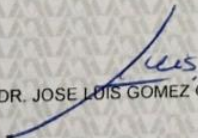

NADIA PAMELA PORRAS FAJARDO
ALUMNA

REVISÓ




MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. JOSE NORBERTO VASQUEZ BONILLA

VOCAL




DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL



DR. RAFAEL ALEJANDRO ANGEL CUAPIO

SECRETARIO



DR. CHRISTIAN JESUS MORA PEREZ