



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana**

*Unidad Iztapalapa*

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

**“CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE UNA CEPA SILVESTRE DE  
*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Y SU MUTANTE  
RESISTENTE A 2-DESOXIGLUCOSA”**

Para obtener el grado de:

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta

**Divanery Rodríguez-Gómez**

Director:

**Dr. Gustavo Viniegra González**

Julio de 2009

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **PFP-20-93**.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Enzimología y Biología molecular y la planta piloto de fermentación sólida del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Gracias por el financiamiento a la UAM-Iztapalapa y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del Proyecto SEP-2003-C02-42931.

Iztapalapa, D. F. a 14 de julio de 2009

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

**“Caracterización fisiológica de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* (Bals.)  
Vuill. y su mutante resistente a 2-desoxiglucosa”**

Presentada por

**Divanery Rodríguez Gómez**

**Comité Tutorial**

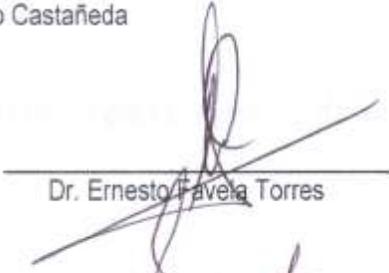
Director: Dr. Gustavo Viniegra González

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral

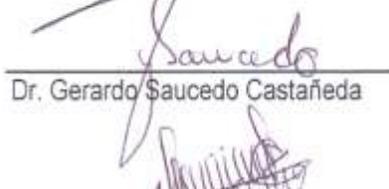
Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

**JURADO**

Presidente:

  
Dr. Ernesto Favela Torres

Secretario:

  
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Vocal:

  
Dr. Octavio Loera Corral

Vocal:

  
Dra. Raquel Alatorre Rosas

## Dedicatoria

Dedicada especialmente a mi...me lo merezco!

A mis padres, Ilse y y Ariel, por darme todo, por marcar el camino.

A Leyra Paola e Ivonne Carolina, por darme la fuerza y alegría para  
perseverar.

A mami Teresa, ejemplo de santandereana berraca.

## AGRADECIMIENTOS

Es más que un simple *GRACIAS*, va acompañado de todo mi cariño y respeto...

Ante todo a Dios, por la vida, el valor y la paz para estar hoy aquí. A mis padres, por su esfuerzo permanente, por el ejemplo y apoyo que me han dado siempre. A mis hermanas, por ser mi todo... lo saben. A mi familia, por quererme y animarme, siempre...chévere!, y a mi novio, por estar ahí, contagiarme su alegría y confianza, e impulsarme especialmente en los momentos más difíciles.

A México, sus instituciones y su gente, por la oportunidad y la solidaridad para mi desarrollo profesional. A todos mis maestros, por motivarme a continuar. A mis colegas del Laboratorio de enzimología y biología molecular, del edificio W, de la Planta piloto de fermentación sólida, y del Laboratorio de patología de insectos del Colegio de posgraduados; por la colaboración técnica en la realización de los experimentos, la retroalimentación, las conversaciones, sugerencias y la buena compañía para aligerar las jornadas de trabajo.

A los Doctores Gustavo Viniegra, Gerardo Saucedo y Octavio Loera, por creer en mí, por su paciencia, por su apoyo a pesar de las dificultades, por el privilegio de desarrollarme como investigadora a su lado, por sus enseñanzas como profesionales y como personas admirables.

A los Doctores Raquel Alatorre y Ernesto Favela, por la crítica oportuna, aguda y necesaria para este escrito y para mi formación.

A los Doctores: José Sepúlveda, Gerardo Gutiérrez, Irma Jiménez, Martha Rocha y Ariel Guzmán, por sus enseñanzas, colaboración constante y por el afecto.

A mis amigos, los de aquí, allá y acullá! ... porque siempre me alentaron para no desistir, creer en mí y culminar esta tesis. A todos, gracias por lo compartido durante estos años llenos de aprendizaje, por cruzarse en mi camino y aportar la terapia anti-estrés de sus palabras y sonrisas.

**DIVA**

## RESUMEN

Los hongos entomopatógenos permiten el control de los insectos que son plagas de cultivos de importancia económica, así como de insectos vectores de enfermedades de salud pública en humanos y animales de cría, de una manera ecológica, segura y económicamente viable. El potencial patógeno de estos hongos está dado por un conjunto de factores, entre los que se encuentra la velocidad de germinación, la producción de enzimas hidrolíticas degradadoras de la cutícula de los insectos, la velocidad de crecimiento y la producción de toxinas en el hemocele, entre otros.

En este trabajo se evaluaron los fenotipos presentados por dos cepas de *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), una cepa silvestre y la cepa mutante derivada de ésta, resistente al compuesto tóxico 2-desoxiglucosa. Se realizaron cultivos en cajas de Petri para evaluar las diferencias en la germinación, el crecimiento y la esporulación. También, se realizaron cultivos en medio sólido para estudiar las diferencias en la respirometría y en la producción de enzimas proteasas y hexosaminidasas. Finalmente, se evaluó la acción letal de ambas cepas sobre cultivos de larvas y adultos del coleóptero *Tenebrio molitor*.

Se observó que en condiciones de cultivo en medio sólido, las dos cepas presentaron un patrón respiratorio con dos fases bien definidas en todos los medios de cultivo estudiados: una de aumento exponencial y otra, de decaimiento exponencial, cada una con sus tasas específicas de respiración. La transición entre las dos fases fue abrupta y en el medio que contenía cutícula de chapulín, coincidió con el pico de la producción de proteasas (~50 h), además, la producción de hexosaminidasas se observó en una etapa posterior (~70 h) durante la fase final de su crecimiento.

Por otra parte, las dos cepas presentaron diferencias respiratorias importantes, como fue la mayor tasa residual de respiración de la cepa mutante (15 a 33%) con respecto a la silvestre en los medios que contenían fragmentos de exoesqueletos de chapulín y salvado de trigo. Además, la cepa mutante presentó dificultad en el uso de las fuentes nutricionales como la glucosa, la quitina coloidal y el sulfato de amonio, lo cual se evidenció por valores de tasa respiratoria en el punto de transición,  $rX_a$ , 38 a 56% menores, comparados con la cepa silvestre.

Asimismo, la resistencia a la 2-desoxiglucosa conferida por la mutación aquí estudiada, pareció estar ligada a una capacidad disminuida del uso de la glucosa, alteró la producción y/o excreción de las enzimas quitinolíticas pero no la actividad proteolítica. En el medio con quitina coloidal, glucosa y nitrato de sodio, la cepa mutante mostró el doble del rendimiento enzima: biomasa que en el medio con quitina coloidal, y contrario al comportamiento de la cepa silvestre. Esta observación está de acuerdo con la acción pleiotrópica de este tipo de mutaciones. A pesar de dichas diferencias fenotípicas, la virulencia de las dos cepas fue prácticamente la misma, tanto con larvas como adultos de *Tenebrio molitor*.

En el estudio de las secuencias de proteínas de los extractos de *B. bassiana* crecidas en medio sólido sobre cutícula de chapulín, se encontró una proteína tirosina fosfatasa no reportada en las bases de datos para este hongo, además de la expresión en CMS de las enzimas proteolíticas y quitinolíticas ya reportadas para este HE, pero en condiciones de cultivos sumergidos.

En cuanto al estudio comparativo de virulencia sobre larvas y adultos de *T. molitor*, las primeras resultaron mucho más resistentes que los adultos y el medio de dextrosa Sabouraud fue más efectivo como productor de esporas infectivas que los otros medios más complejos, que contenían como fuentes de carbono y nitrógeno quitina coloidal, cutícula de chapulín y salvado de trigo.

En conclusión: se propone que el estudio de la fisiología de la respiración, ligada a la síntesis de enzimas proteasas, durante la infección de *B. bassiana* puede ser un indicador de los cambios metabólicos y enzimáticos que influyen sobre su virulencia. Además, podría ser una metodología auxiliar para la selección y producción de estos organismos útiles para el control biológico.

## ABSTRACT

Entomopathogenic fungi allow in a green, safe and economically viable way, the control of the insects that are pests of crops with economical importance, as well as insects that are vectors of public health diseases in humans and livestock. The pathogenic potential of these fungi is given by a number of factors, such as the rate of germination, production of cuticle degrading enzymes, the growth rate and toxins production in the hemocele, among others.

In this work, we assessed the phenotypes presented by two strains of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales), a mutant type strain resistant to the toxic compound 2-deoxyglucose and the wild type strain from which it derived. Cultures were performed in Petri dishes to assess the differences in germination, growth and sporulation. In addition, solid state cultures were conducted in order to analyze the differences in respirometry and production of proteases and hexosaminidases. Finally, we evaluated the lethal action of both strains on larvae and adults of the beetle *Tenebrio molitor*.

It was observed from the solid state cultures that both strains showed a respiratory pattern with two well-defined phases in all the culture media studied: an exponential increase followed by an exponential decay, each one with its specific breathing rate. The transition between the two phases was abrupt, corresponded to the time  $t_a$ , which coincided with the peak of proteases production (~ 50 h) in the medium that contained grasshopper exoskeletons; as far as the hexosaminidases production is concerned, this was observed at a later stage (~ 70 h) during the final phase of its growth. Moreover, both strains showed respiratory significant differences, for instance, the mutant strain showed higher residual respiration rate,  $r'X_e$ , in the media containing fragments of grasshopper exoskeletons and wheat bran (15 to 33%) than the wild type strain. Furthermore, the mutant type strain had difficulty using simple sources as glucose, colloidal chitin and ammonium sulphate, which was evidenced by lower values of respiratory rate at the transition point  $rX_a$ , (38 to 56%), compared to the wild type strain.

In addition, the resistance to 2-deoxyglucose seemed to be linked to a diminished capacity in the use of glucose, and an alteration of the production and/or excretion of the chitinolytic enzymes, but the proteolytic activity was not altered. For the mutant type strain, in the medium with colloidal chitin, glucose and sodium nitrate, the yield enzyme: biomass was

twice of that observed in the medium that contained colloidal chitin, having an opposite behavior to the observed in the wild type strain. This analysis is consistent with the pleiotropic action of this kind of mutations. Despite these phenotypic differences, the virulence of both strains was virtually the same either on larvae or adults of *Tenebrio molitor*.

The study of the protein sequences in the extracts of *B. bassiana* grown on solid state culture on the grasshopper exoskeletons, showed the presence of a tyrosine phosphatase, which has not been reported in the databases for this fungus, as well as the expression in solid state conditions of chitinolytic and proteolytic enzymes, that have already been reported for this entomopathogenic fungi but in submerged cultures.

For the comparative study of virulence on larvae and adults of *T. molitor*, larvae showed to be much more resistant than adults; furthermore, Sabouraud dextrose medium was more effective as a producer of infective spores than others more complex media containing as carbon and nitrogen sources colloidal chitin, grasshoppers cuticle and wheat bran.

In conclusion, it is proposed that the study of the physiology of respiration, linked to the synthesis of protease enzymes, during the infection of *B. bassiana* may be an indicator of metabolic and enzymatic changes that influence on its virulence. In addition, this study could be considered as an auxiliary method for the selection and production of these useful organisms for biological control.

## TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
TABLA DE CONTENIDO	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
CLAVE DE MEDIOS DE CULTIVO	xviii
ABREVIATURAS	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS	xix
PARTE I, ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y ALCANCE DE LA TESIS	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	5
2.1 Control biológico (CB)	6
2.1.1 Agricultura orgánica	6
2.1.2 Manejo integrado de plagas (MIP) y control biológico (CB)	6
2.1.3 Manejo integrado de plagas en postcosecha	7
2.1.4 Insecticidas biológicos comerciales basados en hongos entomopatógenos	8
2.1.5 Ventajas y desventajas del uso de los hongos entomopatógenos (HE)	9
2.2 <i>Beauveria bassiana</i>	10
2.2.1 Generalidades acerca de los hongos entomopatógenos	10
2.2.2 Clasificación taxonómica	10
2.2.3 Características generales	11
2.2.4 Plagas susceptibles	12
2.2.5 Ciclo de vida	13
2.3 Características del proceso de infección de los hongos entomopatógenos	14
2.4 Factores de virulencia	17
2.4.1 Adhesión	17

2.4.2	Germinación	17
2.4.3	Formación del apresorio	19
2.4.4	Enzimas hidrolíticas	19
2.4.5	Evasión de la respuesta inmune	27
2.4.6	Toxinas	28
2.4.7	Esporulación de <i>Beauveria bassiana</i>	28
2.5	Crecimiento de los hongos	30
2.5.1	Proceso de crecimiento hifal	30
2.5.2	Morfometría de hongos filamentosos	32
2.5.3	Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>B. bassiana</i>	33
2.5.4	Crecimiento en cultivo en medio sólido (CMS)	34
2.5.5	Modelos de crecimiento en CMS	35
2.6	Mutantes	37
2.7	Fenotipo de resistencia a 2-desoxiglucosa	37
2.8	Insectos	39
2.8.1	<i>Tenebrio molitor</i>	39
2.8.2	Cutícula de los insectos	40
2.8.3	Susceptibilidad de los insectos al ataque de los microorganismos	42
2.8.4	Pruebas de efectividad biológica	43
<b>3.</b>	<b>ALCANCE DE LA TESIS</b>	<b>46</b>
3.1	Antecedente directo	46
3.2	Hipótesis	46
3.3	Objetivos	47
3.3.1	Objetivo general	47
3.3.2	Objetivos específicos	47
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>49</b>
4.1	Preparación de los materiales, previo a la realización de los experimentos	49
4.1.1	Microorganismos	49
4.1.2	Conservación de las cepas y preparación del inóculo	49
4.1.3	Preparación del sustrato y el soporte para los cultivos	50
4.2	Cultivo en medio sólido	52
4.2.1	Cinética de producción de hexosaminidasas en CMS en matraces	52
4.2.2	Sistema experimental de CMS en columna	52
4.2.3	Elección del tipo de soporte para CMS en columna	54
4.2.4	Cinética de producción de proteasas y hexosaminidasas en columnas	54
4.2.5	CMS en columna sobre diversos medios de cultivo	54
4.2.6	Preparación de los extractos enzimáticos	55
4.3	Determinaciones analíticas	56
4.3.1	Biomasa en los cultivos en matraz	56

4.3.2	Crecimiento de los cultivos en columna	56
4.3.3	Actividad enzimática	58
4.3.4	pH	60
4.3.5	Proteína	60
4.3.6	Actividad de agua ( $a_w$ )	61
4.3.7	Glucosa	61
4.3.8	Ácido Oxálico	61
4.3.9	Contenido de humedad	62
4.3.10	Composición elemental de C, H y N	62
4.3.11	Secuenciamiento de las proteínas	62
4.3.12	Microscopía electrónica de barrido	65
4.4	Análisis en caja de Petri	66
4.4.1	Crecimiento radial y esporulación a diferentes temperaturas	66
4.4.2	Caracterización de las cepas en función del medio de cultivo	66
4.4.3	Velocidad radial y tasa específica de crecimiento	67
4.4.4	Cinética de germinación	68
4.4.5	Cinética de esporulación	68
4.4.6	Hidrofobicidad	69
4.5	Bioensayo de virulencia	69
4.5.1	Mantenimiento del insecto hospedero	69
4.5.2	Preparación de las suspensiones de esporas	70
4.5.3	Aplicación del inóculo a los insectos	70
4.5.4	Análisis de los resultados de virulencia	71
4.6	Consideraciones teóricas	72
4.7	Análisis estadísticos	72
<b>PARTE II, RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		<b>73</b>
<b>5. EFECTO DE LOS SUSTRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD HEXOSAMINIDASA Y PROTEASA EN CMS</b>		<b>74</b>
5.1	Cinética de producción de las enzimas quitinolíticas sobre quitina coloidal	74
5.2	Producción basal de enzimas hexosaminidasas y proteasas	82
5.3	Cinética de producción de enzimas hexosaminidasas y proteasas sobre cutícula de chapulín	83
<b>6 CRECIMIENTO EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO SOBRE DIVERSOS SUSTRATOS</b>		<b>95</b>
6.1	Ajuste a un modelo de crecimiento de dos fases en medio sólido	95
6.2	Comparación de la producción de CO <sub>2</sub> sobre diferentes sustratos	96
6.3	Producción de enzimas hidrolíticas	103
6.4	Caracterización de las proteínas	105

<b>7 FISIOLÓGÍA Y MORFOMETRÍA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO EN CAJAS DE PETRI.</b>	<b>111</b>
7.1 Medios de cultivo	111
7.2 Crecimiento y esporulación en función de la temperatura	111
7.3 Estimación del crecimiento sobre diferentes sustratos	112
7.4 Características fenotípicas sobre diferentes sustratos	114
7.4.1 Cinética de germinación	114
7.4.2 Cinética de esporulación	116
7.5 Hidrofobicidad de las esporas cosechadas de ADS	118
<b>8 VIRULENCIA DE LAS CEPAS SOBRE LARVAS Y ADULTOS DE <i>Tenebrio molitor</i></b>	<b>121</b>
8.1 Modificación de la virulencia	121
8.2 Determinación del CL <sub>50</sub> y CL <sub>90</sub>	122
8.3 Efecto del medio de cultivo en la virulencia	123
8.4 Efecto del repase por larvas de <i>T. molitor</i> en la virulencia	128
<b>PARTE III, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>133</b>
<b>9 RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>134</b>
9.1 Resumen de resultados	134
9.2 Conclusiones específicas	136
9.3 Conclusión general	136
9.4 Perspectivas	137
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>138</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>152</b>
ANEXO A: Publicación	153
ANEXO B: Definiciones	154
ANEXO C: Aclaración sobre las cepas estudiadas	157
ANEXO D: Balance de material sólido y líquido para cultivo en medio sólido en columna	158
ANEXO E: Evaluación de la linealidad del p-nitrofenol en el tiempo de análisis	161
ANEXO F: Curva estándar de p-nitrofenol para la determinación de hexosaminidasas	162
ANEXO G: Curva estándar de albúmina sérica bovina para la determinación de proteína	163
ANEXO H: Determinación de la porosidad volumétrica de las partículas de poliuretano molido	164
ANEXO I: Modelos de crecimiento en CMS y desarrollo del modelo doble exponencial	165
ANEXO J: Parámetros de ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, Ikasari-Mitchell y doble exponencial en CMS	174
ANEXO K: Publicaciones y Congresos relacionados con la tesis	176

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Productos comerciales basados en <i>Beauveria bassiana</i> .....	8
Tabla 2.2 Insecticidas biológicos a base de <i>Beauveria bassiana</i> producidos en México.....	9
Tabla 2.3 Proteasas reportadas en hongos entomopatógenos .....	22
Tabla 2.4 Quitinasas reportadas en algunos hongos entomopatógenos .....	26
Tabla 4.1 Formulación de los medios de cultivo usados en la cinética de producción de hexosaminidasas en cultivo en medio sólido en matraces .....	52
Tabla 4.2 Formulación de los medios de cultivo usados en las cinéticas de producción de hexosaminidasas y proteasas en cultivo en medio sólido sobre columnas .....	55
Tabla 4.3 Composición de los medios de cultivo usados en los experimentos en caja de Petri .....	67
Tabla 5.1 Parámetros de crecimiento de las cepas en los medios QC y QGN, según el modelo Logístico.....	75
Tabla 5.2 Actividad hexosaminidasa específica en los medios QC y QGN .....	79
Tabla 5.3 Producción de enzimas hexosaminidasas, proteasas y proteínas en los medios GN, QC y QGN .....	82
Tabla 5.4 Análisis elemental de los sustratos utilizados. ....	83
Tabla 5.5 Porosidad volumétrica de las partículas de PUF molido.....	84
Tabla 5.6 Parámetros de estimación del crecimiento sobre PUF molido y sobre PUF cortado en cultivo en medio sólido.....	87
Tabla 5.7 Concentración de proteínas, producción de enzimas y de biomasa en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín a 88 h de cultivo.....	88
Tabla 5.8 Parámetros de estimación del crecimiento de las cepas en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín. ....	89
Tabla 6.1 Tasas específicas según el ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, I-M y DE en CMS sobre los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS.....	99
Tabla 6.2 Grado de ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, I-M y DE en los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS en cultivo en medio sólido.....	102
Tabla 6.3 Concentración de proteína, producción de proteasas y hexosaminidasas sobre los medios GN, QC, QGN, CHA, ST y STS en cultivo en medio sólido .....	104
Tabla 6.4 Proteínas encontradas en el extracto extracelular del cultivo en medio sólido del medio CHA .....	106
Tabla 7.1 Abreviaturas de los medios de cultivo usados en cultivo en caja de Petri .....	111
Tabla 7.2 Parámetros de crecimiento obtenidos en los siete medios evaluados en caja de Petri.....	113
Tabla 7.3 Resumen de los parámetros de germinación de las dos cepas evaluadas en los 7 medios de cultivo .....	116
Tabla 7.4 Parámetros de esporulación de las cepas, evaluados en caja de Petri sobre los diferentes medios de cultivo.....	117

Tabla 8.1 Parámetros de la variación de la virulencia sobre las larvas de <i>T. molitor</i> .....	121
Sobrevivencia (S); tiempo de inicio de la mortalidad ( $t_0$ ); tasa específica de muerte (k); tiempo medio de sobrevivencia, ( $TS_{50}$ ).....	121
Tabla 8.2 Parámetros obtenidos en el bioensayo de virulencia de las dos cepas sobre adultos de <i>T. molitor</i> a diferentes concentraciones, determinación de CL.....	123
Tabla 8.3 Parámetros obtenidos en el bioensayo de virulencia de las dos cepas sobre adultos de <i>T. molitor</i> a diferentes concentraciones, modelo de decaimiento (b).....	123
Tabla 8.4 Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios ADS, QC, CHA y STS contra los adultos de <i>T. molitor</i> .....	125
Tabla 8.5 Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios ADS, QC, CHA y STS contra las larvas de <i>T. molitor</i> .....	126
Tabla 8.6 Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios QC, CHA y STS contra las larvas de <i>T. molitor</i> , antes y después del repase por larvas de <i>T. molitor</i> .....	129
Tabla 8.7 Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios QC, CHA y STS contra los adultos de <i>T. molitor</i> , antes y después del repase por larvas de <i>T. molitor</i> .....	130
Tabla I Variables incluidas en el cálculo de los balances de materiales de CMS .....	158
Tabla II Balance de materiales del CMS para la determinación del tipo de PUF a usar en las cinéticas de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla III Balance de materiales del CMS para los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre la cutícula de chapulín .....	159
Tabla IV Condiciones de operación de CMS de los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre la cutícula de chapulín.....	159
Tabla V Balance de materiales de CMS para los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre diversos sustratos .....	159
Tabla VI Condiciones de operación de CMS de los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre diversos sustratos .....	160
Tabla VII. Datos experimentales de la determinación de la porosidad del PUF molido .....	164
Tabla J.1 Parámetros de ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, I-M y DE en CMS sobre los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS.....	174

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Morfología de <i>Beauveria bassiana</i>	12
Figura 2.2 Ciclo biológico de <i>Beauveria bassiana</i> sobre broca de café.	14
Figura 2.3 Proceso general de infección de los hongos entomopatógenos.	16
Figura 2.4 Estructura de un polímero de $\beta$ -1-4-N-acetil-glucosamina	24
Figura 2.5 Modelo de regiones diferenciales del crecimiento hifal.	31
Figura 2.6 Distribución de las frecuencias de las temperaturas de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	33
Figura 2.7 Esquema del crecimiento de los hongos filamentosos en cultivo en medio sólido.	35
Figura 2.8 Esquema de las capas que componen la cutícula de los insectos	41
Figura 4.1 Esquema de los fermentadores empleados en el cultivo en medio sólido	53
Figura 4.2 Esquema del sistema experimental de cultivo en medio sólido	53
Figura 4.3 Esquema del sistema de detección de gases	56
Figura 4.4 Estados del ciclo biológico de <i>Tenebrio molitor</i>	70
Figura 4.5 Esquema de la cámara de incubación para los bioensayos de virulencia	71
Figura 5.1 Producción de la biomasa en los medios QC y QGN	75
Figura 5.2 Consumo de la glucosa en el medio QGN	75
Figura 5.3 Producción de hexosaminidasas en los medios QC y QGN	76
Figura 5.4 Concentración de proteínas en los medios QC y QGN	76
Figura 5.5 Producción de enzima hexosaminidasa vs. producción de biomasa en los medios QC y QGN:	78
Figura 5.6 Rendimiento de enzima hexosaminidasa por unidad de biomasa, en los medios QC y QGN.	78
Figura 5.7 Actividad hexosaminidasa específica en los medios QC y QGN	79
Figura 5.8 PM aparentes de las proteínas de los extractos obtenidos en el medio QC (izquierda) y en el medio QGN (derecha).	80
Figura 5.9 Cinética de pH en los medios QC y QGN	81
Figura 5.10 Porosidad volumétrica de las partículas de PUF molido	84
Figura 5.11 Partículas de PUF molido, 100x	85
Figura 5.12 Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en cultivo en medio sólido sobre PUF molido y sobre PUF cortado, de la cepa 885.2	86
Figura 5.13 Concentración de proteínas, producción de enzimas proteolíticas (*100), hexosaminidasas y CO <sub>2</sub> en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín.	87
Figura 5.14 Imágenes de microscopía electrónica de cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín y PUF molido	92
Figura 6.1 Ajuste a los modelos de crecimiento en cultivo en medio sólido de los datos de producción de CO <sub>2</sub> en los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS.	98

Figura 6.2a Diagrama de redes del parámetro $t_a$ (h) obtenido mediante el ajuste con el modelo DE en los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS en cultivo en medio sólido	100
Figura 6.2b Diagrama de redes de los parámetros $rX_a$ ( $g\ l^{-1}$ ) (izquierda) y $rX_e$ ( $g\ l^{-1}$ ) (derecha) obtenidos mediante el ajuste con el modelo DE en los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS en cultivo en medio sólido	101
Figura 6.2c Diagrama de redes de los parámetros $\mu$ ( $h^{-1}$ ) (izquierda) y $b$ ( $h^{-1}$ ) (derecha) obtenidos mediante el ajuste con el modelo DE en los medios GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS en cultivo en medio sólido	101
Figura 6.3 Electroforesis monodimensional de las proteínas obtenidas de CMS en los medios GNS, QCS, QGNS y CHA.	105
Figura 7.1 Velocidad de crecimiento radial ( $U_r$ ) a distintas temperaturas en medio ADS	112
Figura 7.2 Densidad de esporulación ( $\rho_{esp}$ ) a distintas temperaturas en medio ADS	112
Figura 7.3 Morfología de crecimiento en caja de Petri de <i>B. bassiana</i>	114
Figura 7.4 $TG_{50}$ (izquierda) y $TG_{90}$ (derecha) de las cepas en caja de Petri sobre los diferentes medios de cultivo	115
Figura 7.5 Imágenes microscópicas de la germinación de las cepas en caja de Petri en medio ADS	116
Figura 7.6 Cinética de esporulación en caja de Petri sobre el medio ADS y GNS	118
Figura 7.7 Hidrofobicidad de las esporas crecidas en medio ADS	118
Figura 8.1 Variación de la virulencia de las cepas sobre las larvas de <i>T. molitor</i> . Los datos se ajustaron al modelo de virulencia propuesto en este trabajo.	121
Figura 8.2 Bioensayo de virulencia de diferentes concentraciones de las suspensiones de esporas sobre los adultos de <i>T. molitor</i> . Los datos se ajustaron con el modelo de virulencia propuesto.	122
Figura 8.3 Virulencia de las esporas de la cepa 88 (izquierda) y de la cepa 885.2 (derecha) obtenidas en los medios ADS, QC, CHA y STS contra los adultos de <i>T. molitor</i>	124
Figura 8.4 Virulencia de las esporas de las cepas 88 y 885.2 obtenidas en los medios ADS, QC, CHA y STS contra las larvas de <i>T. molitor</i>	126
Figura 8.5 Virulencia de esporas obtenidas en los medios QC (a), CHA (b) y STS (c) contra las larvas de <i>T. molitor</i> , antes y después del repase por larvas de <i>T. molitor</i> .	129
Figura 8.6 Virulencia de esporas obtenidas en los medios QC (a), CHA (b) y STS (c) contra los adultos de <i>T. molitor</i> , antes y después del repase por larvas de <i>T. molitor</i> .	130
Figura 9.1 Resumen de los parámetros evaluados en la cepa 88 en medio CHA	135
Figura 9.2 Resumen de los parámetros evaluados en la cepa 885.2 en medio CHA	135
Figura I.1 Definición de los parámetros en la etapa de crecimiento exponencial y crecimiento desacelerado para el cultivo en medio sólido	170

## CLAVE DE MEDIOS DE CULTIVO

ADS: Agar dextrosa Sabouraud

GN: Glucosa y nitrato de sodio (matraz)

GNS: Glucosa y sulfato de amonio

QC: Quitina coloidal (matraz)

QCS: Quitina coloidal

QGN: Quitina coloidal con glucosa y nitrato de sodio (matraz)

QGNS: Quitina coloidal con glucosa y sulfato de amonio

CHA: Cutícula de chapulín molida

ST: Salvado de trigo sin sales

STS: Salvado de trigo con sales

## ABREVIATURAS

2-dog: 2-desoxi-D-glucosa, 2-desoxiglucosa

abs: Absorbancia

ACB: Agente de control biológico

$a_w$ : Actividad de agua

Bb: *Beauveria bassiana*

C: Carbono

CB: Control biológico

CL: Concentración letal

CMS: Cultivo en medio sólido

col: Colaboradores

CR: Coeficiente respiratorio ( $\text{mmol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ O}_2$ )

DE: modelo doble exponencial

DL: Dosis letal

Fig: Figura

H: Humedad

HE: Hongos entomopatógenos

HR: Humedad relativa

I-M: Modelo de Ikasari-Mitchell

MIP: Manejo integrado de plagas

MPM: Marcador de peso molecular  
MS: Materia seca  
MSI: Materia seca inicial  
N: Nitrógeno  
NAG: N-acetil glucosamina  
PM: Peso molecular  
*p-nf*: p-nitrofenol  
Pr: Proteasa  
PUF: Espuma de poliuretano (polyurethane foam)  
SS: Soporte seco  
TG: Tiempo de germinación  
TL: Tiempo letal  
TS: Tiempo de sobrevivencia  
UV: Luz Ultravioleta  
*var*: Variedad  
*vs*: Versus  
*sp*: Sin especificar especie  
*spp*: Sin especificar especies

## LISTA DE SÍMBOLOS

$b$  = Tasa específica de decaimiento del metabolismo respiratorio en CMS en modelo DE ( $\text{h}^{-1}$ )  
 $D_h$  = Diámetro de las hifas en la periferia de la colonia sobre caja de Petri ( $\mu\text{m}$ )  
 $k$  = Tasa específica de decaimiento del metabolismo respiratorio en CMS en modelo I-M ( $\text{h}^{-1}$ )  
 $k$  = Tasa específica de mortalidad de insectos ( $\text{d}^{-1}$ )  
 $L_{av}$  = Longitud de la hifa líder en la periferia de la colonia sobre caja de Petri ( $\mu\text{m}$ )  
 $r$  = Rendimiento de unidades de  $\text{CO}_2$  producidas por unidad de biomasa por hora durante la fase de crecimiento exponencial en CMS ( $\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} X$ )  
 $r'$  = Rendimiento de unidades de  $\text{CO}_2$  producidas por unidad de biomasa por hora durante la fase de desaceleración del crecimiento en CMS ( $\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} X$ )  
 $S$  = Nivel de sobrevivencia asintótica de los insectos (%)

$t$ = Tiempo (h)

$t_0$ = Tiempo de retardo de inicio de la muerte de los insectos (h)

$t_a$ = Tiempo inicial de la fase de desaceleración en CMS (h)

$U_r$ = Máxima velocidad de extensión radial de la colonia sobre caja de Petri ( $\mu\text{m h}^{-1}$ )

$X$ = Concentración de biomasa en cualquier tiempo en CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$X_0$ = Concentración inicial de biomasa en CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$X_a$ = Concentración de biomasa en  $t=t_a$  en CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$X_c$ = Concentración de biomasa activa en CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$X_e$ = Concentración de biomasa activa en asíntota de CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$X_m$ = Valor máximo de la concentración de la biomasa en CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$X_T$ = Concentración de la biomasa total en CMS ( $\text{g X g}^{-1} \text{MS}$ )

$Y$ = Supervivencia de los insectos (%)

$\rho$ : Densidad (esporas  $\text{cm}^{-2}$ ;  $\text{g l}^{-1}$ )

$\alpha$ : Porosidad

$\mu$ = Tasa específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )

$\mu_m$ = Tasa específica de crecimiento máxima ( $\text{h}^{-1}$ )

# **PARTE I, ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y ALCANCE DE LA TESIS**

## **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

Los cambios que llevaron a la humanidad a desarrollar la tecnología de los alimentos, ocasionaron alteraciones en la ecología de los insectos, debido a la modificación del espacio y a la reducción de la biodiversidad, hasta convertirse en una confrontación entre insectos plaga y humanos por un bien preciado: los cultivos. Además, en algunos países en desarrollo, los insectos son un problema de salud pública, por ser vectores de parásitos y virus que afectan tanto a humanos como a animales de cría.

Entre las opciones de control biológico para mantener el equilibrio entre las especies benéficas y las plagas, los hongos entomopatógenos ofrecen ventajas sobre los virus, bacterias y protozoarios, lo que los hace interesantes para su explotación comercial, debido al aumento gradual pero constante de la demanda de productos comerciales basados en los mismos. Por otra parte, es de notar la importancia del CB en países como México, ya que la agricultura es principal renglón económico de los países latinoamericanos, sobre todo en la condición actual de la internacionalización de la economía, y debido a los países compradores establecen barreras de tipo sanitario a los productos de origen agrícola.

Los insecticidas de origen biológico le dan valor agregado a los productos haciéndolos ventajosos en los controles de calidad, al ser aceptados mundialmente por ser cosechas libres de residuos tóxicos (van Lenteren, 2006). A pesar de todos los atributos que presenta el CB como ciencia y con base en la revisión de la bibliografía, se puede afirmar que es un campo aún sub-explotado, debido a la falta de conocimiento de algunos aspectos biológicos y tecnológicos implicados, que pudieran permitir la introducción de tecnologías compatibles como la investigación biotecnológica.

*Beauveria bassiana* es un hongo entomopatógeno ampliamente utilizado en todo el mundo y contra diversas plagas de cultivos. En este trabajo se evaluaron los fenotipos de dos cepas de *Beauveria bassiana*, una cepa silvestre y una cepa mutante derivada de ésta, resistente al compuesto tóxico 2-desoxiglucosa. Este tipo de mutación no ha sido evaluada en hongos entomopatógenos, pero según la bibliografía podría afectar la producción y liberación de las enzimas y la morfometría de crecimiento.

El presente documento se divide en diez apartados, donde se destacan 3 secciones, la primera es el antecedente bibliográfico y alcance de la tesis, en la segunda los resultados

obtenidos y la discusión de los mismos y en la tercera sección, se presentan las conclusiones y perspectivas.

La primera sección comprende la revisión bibliográfica donde se detalla todo lo relacionado con el control biológico, las características de *Beauveria bassiana*, los factores de virulencia de los hongos entomopatógenos, especialmente las enzimas proteasas y hexosaminidasas, las propiedades generales de los insectos y de las interacciones hospedero-hongo, las características de crecimiento de los hongos filamentosos en medio sólido y superficial, además de los modelos que han sido utilizados para su estudio.

Posteriormente, en el alcance de la tesis se presenta el antecedente directo de la tesis, la mutación de la cepa silvestre para obtener la cepa resistente a 2 desoxiglucosa, así como la hipótesis, y los objetivos. En materiales y métodos se describen las metodologías empleadas en la caracterización y comparación de los fenotipos de las dos cepas en cultivo en medio sólido, en cultivo superficial y los bioensayos sobre el insecto modelo *Tenebrio molitor*.

En la segunda sección se presentan los resultados obtenidos y discusión, los cuales se dividieron en cuatro capítulos, en los capítulos 5 y 6 se compararon las dos cepas en términos del efecto de diversos sustratos sobre la actividad quitinolítica y proteolítica en medio sólido, además que en el capítulo 6 se propone el modelo doble exponencial para el crecimiento de *Beauveria bassiana* en medio sólido sobre diversos sustratos y se presentan las proteínas secuenciadas obtenidas en CMS sobre cutícula de chapulín. En el capítulo 7 se presentan los resultados de la evaluación de las cepas en cultivo superficial sobre caja de Petri respecto a los parámetros de la germinación, la aplicación del modelo de crecimiento para hongos filamentosos y la esporulación. Por último, la evaluación de la virulencia de estas cepas sobre las larvas y los escarabajos de *Tenebrio molitor* con esporas provenientes de diversos medios de cultivos y las esporas provenientes de un repase por larvas de *Tenebrio molitor*, se presentan en el capítulo 8.

Finalmente, en la tercera sección, se presenta el resumen de los resultados, las conclusiones y las perspectivas que se derivaron de todos los análisis realizados en el capítulo 9 y posteriormente las referencias bibliográficas y los anexos.

# **PARTE I, ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y ALCANCE DE LA TESIS**

## **ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS**

## 2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

El primer reporte de un patógeno del género *Cordyceps*, que se desarrollaba sobre un Lepidóptero de la familia Noctuidae lo realizó Reaumur, en 1726 (Vergara, 2000). Posteriormente, en 1836, Agostino Bassi descubrió que la enfermedad de la muscardina blanca en el gusano de seda era causada por un hongo, posteriormente llamado *Beauveria bassiana* Balsamo (Vuillemin) y elucidó por primera vez la etiología de una enfermedad contagiosa en insectos (Gillespie y Claydon, 1989).

A partir de 1974 se inició el uso de los HE como ACB (Lord, 2005). (Lord, 1950), sin embargo, el CB fue relegado completamente, al descubrirse los insecticidas químicos, al punto de revolucionar la producción agrícola de la época. Hasta que, debido a los hallazgos de los daños causados por dichos insecticidas químicos, hacia 1970 se iniciaron diversas propuestas en contra de su uso indiscriminado, así como la búsqueda de alternativas, por lo cual se regresó al uso del CB (Kunimi, 2007).

Hacia 1985, se reportó el desarrollo de la resistencia a *Bacillus thuringiensis* por la plaga *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) (Lord, 2005). Además que para el año 1996, se habían reportado más de 600 especies de artrópodos que habían desarrollado resistencia hacia los insecticidas químicos, lo cual es un problema creciente (van Lenteren, 2006), al punto que los daños ocasionados por plagas de cultivos ascendieron a entre \$30 mil y \$50 mil millones de dólares anuales en el 2003, según un estudio de alcance mundial (Chet y Chernin, 2002). En México no hay una cifra exacta del daño que causan los insectos en los cultivos, sin embargo en 1972 el daño ascendió al 15% de perdidas en el país (Cervantes y col., 2003) y en 1974 las pérdidas se estimaban en 10000 millones de pesos al año.

Con base en lo anterior, el control biológico se ha convertido en una prioridad de la investigación, en respuesta a la necesidad de ejercer medidas de regulación más seguras, ambientalmente amistosas, que promuevan agro-ecosistemas sostenibles y que permitan obtener productos con valor agregado haciéndolos atractivos en relación a los controles de calidad para la comercialización, destacando que se trata de productos libres de residuos tóxicos.

## **2.1 Control biológico (CB)**

La Agricultura es fundamental para la humanidad, la sustentabilidad agrícola se refiere a la manera de mantener la producción y la calidad de las cosechas, reduciendo los daños potenciales a la salud pública y ambiental, así como la dependencia de los insecticidas químicos. Todo esto mediante estrategias que incluyen el uso de agentes de control biológico (ACB) y el manejo adecuado de la biodiversidad (Candas y Bulla, 2002).

### **2.1.1 Agricultura orgánica**

La agricultura orgánica, según el censo mundial de granjas agrícolas, en el 2007 constituía el 0.7% del total de la agricultura. Según este censo, México poseía la mayor cantidad de granjas de agricultura orgánica en el mundo, con casi 90000; además de ser el primer productor de frutales (25000 has) y de café orgánico (160000 has) (Willer y Minou, 2007). La principal producción de este tipo en México, se presenta en reservas de Chiapas, región marginada, donde la agricultura orgánica es una actividad viable para sus posibilidades de producción agrícola, y está creciendo a una tasa de 45% anual (Lotter, 2005).

El mercado global de productos orgánicos ha aumentado en 43% de 2002 a 2005, los mercados de Estados Unidos y Europa tienen una elevada demanda de estos productos, considerándose un excelente nicho de oportunidad para los productos orgánicos provenientes de Latinoamérica. En México el 98% de la producción certificada es para exportación (Willer y Minou, 2007).

### **2.1.2 Manejo integrado de plagas (MIP) y control biológico (CB)**

El manejo integrado de plagas es un método de control que integra un conjunto de estrategias confiables desde el punto de vista ecológico, económico y toxicológico, con énfasis en el empleo de elementos naturales de regulación, manteniendo una relación costo-efecto equilibrada (Gallegos, 2004), incluye el uso de insecticidas químicos y biológicos (van Lenteren, 2006) y requiere del conocimiento de la ecología, la biología de la plaga y del cultivo, además de la apropiada integración de la información (Pedigo, 1996; van Lenteren, 2006).

El control biológico emplea los enemigos naturales de las plagas de los cultivos con el fin de aumentar el valor agregado de las cosechas y de reducir la contaminación ambiental originada por el uso indiscriminado de los agentes químicos (Monzón, 2001). Existen más de 2000 microorganismos naturales con potencial de ser parte de un programa de control biológico. Entre los agentes entomopatógenos se encuentran por lo menos, 100 especies de bacterias, 1000 especies de virus, 300 especies de protozoarios y 750 especies de hongos (Monzón, 2001).

El CB como ciencia de estudio, actualmente se enfoca hacia la interacción de los factores climáticos que inducen la formación de epizootias en el campo, la producción masiva de unidades infectivas de alta calidad y el mejoramiento genético de los hongos entomopatógenos (Gallegos, 2004). Además de cultivos agrícolas, esta ciencia incluye la protección en las bodegas, en las residencias urbanas, de los paisajes, de la salud pública y en el campo de la veterinaria.

Algunas definiciones de los términos utilizados en el MIP se encuentran en el anexo B.

### 2.1.3 Manejo integrado de plagas en postcosecha

Se ha estimado que un tercio de los alimentos potenciales que se cosechan en los Estados Unidos de Norteamérica se pierden anualmente debido a las plagas en el almacenaje. Miles de especies de insectos son conocidas como causantes del daño a los granos de bodega, los cuales traen consigo una cascada de inconvenientes a la salud de quien consume dichos productos, ya que, los insectos son difíciles de retirar de los productos de manera mecánica y cuando mueren suelen dejar los huevecillos que mantienen el ciclo biológico infeccioso, atraen roedores, y algunos pueden ser parte del ciclo de parásitos como hospederos intermediarios. El CB incluye la regulación de este tipo de plagas, lo cual es ventajoso debido a que hay regulaciones estrictas en este sentido, como es: La comisión del *Codex Alimentarius*, la cual presenta lineamientos muy bien establecidos sobre la permisibilidad de residuos como insecticidas de tipo organofosforados y piretroides en granos (van Lenteren, 2006). Sin embargo, poco se ha estudiado sobre las interacciones entre los hongos entomopatógenos y los insectos que atacan alimentos en condiciones de almacenamiento.

#### 2.1.4 Insecticidas biológicos comerciales basados en hongos entomopatógenos

En el año 2009, había más de 30 especies de microorganismos registrados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y más de 600 plaguicidas químicos (Candas y Bulla, 2002). Entre los insecticidas microbianos, *B. thuringiensis* representa más del 90% de las ventas (Gallegos, 2004). En cuanto a los hongos, existían registros de 15 especies. Las cepas de *Beauveria bassiana* registradas ante la EPA son la ATCC 74040, HF23, 477 y la GHA (EPA, [www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/](http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/), 2009).

En cuanto a las proyecciones económicas, sobre el mercado de bioinsecticidas, se espera que crezca entre 10% a 15% anual frente a 1% a 2% de crecimiento del mercado de plaguicidas químicos en los próximos 10 años (Chet y Chernin, 2002). Algunos productos comerciales a base de *B. bassiana* se describen en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Productos comerciales basados en *Beauveria bassiana*.

Producto	Compañía	País
<b>Bio-Power</b>	Stanes	India
<b>Boverol</b>	Fytovita/Boverol	República Checa
<b>Naturalis</b>	Intrachem	Italia
<b>Ostrinil</b>	Arysta	Francia
<b>Trichobass</b>	AMC chemical	España
<b>Naturalis</b>	Bioscience	USA
<b>Mycotrol/Botanigard</b>	Mycotech	USA
<b>Bibisav 2</b>	Inisav	Cuba
<b>Proecol</b>	Probioagro	Venezuela
<b>Boveril</b>	Itaforte	Brasil
<b>Brocaril</b>	Laverlam	Colombia

Tomado de: Butt, 2001; Milner, 2000; Zimmerman, 2007; Charnley y Collins, 2007.

Mientras que en México, para el año 2006, se encontraban 60 laboratorios que producían y distribuían 35 especies de ACB (31.5% patógenos) (Arredondo 2006, en Barrera, 2007). En el año 2006 se liberaron hongos entomopatógenos sobre más de 6000 has para el control de diversas plagas (van Lenteren, 2006). Los preparados a base de *B. bassiana*, producidos en México para el año 2006 se muestran en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Insecticidas biológicos a base de *Beauveria bassiana* producidos en México.

Nombre comercial	Compañía	Lugar
<b>Bea-Sin</b>	Agrobionsa	Sinaloa
<b>BotaniGard</b>	Mycotech	D.F.
<b>Mycotrol</b>	Mycotech	D.F.
<b><i>B. bassiana</i></b>	CNRCB	Colima
<b>Bio-Fung</b>	CESAVEG	Guanajuato

Tomado de: García-Gutierrez y col., 2006.

### 2.1.5 Ventajas y desventajas del uso de los hongos entomopatógenos (HE)

#### **Ventajas**

1. Los HE que se han comercializado cumplen con los requisitos de seguridad ambiental, a la salud humana y a otros animales vertebrados e invertebrados benéficos. Los HE no causan los daños reportados por los insecticidas químicos, los cuales se acumulan en el medio y contaminan el agua al depositarse en los suelos y mares, causando grandes estragos en la flora y fauna local. También muchos de los insecticidas químicos pueden causar desde impotencia sexual, abortos, paro cardíaco, cáncer, entre otros, hasta la muerte de los humanos expuestos a estos agentes (Gallegos, 2004).
2. Los HE no generan resistencia y mucho menos resurgencia, además evitan la presencia de plagas secundarias. Contribuyen a la protección de la biodiversidad (van Lenteren, 2006). Además, actúan en un amplio rango de variables geográficas, climáticas y de hospedero (Scott y col., 2002).

#### **Desventajas**

1. La inducción de las epizootias es lenta, en comparación con los insecticidas químicos.
2. Dependencia del ambiente físico para su supervivencia en campo, por ejemplo: La temperatura, la humedad relativa y la radiación UV.
3. La producción de los hongos a gran escala puede afectar la calidad de los mismos. Hoy en día, no se encuentran suficientes tecnologías que cuiden este aspecto (Sun y Liu, 2006).

## **2.2 *Beauveria bassiana***

### **2.2.1 Generalidades acerca de los hongos entomopatógenos**

Los hongos causantes de enfermedades en insectos se encuentran virtualmente en todos los grupos taxonómicos excepto los Basidiomycetes. La mayoría de las especies de Ascomycota son dimórficos, es decir producen levaduras y micelio durante ciertos períodos de su ciclo de vida (Guarro, 1999). Además, poseen una fase asexual o anamorfa, también se puede observar en ellos el fenómeno de la parasexualidad (proceso de intercambio genético que no involucra reproducción sexual) durante el proceso de infección en el interior de sus hospederos.

Los hongos Ascomycota, anteriormente clasificados como Deuteromycetes, incluyen a los Hifomycetes, que son los hongos que forman micelio estéril o producen esporas directamente en hifas especializadas (conidióforos), y estos incluyen a los principales géneros de hongos entomopatógenos, como *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* y *Metarhizium* entre otros y al orden Coelomycetes que poseen estructuras reproductivas más complejas (Guarro, 1999)

Estos hongos poseen un amplio rango de hospedero debido a su diversidad genética (Milner, 2000), infectan individuos en todos los órdenes de insectos; Hemíptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera, Himenóptera y Ortóptera (Tanada y Kaya, 1993). Pero, a pesar de su capacidad “generalista” se ha observado que cada especie tiene características diferenciales, pues se encuentran patotipos o razas que aunque presentan una morfología similar tienen diferente rango de hospederos, o requieren diferentes condiciones de desarrollo (Alatorre, 2004).

### **2.2.2 Clasificación taxonómica**

Debido a la utilización actual de las técnicas moleculares se han presentado variaciones en la clasificación taxonómica de los hongos. Las cuales permitieron que algunos hongos mitospóricos, anteriormente clasificados dentro del *phylum* Deuteromycetes, fueran relacionados con sus correspondientes estadios sexuales y así sean integrados dentro de los *phyla* Ascomycota y Basidiomycota.

Análisis moleculares filogenéticos de *Beauveria bassiana* muestran una organización geográfica compleja de linajes divergentes relacionados filogenéticamente a la especie sexual, *Cordyceps bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) (Rehner y Buckley, 2005), el cual se caracteriza por su especificidad de hospedero en el orden Insecta (Guarro1999). Sin embargo, todos los teleomorfos (estadio reproductivo sexual) de *Beauveria* han sido descritos en Asia (Zimmerman, 2007).

Clasificación taxonómica según The National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2009):

Reino:	Hongos
Phylum:	<i>Ascomycota</i>
Subphylum:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Hypocreales</i>
Familia:	<i>Cordycipitaceae</i>
Género:	<i>Cordyceps</i>
Especie:	<i>Beauveria (Cordyceps) bassiana</i>

### 2.2.3 Características generales

*Beauveria bassiana* es la especie más distribuida del género. Se encuentra en una gran variedad de condiciones climáticas y se ha adaptado a una gran cantidad de hospederos. Así mismo, *B. bassiana* se encuentra en un amplio rango de ambientes, el suelo, los bosques, las dunas, el desierto, la rizosfera, la superficie y el interior de las plantas, tanto de manera endófito como mutualista (Vega, 2008; Zimmerman, 2007). De ahí que sea ampliamente estudiada y usada como ACB de interés práctico.

Morfológicamente, *B. bassiana* se presenta sobre la superficie del hospedero afectado como un micelio emergente formando una densa cubierta blanca, ocasionalmente forma conidióforos simples e irregulares que terminan en vértices con formas de racimos, la base de la célula es globosa o abultada con un adelgazamiento del área de inserción de los conidios y esterigmas curvados en forma irregular o dispuestos en forma de zigzag. El micelio es septado, y los conidios hialinos que se forman apicalmente en cadena,

generalmente no excede los 3.5  $\mu\text{m}$  de diámetro (Humber, 1998; Gallegos, 2004) (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Morfología de *Beauveria bassiana*

#### 2.2.4 Plagas susceptibles

*B. bassiana* se encuentra atacando plagas agrícolas de importancia económica para México, como son: El picudo del algodnero (*Anthonomus grandis* Boh), la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew), el perforador europeo del maíz, (*Ostrinia nubilalis* Hübner), la conchuela del frijol (*Epilachna varivestis* Muls), el picudo de la papa (*Epicaerus cognatus* Sharp), el picudo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano), la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood) y la gallina ciega (*Phyllophaga* sp. Harris) (Laverlam, 2007).

También cabe señalar que ataca efectivamente la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), agente causal del problema fitosanitario más importante de todos los que atacan el cultivo en Colombia, México y otros países productores de éste grano. En efecto, esta plaga puede generar disminuciones en la producción cafetera de hasta el 80% (Delgado, 2000), aunque el HE *Metarhizium anisopliae*, puede ser efectivo contra este insecto, la virulencia obtenida con diversos aislamientos de *B. bassiana* es mejor (De la Rosa y col., 2000, Bustillo y col., 1999).

Existen datos acerca de *B. bassiana* atacando, con alta eficiencia, a más de 200 especies de insectos de diferentes órdenes, incluyendo plagas de gran importancia agrícola. Entre ellas destacan:

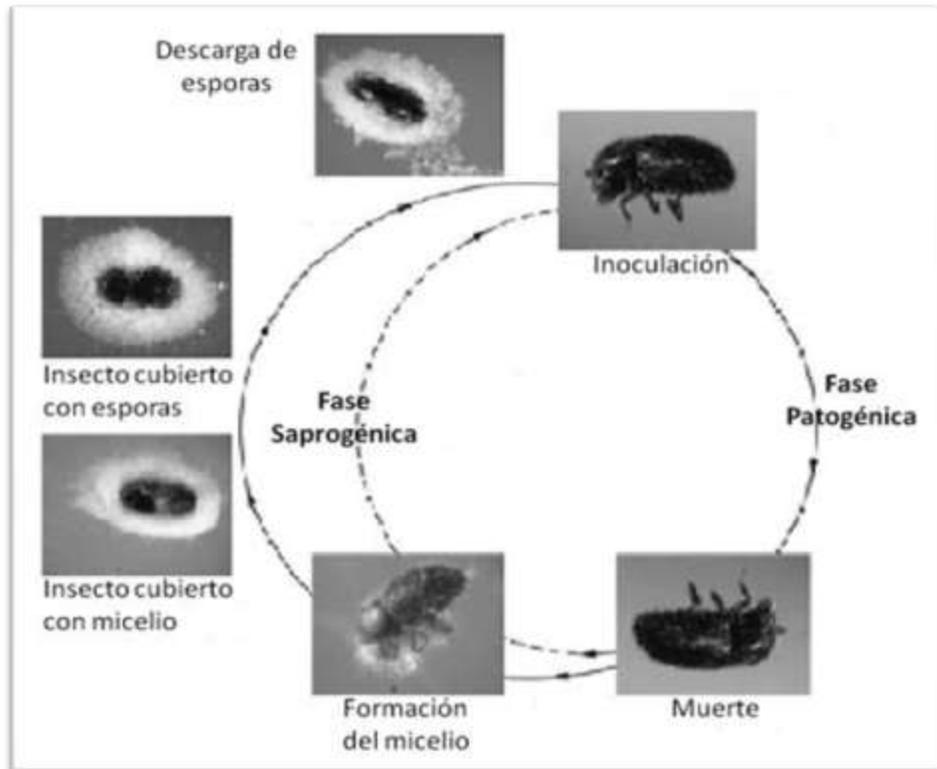
El escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say), la chinche de la raíz del arroz (*Blissus leucopterus* Say), las chinches (*Nezara viridula* Linnaeus, *Piezodorus guildinii* Westwood, *Edessa mediatubunda* F.), el gusano de la col (*Trichoplusia ni* Hübner), el gusano medidor del arroz (*Mocis latipes* Guen), la oruga de los pinos (*Lymanthria dispar* Linnaeus), la mosca común (*Musca domestica* Linnaeus), los picudos (*Anthonomus* sp. Germar, *Cosmopolites* sp. Chevrolat, *Metamasius* sp. Linnaeus, *Rhynchophorus* sp.), el saltamontes verde (*Turpilia opaca* Brunn), los trips del melón (*Thrips palmi* Karny) (Coates y col., 2002), las chizas (*Ancognatha* sp. Erichson), el gusano peludo (*Estigmene acrea* Drury), el gusano falso medidor (*Chrysodeixis includens* Walker), el gusano soldado o cortador (*Mythimna unipunctata* Haworth), el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith), la chinche de la raíz del arroz (*Blissus leucopterus* Say) (Laverlam, 2007).

Por último, conviene señalar que *B. bassiana* puede ser usada contra algunos insectos vectores de enfermedades con gran efecto en la salud pública como: Dengue, enfermedad de Chagas, filariosis, enfermedad de Lyme, fiebre amarilla, malaria, leishmaniosis. Entre estos insectos cabe mencionarse a los siguientes géneros: *Aedes* Meigen, *Culex* Linnaeus, *Anopheles* Meigen, *Triatoma* Laporte y *Rhodnius* Stål (Arruda y col., 2005; Marti y col., 2005; Alvares Campos y col., 2005; da Silva y col., 2005). Así como las garrapatas (*Boophilus microplus* Canestrini), como plagas que causan daños en la salud pública y la economía de bovinos (Arruda y col., 2005), y las plagas ecológicas tales como las termitas y las hormigas (Holder and Keyhani, 2005); sin embargo, es un campo aun subaprovechado.

### 2.2.5 Ciclo de vida

*Beauveria bassiana* al encontrarse en ausencia del hospedero específico, desarrolla un ciclo vegetativo o saprobio, determinado por sus características fisiológicas particulares que le confieren la permanencia en el ambiente, al resistir condiciones hostiles como altas temperaturas, luz ultravioleta, baja humedad relativa, y falta de nutrientes. No obstante su paso hacia el ciclo patogénico se produce por medio de un sistema específico de transducción de señales que le permite al hongo diferenciar entre todos los insectos a su hospedero correcto para iniciar el proceso de infección hasta generar su muerte y posteriormente reiniciar el ciclo nuevamente (Gillespie y Claydon, 1989), según se muestra en la Figura 2.2.

De acuerdo a lo reportado por Posada (2005), la fase patogénica de *B. bassiana* sobre *H. hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae) duró en promedio 4 días y la saprobia 6.2 días, en condiciones óptimas para el HE en bioensayo controlado en laboratorio. Otros autores han reportado tiempos variables entre 3 y 14 días de la fase patogénica en campo, pero éste depende del estado de salud, especie y estadio del insecto susceptible, cepa del hongo, ubicación geográfica, dosis de los conidios, temperatura y humedad (Monzón, 2001).



**Figura 2.2** Ciclo biológico de *Beauveria bassiana* sobre broca de café. Modificado a partir de: Posada, 2005.

### 2.3 Características del proceso de infección de los hongos entomopatógenos

Las fases de desarrollo de los HE sobre sus hospederos son:

**2.3.1. Adhesión:** La ruta de infección del insecto es a través del integumento externo y en raras ocasiones por la boca. La unidad infectiva, el conidio, se fija al insecto en dos etapas, la primera es una adhesión no específica mediada por interacciones hidrófobas entre la epicutícula del insecto y la pared celular de las conidios. Ésto mantiene las dos estructuras

en estrecho contacto por largo tiempo, hasta que interviene la segunda etapa. La cual incluye un mecanismo específico mediado por asociaciones de lectínas entre los antígenos de superficie del hongo y la cutícula del insecto y la producción de adhesinas (Wang y St Leger, 2007a).

**2.3.2. Germinación:** Posteriormente se inicia la germinación del conidio y el crecimiento sobre la cutícula, dependientes de factores como la susceptibilidad del hospedero, las condiciones ambientales, la disponibilidad de nutrientes, el agua, el oxígeno, y la baja concentración de sustancias tóxicas propias del hospedero, como los fenoles, los ácidos grasos de cadena corta, los aldehídos y las cetonas (Jeffs y Khachatourians, 1997). De acuerdo a St Leger y col. (1987), generalmente se alcanza el 68% de la germinación sobre la cutícula del hospedero entre las primeras 8 a 24 h si las condiciones de temperatura y humedad son idóneas.

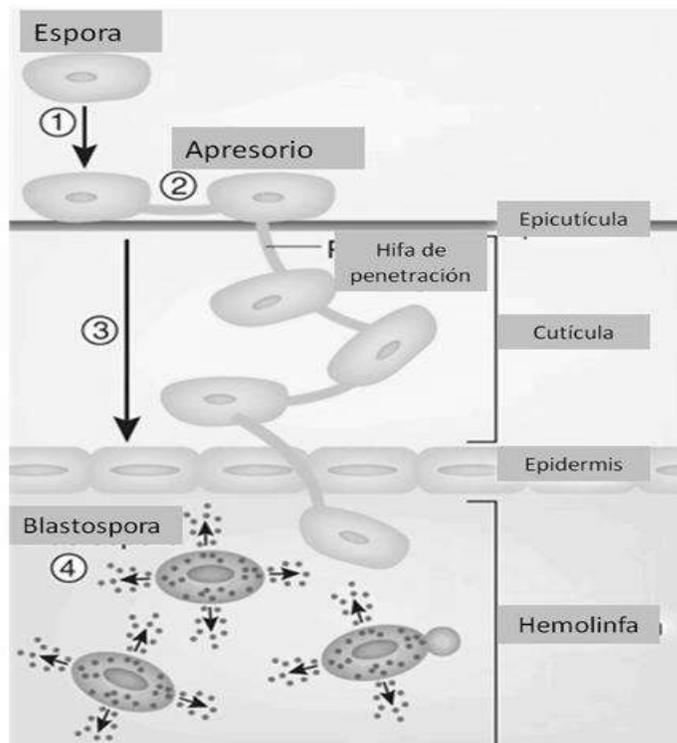
**2.3.3. Formación de estructuras de penetración:** Algunas evidencias obtenidas por microscopía electrónica e histoquímica sugieren que la penetración se debe a una combinación de mecanismos físicos y químicos (St Leger y col., 1988). De preferencia el hongo penetra las zonas más débiles de la cutícula, éstas son las zonas menos esclerotizadas, como los espacios intersegmentales. La penetración se da por la formación de hifas especializadas que forman una clavija penetrante llamada apresorio sobre la superficie de la cutícula para ejercer presión mecánica, seguido de una alta liberación de enzimas que rompen la cubierta del insecto en respuesta a las señales de presencia de la cutícula del insecto hospedero (St Leger y col., 1996a). También se produce una capa mucilaginosa, entre la unión de la célula apresorial y la superficie de la cutícula para reforzar la unión. En *Beauveria bassiana*, el apresorio ha sido raramente observado y la penetración de la hifa puede ser directamente sobre la cutícula (Bidochka y Khachatourians, 1991).

**2.3.4. Colonización:** Durante el proceso de invasión, los tubos germinativos sufren cambios bioquímicos o procesos adaptativos y de diferenciación celular. El hongo atraviesa la epicutícula y forma placas que van invadiendo y destruyendo los diferentes estratos. Una vez dentro del hemocele, la colonización del huésped se realiza por medio de blastosporas (un estado de desarrollo tipo levaduriforme llamada fase de cuerpos hifales, que es una fase parasita obligada) (St Leger y col., 1991). Las cuales se dispersan a través de la hemolinfa del insecto para invadir y destruir los tejidos, el hospedero muere por la producción de

toxinas. El HE debe también evadir los mecanismos de resistencia del hospedero que son de tipo celular y humoral, tales como hemocitos, macrófagos, la producción de fenol oxidasas, compuestos antifúngicos, la melanización, los inhibidores de proteasas, entre otros, (Wang y St Leger, 2006). En el insecto se producen efectos citotóxicos, por daño mecánico y agotamiento de los alimentos, reducción progresiva de los movimientos y pérdida del apetito (Vey y col., 2001).

**2.3.5. Reproducción:** Después de morir el hospedero, el patógeno reinicia el ciclo reproductivo, de manera que sale del insecto a través de sus aberturas naturales y las hifas emergen de la superficie ventral y dorsal de los insectos muertos en condiciones de humedad adecuadas. Lo que permite la persistencia de las unidades infecciosas en el nicho ecológico, y proveer de inóculo para controles futuros (Lomer y col., 2001). En condiciones muy secas, el hongo puede persistir dentro del cadáver en forma de micelio.

El resumen del proceso de infección de forma gráfica se muestra en la Figura 2.3.



**Figura 2.3** Proceso general de infección de los hongos entomopatógenos. Tomado de Thomas y Read, 2007

## 2.4 Factores de virulencia

Durante el proceso de infección, el hongo debe adaptarse a diversas condiciones ambientales, como son: La composición de las diversas capas de la cutícula, la hipodermis, la hemolinfa (Charnley, 2003). Cada una de las fases de desarrollo del HE sobre el hospedero requiere la expresión diferencial de cientos de genes, lo que Freimoser y col. (2005) estudiaron a través de la técnica de microarreglos y denominaron plasticidad fenotípica de la virulencia.

Para discutir con mayor detalle los factores de virulencia, podemos organizarlos como sigue:

### 2.4.1 Adhesión

La adhesión es el primer paso en el proceso de infección. Incluye interacciones hidrofóbicas mediadas por hidrofobinas (proteínas de bajo peso molecular, 10 KDa), las cuales, se autoensamblan como complejos de alto peso molecular en la presencia de interfases entre el aire y el agua, así como en presencia de superficies hidrofóbicas (Holder and Keyhani, 2005). Estas proteínas se encuentran recubriendo la superficie de la hifa aérea y las esporas. Además, son importantes en la recepción de señales para la formación del apesorio.

Se han encontrado niveles altos de transcripción del gen *ssgA* que codifica para las hidrofobinas durante las últimas etapas de la conidiación en *M. anisopliae* (Fang y col., 2007). En *M. anisopliae* las proteínas MAD1 son las responsables de reemplazar las hidrofobinas con interacciones un poco más específicas, e influir en la organización del citoesqueleto por tanto en el proceso de germinación (Wang y St Leger 2007a).

### 2.4.2 Germinación

Algunos autores han encontrado una correlación entre la tasa de germinación y la virulencia (Yeo y col., 2003; Altre y col., 1999); sin embargo, no hay consenso al respecto, por lo que no puede ser utilizada individualmente para la predicción de la virulencia de *B. bassiana* (Varela y Morales, 1996).

Para que el proceso de germinación proceda, la síntesis de la pared se concentra en un punto de la espora, a menudo un poro de germinación preformado, a partir del cual emerge el tubo. El crecimiento de la punta hifal basa su metabolismo inicial en las reservas endógenas, la elongación del tubo germinal se lleva a cabo simultáneamente con la adquisición de nutrientes externos. Posteriormente, se forma un septo, el cual separa el tubo germinal del conidio (Jenning y Lysek, 1999), luego de lo cual emerge el segundo tubo germinal. *Beauveria bassiana* produce *in vitro* tres tipos de germinación conidial, siendo la unidireccional la que ofreció una correlación positiva con la virulencia de ciertos aislados contra las larvas de los insectos evaluados, *Plutella xylostella* Linnaeus (Lepidoptera: Yponomeutidae) y *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae) (Talaie-Hassanloui y col., 2007).

El proceso de germinación involucra la activación de vías de segundos mensajeros moleculares y el rompimiento de carbohidratos de reserva como la trehalosa (Talaie-Hassanloui y col., 2007) y condiciones óptimas de humedad relativa (HR), en el caso de *B. bassiana*, una infección natural requiere más de 96% de HR (Devi y col., 2005).

El proceso de germinación depende además de las condiciones de nutrición. James (2001), encontró que para *B. bassiana*, el extracto de levadura y la peptona influyeron positivamente en la tasa de germinación conidial, y si requirió de una fuente de N, pero no de fuente de C. Iskandarov y col. (2006) reportaron el efecto inhibitorio de la germinación de *B. bassiana* por la presencia de azúcares en el medio, ya que pasó del 20% de germinación en el medio de agar agua a 0% en un medio agregado con glucosa, almidón o sacarosa. Sin embargo, al agregar la bactopectona o el extracto de levadura al agar agua, la germinación alcanzó el 95%. Por el contrario, Safavi y col. (2006) encontraron que los porcentajes de germinación obtenidos en los medios que contenían glucosa y peptona fueron entre 6 y 90% mayores que en los medios que contenían solamente peptona al 2%.

Asimismo, Ibrahim y col. (2002) concluyeron que los medios ricos en nutrientes tales como ADS y agar extracto de levadura permitieron una mayor germinación de los conidios de *M. anisopliae* que el medio mínimo y el modificado osmóticamente, además demostraron que los conidios obtenidos a partir de sustratos limitados de nitrógeno germinaron 1.8 veces más rápido que los conidios obtenidos en un medio de agar dextrosa Sabouraud con maltosa. Sin embargo, en este mismo estudio, los conidios procedentes de los medios pobres tuvieron

mayor potencial de germinación cuando fueron puestos sobre cutícula de *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) y de *Meligethes aeneus* Fabricius (Coleoptera; Nitidulidae) que los que derivaban de los medios ricos.

#### 2.4.3 Formación del apresorio

Una vez cesa la elongación polar del tubo germinal, la punta de éste se empieza a hinchar y formar una estructura de domo altamente melanizada. Esta capa de melanina cubre casi todo el contorno del apresorio, excepto el sitio de contacto con el sustrato llamado poro del apresorio (Howard y col., 1991), por donde emerge una delgada hifa, la cual se adhiere fuertemente a la superficie de la cutícula y es el punto de concentración de la presión para formar el apresorio. La presión hidrostática ejercida para penetrar la superficie del insecto llega a ser hasta de 8 MPa (Howard y col., 1991), resultante de las altas concentraciones de solutos, hasta 3.2 M de glicerol contenidos en una vacuola central (Dixon y col., 1999). La melanina es la encargada de mantener la presión interna, por ser una capa permeable al agua pero no a los solutos.

El fenómeno de formación del apresorio ha sido estudiado en *Magnaphorte grisea* y *Metarhizium anisopliae*; Los conidios de *Magnaphorte grisea* contienen como carbohidratos de reserva: Manitol, trehalosa, y glicógeno para la producción de glicerol (Dixon y col., 1999). Mientras que *Metarhizium anisopliae* tiene las proteínas MPL1 homologas de peripilinas para controlar la presión de turgencia, así como la diferenciación del apresorio por la regulación del rompimiento de las moléculas de triacilgliceroles y la consecuente producción de glicerol (Wang y St Leger, 2007b).

La diferenciación del apresorio involucra un mecanismo de percepción de estímulos, principalmente por la superficie hidrofóbica y la transmisión de señales de diferenciación que controlan la activación de la biosíntesis macromolecular y la expresión génica. Para este proceso se requiere la presencia de AMPc, proteína cinasa y proteína G, así como gradientes de concentración de  $Ca^{+2}$  (Khachatourians, 1991).

#### 2.4.4 Enzimas hidrolíticas

Aunque la acción enzimática de los HE es muy compleja, ha sido posible relacionarla con la capacidad infectiva y la patogenicidad sobre insectos (Smith y col., 1981). Además, las

enzimas tienen un papel importante en la invasión de la hemolinfa, la degeneración de los tejidos y en la disminución de la respuesta inmune del hospedero. En *M. anisopliae* estas enzimas están reguladas genéticamente a nivel de la transcripción por una combinación de inducción de sustratos y represión catabólica eficaz por la presencia de cutícula de insecto (St Leger y col., 1991).

Algunos estudios ultraestructurales e histoquímicos sugieren que en el proceso inicial de degradación de la cutícula actúan varias enzimas, casi todas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, como son: Las estererasas no específicas (Estrada y col., 1997) las lipasas, las proteasas, las quitinasas y fenoloxidasas. Éste orden de aparición corresponde también al orden de expresión génica durante la diferenciación del apresorio, precisamente el sitio de mayor liberación enzimática (St Leger y col., 1987).

En consecuencia, según parece, el factor que ha determinado la evolución de los hongos hacia la especialización del hospedero ha sido la producción de enzimas por regulación genética que les ha permitido adaptarse a nichos ecológicos específicos (Bidochka y col, 1999). En *M. anisopliae*, la presencia de las proteasas del tipo subtilisina, se ha relacionado con 11 genes, distintos a los 2 a 3 genes que codifican para las subtilisinas en hongos saprófitos (Freimoser y col., 2003).

#### **2.4.4.1 Proteasas**

Las proteasas son enzimas que hidrolizan las proteínas por sus enlaces peptídicos, de acuerdo a su mecanismo de acción se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas. Las endoproteasas se han clasificado en familias con base en una comparación de los sitios activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional: serin proteasas (EC 3.4.21), cistein proteasas (EC 3.4.22), aspartil proteasas (EC 3.4.23) y metaloproteasas (EC 3.4.24) (Rao y col., 1998).

Se sabe que las proteínas constituyen entre el 60 a 70% de la cutícula de insecto. En consecuencia, las proteasas son los componentes más importantes que alteran la integridad de la cutícula por parte del HE (Charnley, 2003). Además, son utilizadas para: Destruir las proteínas antimicóticas del hospedero, causar proteólisis en hemolinfa y la consecuente desnutrición de los hospederos (Tartar y Boucias, 2004), facilitar la activación proteolítica

para la producción de precursores de diversas toxinas, y la consecuente liberación de aminoácidos da lugar a la producción de aminos que elevan el pH del medio.

En *B. bassiana* se ha encontrado la presencia de la quimioelastasa extracelular (Pr1), relacionada estrechamente con la patogenicidad en *M. anisopliae* (Bidochka y Khachatourians, 1990), así como la serin proteasa Pr2. Las proteasas Pr1 y Pr2 se encuentran presentes en la fase inicial de la germinación conidial, ya que los conidios hidratados de *B. bassiana* pueden liberar las proteasas Pr1, Pr2 y las metaloproteasas, bajo condiciones de agotamiento de nutrientes esenciales, aún antes de la formación del apresorio (Qazi y Khachatourians, 2007); a su vez la Pr1 se secreta durante la conidiación (St Leger, 1996a) y las proteasas Pr2 son secretadas por el apresorio sobre la cutícula y por la hifa dentro de la cutícula (Qazi y Khachatourians, 2008). Puesto que la cutícula del insecto es susceptible a la acción de la Pr1, de naturaleza ácida y básica, se ha sugerido que las enzimas ácidas y básicas se unen en diferentes regiones de la cutícula, la cual posee una distribución heterogénea de cargas eléctricas (St Leger y col., 1996b).

La proteasa Pr1 ha sido señalada como un factor de virulencia importante en *M. anisopliae*, (St Leger 2007). Además, se encontró que en *M. anisopliae*, las proteasas Pr1 activan la cascada de las profenoloxidasas, lo que aumenta la virulencia a través de la modificación del TL<sub>50</sub> pero no de la CL<sub>50</sub> (Fang, 2005). No obstante, poco se sabe de este tema en el caso de *B. bassiana*. Gupta y col. (1994) encontraron que niveles altos de Pr1 producidos por *B. bassiana* parecían estar relacionados con la temprana mortalidad de las larvas de *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae), mientras que los estudios de sobreexpresión de Pr1A resultaron en un aumento de la virulencia en *M. anisopliae*, pero estas observaciones no fueron confirmadas para el caso de *B. bassiana* (St Leger y col., 1996).

Baaga y col. (2004), reportaron que las subtilisinas Pr1 de *M. anisopliae* son 11, están designadas de la A a la K y agrupadas en 4 clústeres de acuerdo a las similitudes en sus secuencias. La Pr1A es la proteína predominante seguida de la Pr1J. Posteriormente, St Leger, (2007), observó la presencia de 13 subtilisinas en la cepa 2575 de *M. anisopliae*.

La secreción de la carboxipeptidasa de *Beauveria bassiana* sobre la cutícula del hospedero indica que provee los aminoácidos indispensables para el hongo, probablemente después de que la proteasa Pr1 solubiliza las proteínas de la cutícula en forma de péptidos (Joshi y col.,

1995). Dada la especificidad de acción de esta proteína, se cree que sirve como mecanismo de adaptación a las estructuras del hospedero. Las metaloproteasas podrían actuar como un respaldo del sistema, complementando la acción de las proteasas Pr1.

En la Tabla 2.3 se muestran las propiedades de las enzimas proteasas reportadas en algunos HE:

**Tabla 2.3** Proteasas reportadas en hongos entomopatógenos

Microorganismo	Actividad	PM, KDa	pl	Autor	año
<i>B. bassiana</i>	Pr1	27		Joshi y col.	1995
<i>B. brongniartii</i>	Proteasa	27	8	Erlacher y col.	2006
<i>M. anisopliae</i>	Pr1A inmadura	41		Zhang y col.	2008
	Pr1A madura	26.3			
	Pr1	28, 29, 30		St Leger y col.	1995
	Pr1	28.6	8.37	Goettel y col.	1989
	Pr1	25		St Leger y col.	1987
	Pr2	27, 30		St Leger y col.	1996a
	Metaloproteasa	12, 103		Qazi y Khachatourians	2007
	Metaloproteasa	103	7.3	St Leger y col.	1994a
<i>Lecanicillium sp.</i>	Elastasa	35		Bidochka y Khachatourians	1987
	Pr1		8.6- 8.8- 9.1, 9.47	Bye y col.	2008
	Pr1		8.92- 8.98		
	Pr2		6.48- 6.3- 5.8		
Pr2		8.92- 8.98.			

La inducción de las proteasas por el efecto de la presencia de la cutícula de los insectos en el medio de cultivo ha sido comprobada en *Beauveria bassiana* por diversos autores en medios de cultivo líquidos (Dias, 2008; Donatti, 2008; Qazi y Khachatourians, 2007) y en cultivo en medio sólido (Barranco-Florido y col., 2002). La Pr1 es inducida en medio mínimo (Freimoser y col., 2005) y reprimida en medio artificial rico y en la hemolinfa de los insectos (St Leger y col., 1996b). Mientras que la proteasa de tipo serina, Pr2, de *M. anisopliae* tiene poca actividad contra la cutícula del insecto (St Leger, 1987) y es inducida por cualquier proteína cuando el hongo crece en un medio sin fuente de N mineral, ya que este ejerce represión sobre ésta.

Los genes homólogos a *creA* y *areA* de *Aspergillus nidulans* han sido reportados en *M. anisopliae* y han sido llamados *crr1* y *nrr1*, respectivamente. Estos genes regulan la producción de proteasas en función de las fuentes de C y N (Screen y col., 1997). Al agregar una fuente de C fácilmente asimilable a un medio de cultivo con cutícula, se reprimió casi totalmente la producción de las subtilisinas, en *Lecanicillium* sp., mientras que al agregarse C y N hubo un efecto sinérgico de inhibición de la actividad de subtilisina (Bye y col., 2008).

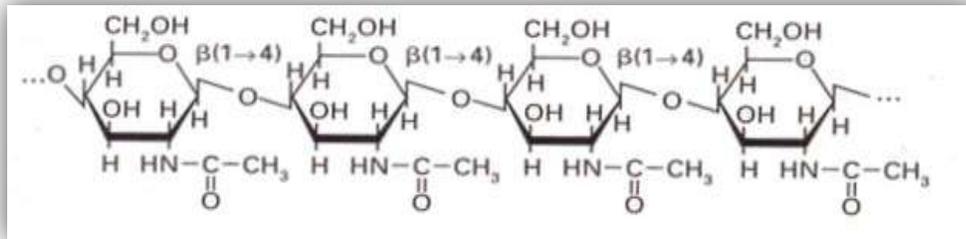
En *M. anisopliae* crecido sobre medio líquido con cutícula de saltamontes, se observó la liberación temprana de Pr2, 24 h antes que la Pr1 (Gillespie y col., 1998). Mientras que Donatti y col. (2008) encontraron en *B. bassiana* la liberación simultánea de éstas. Bye y col. (2008), encontraron que la quitina de camarón y la quitina hidrolizada con KOH indujeron fuertemente la liberación de la subtilisina, esto está posiblemente relacionado con la liberación de monómeros de NAG en baja concentración. Se sabe también que altas concentraciones de NAG, altas concentraciones de glucosa, la presencia de amonio y aminoácidos, como la alanina, reprimen completamente la producción de las proteasas (Qazi y Khachatourians, 2008).

En cuanto a la regulación de la liberación de estas enzimas por el pH del medio, se sabe que los genes que codifican para las proteasas degradadoras de cutícula y otros factores de virulencia están regulados por el pH del medio (St Leger y col., 1998). Bidochka y Khachatourians, (1994a) afirmaron que las proteasas extracelulares de *B. bassiana* actúan primero sobre las proteínas ácidas de la cutícula, y en menor medida sobre las básicas. Dias (2008) encontró que las Pr1 y Pr2 eran inducibles por la proteína presente en la cutícula de la broca del café, pero que estas enzimas son detectables con valores de pH cercanos a su óptimo de acción. El pH de actividad máxima de la Pr1 de *B. bassiana* es 8.5, aún en ausencia de la cutícula de los insectos, cuando la fuente de nitrógeno es mineral (Bidochka y Khachatourians, 1987).

#### **2.4.4.2 Quitinasas**

La quitina, es el segundo polímero más abundantes en la naturaleza, se encuentra constituyendo el exoesqueleto de los insectos, los crustáceos, las conchas de moluscos y la pared celular de los hongos. Es un polímero de cadenas de  $\beta$ -1,4 N-acetil glucosamina, según se muestra en la Figura 2.4, posee estructura cristalina, tiene baja solubilidad, baja

reactividad química, y funciona principalmente como polisacárido estructural (Green y col., 2005), por lo cual la quitina coloidal es la forma más accesible comparado con la quitina cristalina molida. En los hongos, las quitinasas, que pertenecen a la clase III y a la familia 18 de las glicosil-hidrolasas, tienen un papel importante en el crecimiento y la morfogénesis.



**Figura 2.4** Estructura de un polímero de  $\beta$ -1-4-N-acetil-glucosamina

La hidrólisis de la quitina se realiza por un sistema quitinolítico sinérgico y consecutivo conformado por:

- Endoquitinasas (EC 3.2.1.14): Cortan la quitina aleatoriamente en sitios internos, generando oligómeros de bajo peso molecular de N-acetil glucosamina, como: Quitotriosa, quitotetraosa y eventualmente diacetilquitobiosa como producto predominante.
- Exoquitinasas, antes N-acetil glucosaminidasas, reclasificadas como  $\beta$ -1,4 N-acetil hexosaminidasas (EC 3.2.1.52): Dividen los productos oligoméricos de las endoquitinasas y las quitobiasas, generando monómeros de NAG, también pueden catalizar la liberación progresiva de diacetilquitobiosa por el lado no reductor de la molécula de quitina, y por tanto, poseer actividad quitobiasa (EC 3.2.1.52).

Algunas quitinasas presentan actividad lisozima (EC 3.2.1.17) porque liberan diacetilquitobiosas sin la producción de oligómeros (Deshpande, 1986; Matsumoto y col., 2004; Schomburg y col., [www.brenda.uni-koeln.de/](http://www.brenda.uni-koeln.de/)).

Existen niveles basales de quitinasas para liberar inductores de las mismas. En *M. anisopliae* las enzimas quitinolíticas se encuentran reguladas por un mecanismo de inducción y represión. Las proteasas proveen los aminoácidos necesarios para el crecimiento, pero reprimen la síntesis de quitinasas. Al exponer las fibras de quitina y por acción de las hexosaminidasas se liberan fracciones de NAG, las cuales, inducen completamente la

síntesis de quitinasas, lo que al final, redundando en la represión de la síntesis de proteasas hasta que los niveles excesivos de NAG disminuyen (Bidochka y Khachatourians, 1988).

Estas enzimas constituyen un factor de virulencia importante (St Leger y col., 1996a) y sólo se requieren durante un corto periodo de tiempo en el momento de la penetración a la cutícula del hospedero, su mayor producción se observa 40 h después de la inoculación, es decir, durante la fase saprobia después de la muerte del insecto (Havukkala, 1993). Mientras que según estudios de da Silva y col. (2005), se presentaron alteraciones importantes en la estructura de la cutícula de *Boophilus microplus* Canestrini (Acari: Ixodidae) durante la infección por *M. anisopliae*, debido a la presencia de la quitinasa denominada CHIT30 (acción endo y exoquitinasa), según se comprobó por inmunomarcaje, estas lesiones fueron más evidentes hacia las 72 h pos infección.

No ha sido confirmada la participación de las quitinasas en la patogenicidad de *M. anisopliae*, ya que la sobreexpresión del gen *chit1* de *M. anisopliae*, no alteró su patogenicidad contra *Manduca sexta* Linnaeus (Lepidoptera: Sphingidae) (Screen y col., 2001), mientras que la sobreexpresión del gen *Bbchit1* resultó en un aumento de la virulencia de *B. bassiana* contra *Mizus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae), comparado con el fenotipo silvestre (Fan y col., 2007, Fang y col., 2005). Por lo que aún existen muchas contradicciones en lo encontrado en la bibliografía referente a la función de estas enzimas durante el proceso patogénico y los estudios realizados hasta ahora en este sentido no son concluyentes.

Por otra parte, la señal inductora de las quitinasas es la presencia de bajas concentraciones de NAG ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y su represión ocurre con altas concentraciones de NAG ( $5-10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) (Bidochka y Khachatourians, 1988). Las actividades más altas de quitinasas de cepas de *M. anisopliae* se obtuvieron en medios de cultivo con quitina (St Leger y col., 1986a), al adicionar carbohidratos, lípidos y proteínas se reprimió su producción, principalmente por la presencia de glucosa.

St Leger y col. (1993) afirmaron que cada especie puede producir una colección heterogénea de quitinasas, que pueda jugar un papel importante en la adaptación a diversos ambientes, y han reportado la producción de múltiples isoenzimas extracelulares, hasta 18 en *B. bassiana*. Las propiedades de las quitinasas de algunos HE se detallan a continuación en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4** Quitinasas reportadas en algunos hongos entomopatógenos

Microorganismo	Actividad	Gen	PM, KDa	pl	Autor	año
<b><i>B. bassiana</i></b>	Quitinasa		33	5.4	Fang y col.	2005
	Quitinasa		30		Pinto y col.	1996
	Endoquitinasa	<i>Bbchit1</i>			Fan y col.	2007
	Endoquitinasa		45		Havukkala y col.	1993
	Hexosaminidasa 2		66 + 64	5	Bidochka y Khachatourians	1994b
	Hexosaminidasa 1		97	9.5	Bidochka y col.	1993
<b><i>M. anisopliae</i></b>	Endo/Exoquitinasa	<i>chit3</i>	30		da Silva y col.	2005
	Endoquitinasa	<i>Chit1</i>	42			
	Endoquitinasa	<i>chi2</i>	43.5			
		<i>Chit1</i>	45			
	Endoquitinasa	<i>chi11</i>	60			
	Exoquitinasa		110		Kang y col.	1999
	Endoquitinasa		33 y 66			
	Endoquitinasa		45	3.5	St Leger y col.	1996c
		<i>chiA</i>	57			
		<i>chiB</i>	52		Watanabe y col.	1997
	Quitinasa 2		48			
	Quitinasa 1		36			
Endoquitinasa		30		Chaves y col.	2004	

#### 2.4.4.3 Fosfatasas

La proteína tirosina fosfatasa extracelular (PTPasa) observada en *M. anisopliae*, posee un peso molecular de 82.5 KDa, su pl es de 9.5 y el pH de actividad óptima es de 5.5 (Li y col., 2006). Las fosfatasas encontradas hasta ahora en HE parecen cumplir la función de degradar las fosfoproteínas del ambiente. Se cree que estas proteínas, al secretarse dentro del hospedero, podrían estar jugando un papel importante en la patogénesis, a través de la desfosforilación de las fosfoproteínas del insecto. Una de las proteínas que tiene cierta especificidad por la PTPasa de *M. anisopliae* es la trans-Golgi p230, que participa en el transporte vesicular de *Locusta migratoria* Linnaeus (Orthoptera: Acrididae) (Li y col., 2006), por lo que esta enzima estaría probablemente interfiriendo a nivel de la respuesta inmune,

disminuyendo el transporte de la transferrina que el insecto usa como mecanismo de defensa.

#### **2.4.4.4 Análisis de proteínas**

Las proteínas (enzimas en este caso) expresadas por un organismo son un elemento dinámico, ya que varían de acuerdo a su entorno y estado fisiológico, por ejemplo; como consecuencia de la activación o supresión de la expresión de genes. En el estudio de las propiedades de las proteínas se utiliza la técnica de electroforesis, la cual permite separar a las moléculas por su carga bajo la influencia de un campo eléctrico. En particular, la electroforesis monodimensional separa las proteínas de acuerdo a su peso molecular (Garfin, 1990).

Las diferentes combinaciones de los aminoácidos en las cadenas confieren propiedades únicas a la estructura. Es importante conocer su estructura secuencial y para ello se usa un método desarrollado desde 1950 (Sanger, 1952), en el cual se rompe una proteína en fragmentos muy pequeños que se hidrolizan hasta obtener los aminoácidos que la constituyen, los cuales son separados y cuantificados, para generar la secuencia completa. Actualmente se usa una modificación de esta técnica, ya que no es necesaria la secuencia completa debido a la utilidad de las bases de datos que contienen la información y los programas de computación que permiten inferir la presencia de la proteína por homología con las proteínas de otros organismos (Nambudripad y Smith, 2000).

#### **2.4.5 Evasión de la respuesta inmune**

Wang y col. (2006) caracterizaron una proteína, similar al colágeno, que evade la respuesta inmune del hospedero, MCL1. Esta proteína evita el reconocimiento de las células del insecto que encapsularían algún cuerpo extraño presente en la hemolinfa. Además, presenta otra proteína codificada por el gen *mos1* como mecanismo de adaptación a la alta presión osmótica ejercida por la hemolinfa, la cual está involucrada con la formación de los cuerpos hifales, el mantenimiento de la membrana celular y la generación de turgencia intracelular, factores relevantes a su vez en la formación del apresorio.

#### 2.4.6 Toxinas

Los HE producen una variedad de compuestos tóxicos durante el metabolismo secundario, la mayoría de los cuales son activos a bajas concentraciones y contribuyen a elevar su virulencia, como son: La beauvericina, la oosporeina, la bassiacridina, el bassianolide, la tenelina, la bassianina, la ciclosporina A y los beauveriolides (Quesada-Moraga y Vey, 2004; Vey y col., 2001; Boucias y Penderland, 1998).

El ácido oxálico es un factor sinérgico que mejora la actividad hidrolítica de las quitinasas y las proteasas (Khachatourians, 1991) al acidificar el medio y proveer condiciones de óptima actividad enzimática. Por otra parte, *Beauveria bassiana* produjo ácido cítrico y oxálico cuando se cultivó en medios líquidos que contenían cutícula de saltamontes, el cual puede solubilizar las proteínas estructurales (Bidochka y Khachatourians, 1993), ya que posee pKs de 1.3 y 4.3 (Bidochka y Khachatourians, 1991). Sin embargo la relación de ésta molécula y la virulencia es materia de controversia.

#### 2.4.7 Esporulación de *Beauveria bassiana*

La esporulación de los HE sobre el insecto no es directamente un factor de virulencia, pues ésta ocurre posterior a la muerte del insecto, durante la fase saprobia. Sin embargo, el proceso de producción de las esporas según el medio y las condiciones de cultivo, es un factor clave en la determinación de las características fenotípicas de la unidad infectiva para dar inicio al ciclo infectivo.

La reproducción de los hongos anamorfos se da por la formación de esporas. La mayoría de los hongos requieren condiciones de estrés (como la nutricional entre otras) para que se inicie la esporulación. Este proceso está regulado a nivel génico (Freimoser y col., 2005). Un modelo de estudio de este fenómeno ha sido el hongo *Aspergillus nidulans*. Se conoce que para el inicio de la esporulación, el hongo debe tener un aporte bajo de nitrógeno y condiciones de oxidación o alguna condición de estrés. Un aporte constante de glucosa favorece la elongación del conidióforo, no obstante, este evento es detenido si se aumenta la concentración de los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) intracelular. Las conidiosporas se producen en un conidióforo, que consiste en una célula que forma un pie y que soporta el crecimiento de un tallo hifal que termina en las métulas, cada una, con dos o tres fiálides que a la vez producen

conidios. Los conidios se producen al inicio de la punta de la fiálide (en *A. nidulans*). La formación de las paredes externas del conidio es una extensión de la pared interna de la fiálide (Adams y col., 1998).

Varios genes han sido identificados participando en el proceso de conidiación de *M. grisea*, como son los genes: *smo1*, *con*, *app*, *apf1* (Tenjo y Hamer, 2002). Estos, están asociados a la morfología y a la producción del apresorio. Además, están regulados por factores como el AMPc, ya que las mutantes del gen *mac1*, que codifica para la adenilato ciclasa, tienen reducida la conidiación, la germinación y alterado el crecimiento vegetativo (Adachi y Hamer, 1998)

Según Shah y col. (2005), la máxima producción de esporas de los HE *B. bassiana* y *M. anisopliae* la obtuvieron al cultivarlos sobre medios con una relación C: N de 35, comparado con medios con relaciones C: N de 10, de 75 y con medios alterados osmóticamente. Jackson (1997) estandarizó un medio de cultivo para la producción de esporas de *Colletotrichum truncatum* en cultivo sumergido suplementado con metales trazas, vitaminas, y una fuente de carbono y nitrógeno orgánicos; las mayores producciones de esporas las encontró con concentraciones de carbono de 4 a 16 g l<sup>-1</sup> y a relaciones C: N de 30: 1, aunque las esporas obtenidas en medio de cultivo de relación 10: 1 presentaron mayor virulencia, germinaron más rápido, y formaron mayor cantidad de apresorios sobre *Sesbania exaltata*.

Las alteraciones en las cualidades de las esporas obtenidas según el medio de producción, han sido reportadas en relación al fenómeno de protección cruzada. Este es un fenómeno observado en hongos que, como respuesta a cierto tipo de estrés, presentan tolerancia a varios otros tipos de estrés (Hohmann y Mager, 2003; en Rangel y col., 2008). El estrés nutricional en *M. anisopliae*, creciendo sobre fuentes no preferentes de carbono, se ha asociado a un aumento en las concentraciones de carbohidratos de reserva dentro del conidio, inducidos por bajos niveles de AMPc, lo que parece redundar en una mayor tolerancia a la radiación UV-B y al calor y en algunos casos con el costo de la baja producción conidial (Rangel y col., 2006; Rangel y col., 2008). En 2004, Rangel y col. demostraron que los conidios de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, producidos sobre cadáveres de insectos, fueron menos tolerantes a los rayos UV-B, que los producidos en un medio artificial rico. Tal vez porque el cadáver del insecto es el sustrato evolutivamente adaptado

para el crecimiento del patógeno, por lo que es probable que se estuvieran reprimiendo los genes relacionados con el estrés. Shah y col. (2005) demostraron que el estrés generado en *M. anisopliae* por el crecimiento en un medio que producía estrés osmótico (KCl, 5.5%) resultó en una mayor virulencia contra larvas de *T. molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), aún cuando la producción conidial fue menor que en los otros medios estudiados con diversas relaciones C: N. Además que las esporas producidas en este medio presentaron mayores niveles de transcripción y de secreción de Pr1. Santoro y col. (2007) evaluaron la influencia del sustrato sobre la virulencia de los conidios de *Beauveria bassiana* producidos en arroz, insectos y medios sintéticos, cada uno de los aislados presentó un claro comportamiento diferente, aunque, coincidieron todos estos estudios en que los conidios producidos en los insectos tuvieron la virulencia más baja contra *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae).

Es de notarse que, los conidios son mayormente utilizados en CB por su virulencia y resistencia a las condiciones adversas del medio como la radiación UV y la desecación (Thomas y col., 1987). Éstos pueden ser producidos en cultivo en medio sólido y en medio líquido; las blastosporas se producen en medio líquido dependiendo de la fuente de carbono del medio de cultivo y de la presencia o ausencia de nitrato como fuente de nitrógeno. Algunas de las diferencias que presentan estos dos tipos de propágulos sobre la cutícula de los insectos, se basan en la arquitectura de la superficie, ya que los conidios aéreos tienen una pared rugosa, mientras que en las blastosporas es lisa (Thomas y col., 1987), lo cual finalmente afecta factores de virulencia como son la adhesión y la germinación.

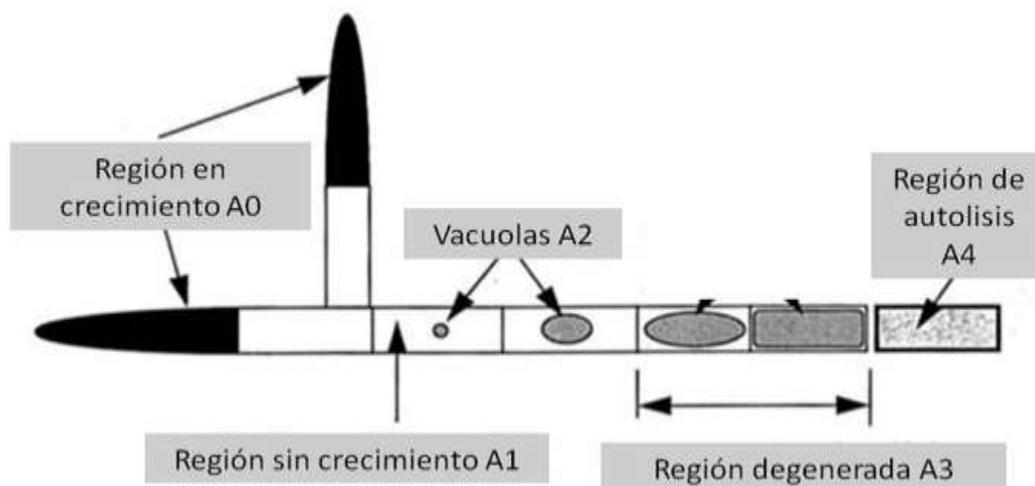
## **2.5 Crecimiento de los hongos**

### **2.5.1 Proceso de crecimiento hifal**

Durante la morfogénesis de la pared celular de los hongos, los genes de la quitina sintasa se expresan en respuesta a las condiciones ambientales, o durante ciertas etapas del crecimiento (Tartar y col., 2005). La dirección del crecimiento celular y la ramificación se establecen por polaridad celular, la cual, se define por interacción de gradientes del ión  $Ca^{+2}$ , de los mensajeros secundarios como el AMPc, la proteína G y la presión de turgencia. Estos, permiten el transporte de vesículas a lo largo de todo el micelio a través de filamentos de

actina a una velocidad constante hasta la punta más cercana para el crecimiento hifal (Grimm y col., 2005).

Por otra parte, Paul y Thomas (1996) definieron 4 zonas claras en el crecimiento del micelio en cultivo líquido, en el desarrollo de un modelo de simulación del crecimiento en lote de *Penicillium chrysogenum* para la producción de penicilina. Las zonas descritas desde la región apical son: A0, la cual crece activamente; A1, es la zona de citoplasma que no crece; A2, es la zona de alta concentración de vacuolas; A3, es la región inactiva o degenerada; A4, es la zona de autólisis (Figura 2.5). Como el crecimiento se da en la región A0 y la ramificación en la región A1, se forman septos y la parte de la hifa vieja que alguna vez fue apical, se convierte en una región de hifa que no crece. Por tanto en el momento en que se presentan condiciones de estrés, como la limitación de nutrientes, ocurre el proceso de diferenciación. Por medio de este proceso, la región hifal A1, pasa a ser la región hifal A2, que se llena de vacuolas, y son estos dos tipos de regiones las responsables de la síntesis de la penicilina. Las hifas en la zona A2, donde las vacuolas crecen y ocupan la mayoría del compartimento hifal, degeneran y se vuelven inactivas, y puede ocurrir autólisis (zona A4), acompañada de muy diversas reacciones enzimáticas.



**Figura 2.5** Modelo de regiones diferenciales del crecimiento hifal.

Tomado de Paul y Thomas, 1996

En cuanto al fenómeno de la supresión del crecimiento o muerte celular, Emri y col. (2006) mencionaron que la autólisis fúngica es un fenómeno activo, regulado genéticamente, dependiente de la síntesis de proteínas *de novo*, y de gran importancia para la industria, por

la necesidad de controlarse y así evitarse o mejorar la producción de metabolitos secundarios. Estos mismos autores mencionaron también, que la autólisis está relacionada con una producción alta de hidrolasas del tipo de las quitinasas y de las proteasas, y está regulada por represión catabólica en *Emericella nidulans*. Del mismo modo, Aguirre y col. (2005) propusieron que el crecimiento y los estados diferenciados son condiciones estables en las cuales la célula mantiene el equilibrio entre los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas y las eliminadas. Los momentos en que aumentan los niveles de ROS, principalmente ocurren durante el inicio de la fase estacionaria y en el comienzo del desarrollo asexual de algunos hongos.

Una vez terminado el sustrato disponible para el crecimiento, los hongos se encuentran en condiciones de estrés que podrían generar una alteración en la morfología y la consiguiente muerte celular. Wang y col. (2005a) demostraron que la sectorización en las colonias de *M. anisopliae* era debido a mutaciones generadas por el estrés oxidativo y en la regulación de genes relacionados con el envejecimiento. Asimismo, estos fenómenos tienen que ver con las alteraciones de la virulencia de los HE debido al cultivo repetitivo por medios de cultivo artificiales, que podrían también alterar la morfología de las mismas, aunque la razón para ello no está totalmente esclarecido (Wang y col., 2005a).

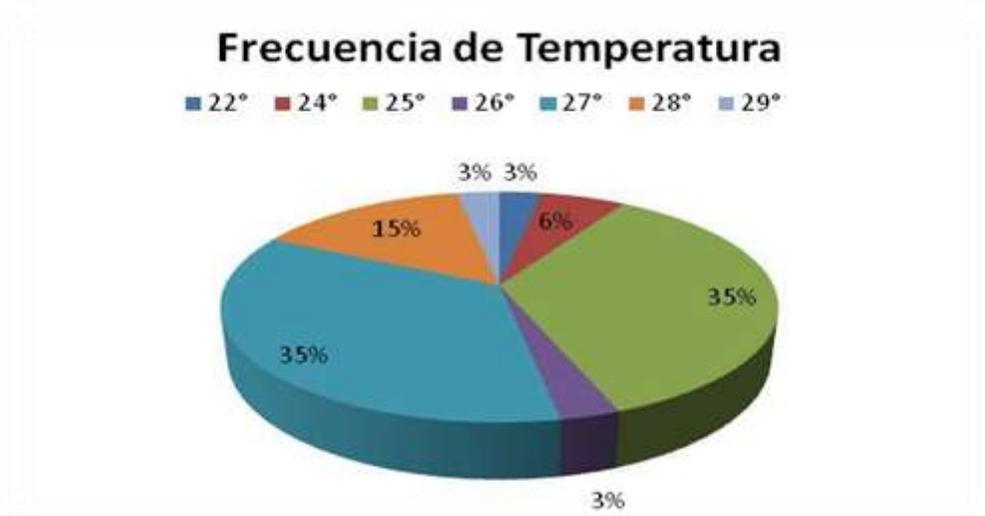
### 2.5.2 Morfometría de hongos filamentosos

El crecimiento rápido vegetativo de los HE puede ser una ventaja para su aplicación en CB debido a la reducción en el tiempo necesario para la producción, así como en la estrategia de competición durante la fase saprobia y patogénica (Varela y Morales, 1996). Por lo que se hace necesario evaluar este parámetro de una forma completa en el laboratorio. Dentro de las metodologías disponibles para la evaluación morfométrica de hongos, se encuentra la utilización de los modelos cinéticos, como la estimación del crecimiento en superficie sólida, a través de técnicas de procesamiento de imágenes de cultivos sobre placas de agar. Este podría ser un modelo adecuado porque se acercaría al hábitat natural de la fisiología de los micelios. Larralde-Corona y col. (1997) desarrollaron un modelo de evaluación de la morfometría en *Aspergillus niger*, el cual fue aplicado posteriormente a la evaluación de cepas mejoradas genéticamente hacia la producción de enzimas específicas (Loera y Viniegra-González, 1998). Este modelo no ha sido utilizado para evaluar esta característica

de crecimiento asociada a factores de virulencia en hongos patógenos, los cuales tienen como principal componente de su metabolismo, la excreción de enzimas.

### 2.5.3 Efecto de la temperatura en el crecimiento de *B. bassiana*

La temperatura a la que está expuesto el HE puede afectar la germinación y el crecimiento. Las altas temperaturas inactivan el ACB, y las bajas pueden retrasar la germinación. El crecimiento de *Beauveria bassiana* pueden ocurrir entre 5 y 35°C, pero el intervalo óptimo está entre los 23 y 28°C, dependiendo de las características de la cepa en cuanto a su ubicación geográfica y condiciones climáticas del lugar de aislamiento. Después de realizar un análisis bibliográfico (30 artículos) de la frecuencia de temperaturas utilizadas en experimentos de crecimiento de *B. bassiana*, según se muestra en la Figura 2.6, los mayores porcentajes fueron encontrados a la temperatura de 25 y 27°C, seguido de 28°C. Aunque, es recomendable siempre caracterizar las cepas con base en las condiciones óptimas de crecimiento. En el presente estudio se tuvieron en cuenta estos intervalos para el análisis de la temperatura que ofreciera las menores diferencias en el crecimiento entre las cepas. Además, de evaluar un intervalo amplio debido a que fueron cepas provenientes de Oaxaca, estado de la República Mexicana que cuenta con variedad de climas debido a su compleja geografía.



**Figura 2.6** Distribución de las frecuencias de las temperaturas de crecimiento de *Beauveria bassiana*

#### 2.5.4 Crecimiento en cultivo en medio sólido (CMS)

Los hongos pueden crecer sobre un amplio rango de sustratos sólidos biodegradables como piezas de madera, semillas, raíces, partes secas de animales y para este caso en particular, restos de cutícula de algunos insectos. La producción de ACB por el método de cultivo en medio sólido ha sido propuesta como una alternativa económica, ya que los conidios son similares a las producidas naturalmente en la superficie de cadáveres de insectos y son superiores a los micelios y blastosporas producidas bajo condiciones de cultivo sumergido (Roberts y St Leger, 2004; Wraight col., 2001).

El CMS involucra el crecimiento de los microorganismos sobre partículas de sustrato sin escurrimiento de agua visible en el espacio intersticial (Mitchell y col., 2000). En CMS, el agua necesaria para el crecimiento microbiano existe en un estado absorbido o en forma de complejo con la matriz sólida. Sin embargo, el CMS difiere del cultivo en sustrato sólido, ya que el sustrato en sí actúa como una fuente de carbono mientras que en CMS se usa un soporte no biodegradable (Bhargav y col., 2008).

Los aspectos de CMS a considerar son: i) La actividad de agua del sustrato, que es un parámetro útil en la evaluación de la disponibilidad del agua, como el estado energético del agua en la transferencia de masa del sustrato a la célula; ii) La humedad, que puede limitar el crecimiento fúngico, resultando en limitaciones por generación del calor; iii) La tasa de aireación, que permitiría un adecuado control de la humedad y de la temperatura del cultivo (Mitchell y col., 2000).

En el CMS, el crecimiento de los hongos está restringido generalmente a la superficie de una matriz sólida (Papagianni, 2004), donde el desarrollo micelial va creando un sistema compuesto de tres zonas claramente distinguibles, según se muestra en la Figura 2.7. La zona 1, en la que el micelio aéreo se encuentra espaciado, es en muchos casos la región donde ocurre hasta un 75% del consumo de oxígeno; en la zona 2, las hifas forman un entramado muy denso y quedan inundadas por la cantidad relativamente pequeña de líquido del medio ambiente, se trata de una zona donde existe una fuerte limitación en la difusión de oxígeno al no haber convección forzada del líquido como en la fermentación líquida (Oostra y col., 2001); la zona 3, está constituida por las hifas que penetran al material sólido usado como soporte y sustrato y que permiten al hongo acceder a más nutrientes. La capa se ha

caracterizado por estar en un estado anoxigénico, es decir, con muy baja presión parcial de oxígeno (Rahardjo y col., 2002).



**Figura 2.7** Esquema del crecimiento de los hongos filamentosos en cultivo en medio sólido. Tomado de Rahardjo y col., 2002

### 2.5.5 Modelos de crecimiento en CMS

La comprensión y la estimación del crecimiento en un cultivo sólido son importantes a fin de explicar su fisiología y para la selección de las cepas patógenas para su producción en gran escala. Una de las ventajas de la medición de la tasa de respiración con respecto a otros métodos indirectos, es la posibilidad del seguimiento automatizado en línea durante el cultivo, de manera no invasiva (Saucedo-Castañeda y col., 1994). Pues, el consumo de oxígeno y la producción de  $\text{CO}_2$  son el resultado de la actividad metabólica de los microorganismos a partir de la cual obtienen la energía necesaria para su crecimiento y su mantenimiento (Camargo y col., 2005). El uso de la respirometría como elemento indirecto para estimar el crecimiento tiene una dificultad metodológica. Supone que la producción de  $\text{CO}_2$  (o el consumo de  $\text{O}_2$ ) tiene un coeficiente de rendimiento respiratorio ( $r$ ) que es igual para toda la biomasa presente, pero es sabido que la tasa respiratoria específica ( $q_{\text{O}_2}$ ) sufre un descenso brusco cuando se llega a un punto crítico de la densidad de la biomasa (Viniestra-González, comunicación personal). Smits y col. (1999, en Lareo y col., 2006) propusieron que la actividad respiratoria de la biomasa disminuye a finales de la fermentación en un proceso denominado "inactivación". Se ha sugerido que tal inactivación puede ocurrir cuando el sustrato está limitado o los productos se forman en concentraciones tóxicas. Esto es análogo a la muerte como resultado de los procesos de envejecimiento intrínseco. De esta forma, la técnica de evaluación de la biomasa puede asociarse a modelos cinéticos de predicción del crecimiento, y de la influencia de las variables evaluadas dentro del proceso.

### 2.5.5.1 Modelos de crecimiento Logístico y Gompertz

Los modelos Logístico y Gompertz son modelos simples y permiten dar una aproximación de todas las etapas de la curva de crecimiento de los microorganismos, aunque tienen limitaciones hacia el final de la producción de la biomasa en la fase estacionaria, cuando se presenta la muerte celular, al considerar que la curva de crecimiento vuelve a cero después de la fase de desaceleración. El modelo Logístico es simétrico alrededor del punto de inflexión y por tanto la velocidad de aceleración y desaceleración son iguales, contrario al modelo de Gompertz, el cual presenta mayor flexibilidad (Mitchell y col., 2004; Zwietering y col., 1990).

### 2.5.5.2 Modelo de Ikasari y Mitchell

Ikasari y Mitchell (2000) evaluaron el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* sobre membranas de policarbonato. A través de este modelo, se consideró que el perfil de crecimiento consistía en una rápida aceleración seguida de un periodo donde la velocidad desaceleraba lentamente, la cual fisiológicamente corresponde al momento en que hay tal crecimiento que las hifas se tocan entre ellas, hay interacciones y algunas hifas detienen su extensión porque todo el espacio del sustrato está ocupado, o alcanzan una longitud crítica, o se vuelven inactivas. En este momento puede iniciar la producción de micelio aéreo y la formación de estructuras de reproducción. Este modelo considera dos fases: Una de crecimiento exponencial y otra de desaceleración, con las correspondientes velocidades de cada fase. Incluye también, un factor  $L$  que se describe como el factor de sobrevivencia de la punta hifal, determinada por los segmentos activos entre los segmentos inactivos, inmediatamente después de iniciada la fase de desaceleración. El modelo incluye también el concepto de biomasa activa, que considera que del total de la biomasa observada, solo una fracción de ésta se encuentra activa, y aunque la biomasa inactiva no contribuye al crecimiento si pudiera estar involucrada en metabolismo secundario. En 2007, el grupo de investigadores liderado por Rinzema, publicó un modelo de crecimiento de dos fases aplicado a CMS dependiente de la temperatura, utilizando datos de tasas respiratorias como estimación de la biomasa, evaluaron los parámetros sobre el hongo *Aspergillus niger* (Hamidi-Esfahani y col., 2007), resultó ser un modelo que ofrecía más parámetros como coeficientes de inactivación de la biomasa debido a la temperatura, y al haber sido aplicado en CMS, serviría para el

monitoreo de los reactores, además que mostró un ajuste más adecuado para el periodo de transición entre la primera y segunda fase que el modelo de Ikasari y Mitchell.

## **2.6 Mutantes**

En la naturaleza, las cepas mutan de manera natural provocando variaciones ligadas a la selección en la población. Para el estudio de los mecanismos involucrados en la virulencia se han producido cepas mutantes de *B. bassiana* a través de varios métodos, como radiación ultravioleta (Paccola-Meirelles y Azevedo, 1991) y nitroso guanidina (Khachatourians, 1996), y la recombinación parasexual entre distintos géneros de *Beauveria* (Viaud y col., 1998).

## **2.7 Fenotipo de resistencia a 2-desoxiglucosa**

Virtualmente todas las células poseen un programa genético sofisticado que responde a la glucosa como fuente de carbono y de energía (Santangelo y col., 2006). La represión por glucosa es el mecanismo por el cual la célula se adapta para la fermentación de la fuente de carbono preferencial, al reprimir una cantidad de genes a nivel de transcripción cuando más de una fuente de carbono está presente en el medio, hasta que el sustrato primario (glucosa) se haya agotado (Diderich y col., 2001). Los genes estructurales poseen la información para la síntesis de una enzima destinada a la utilización de otras fuentes de carbono, los cuales están normalmente inactivos en ausencia del sustrato para dicha enzima, por lo que está reprimida la producción de la enzima y solamente se activan cuando se agrega el sustrato requerido, en ese caso se dice que la enzima es inducible.

La represión por glucosa involucra rutas de transducción de señales activadas por niveles de glucosa extracelulares e intracelulares, por enzimas clave y por flujos metabólicos, los cuales han sido estudiados en *Saccharomyces cerevisiae*, levadura modelo de sistemas eucarióticos (Westergaard y col., 2007). Una de las vías es cuando la glucosa extracelular es detectada por dos proteínas la Snf3p y la Rgt2p, su señal se traduce en la activación de transportadores de hexosas (genes *hxt*, se conocen 20 en *Sacharomyces cerevisiae*). En la otra vía no se conocen los sensores involucrados, pero la enzima hexocinasa juega un papel importante al comunicar la presencia de la glucosa intracelular y activar una cascada de fosforilaciones (Westergaard y col., 2007). La hexocinasa II (gen *hvk2*) es la hexocinasa

dominante de la fosforilación de la glucosa, y la reguladora del flujo a través de la glucólisis (Westergaard y col., 2007), la cual actúa en paralelo con la vía AMPc - proteína cinasa A.

El compuesto 2-desoxiglucosa (2-dog), es un análogo de la glucosa que entra a la célula por medio de los transportadores de la glucosa y al ser fosforilado, origina el compuesto tóxico 2-desoxiglucosa-6-fosfato (2-dog-6-P) (Randez-Gil y col., 1998), el cual causa daño al impedir la síntesis de la pared celular y causar la desintegración del citoplasma (El-Ghaouth y col., 1997). Las cepas que desarrollan resistencia a la 2-dog, resultan frecuentemente, menos sensibles a la represión por carbono en diversos grados, con un efecto pleiotrópico causando que diversas enzimas se produzcan en condiciones en las que normalmente se encuentran reprimidas por carbono (Allen y col., 1989), como sería en presencia de glucosa.

La resistencia a la 2-dog se ha utilizado como criterio de selección para la obtención de cepas sobreproductoras de enzimas y de otros metabolitos de interés, por ejemplo, se ha empleado como un criterio de selección de mutantes desreprimidas catabólicamente y sobreproductoras de pectinasas (Antier y col., 1993; Minjares-Carranco y col., 1997), de ácido cítrico y de amilasas (Suzuki y col., 1996) y de celulasas (Parvez y col., 1998).

No se conoce el mecanismo exacto por el que la resistencia a 2-dog confiere el fenotipo de desrepresión catabólica. Sin embargo, hay evidencias de que está ligado principalmente a la pérdida de actividad glucosa cinasa. Se ha observado en mutantes por eliminación del gen *hvk2* de *Sacharomyces cerevisiae* que presentaron una mayor capacidad respiratoria, la producción de biomasa sobre glucosa fue el doble que en la cepa silvestre y se acompañó de una baja en la producción de etanol, ésto se explica porque al sustraer los genes *hxt*, resulta una disminución en la toma de la glucosa, y por tanto, esta disminución del flujo ocasiona la desrepresión y por tanto, menor fermentación y aumento en la respiración (aumento de los genes del ciclo de Krebs, y de la respiración) (Westergard y col., 2007). Diderich y col. (2001) observaron también, que en ausencia de la hexocinasa II en *Sacharomyces cerevisiae* los transportadores de glucosa de alta afinidad se encontraban presentes aún a altas concentraciones de glucosa, y tuvieron crecimiento oxidativo completo. La interrupción del gen *grr1* (glucose repression resistant) en *Sacharomyces cerevisiae* resultó en una disminución en la expresión de varios genes *hxt* resultando en una reducida toma de glucosa del medio, sensibilidad aumentada a la falta de nitrógeno y al estrés osmótico y pérdida del transporte de aminoácidos aromáticos (Ozcan y Jhonston, 1999). La

ausencia de los genes, *grr1* y *hvk2* conllevó a un grado elevado de pleiotropía cuando las células fueron crecidas sobre glucosa (Westergaard y col., 2007). También se asoció a fenotipos como elongación de la morfología celular, transporte de cationes disminuido, defectos en la esporulación, crecimiento lento, defectos en la síntesis de los aminoácidos.

Otras características de las cepas resistentes a 2-dog han sido reportadas en diversos hongos. Minjares-Carranco y col. (1997) relacionaron este fenotipo con alteración en la esporulación en cepas mutantes sobreproductoras de pectinasas. En algunas pruebas realizadas con cepas silvestres de *M. anisopliae*, se mostró que la cepa que creció bien en un medio que contenía 2-dog y glicerol, mejoró la germinación, frente a la cepa que no presentaba resistencia, la desoxiglucosa alteró eventos morfogénicos en medio sólido incluyendo la formación de hifas aéreas y conidiación (St Leger y col., 1994b). En cepas mutantes de *Penicillium echinulatum*, se encontró una mayor producción de actividad celulasa y colonias más pequeñas (Dillon y col., 2006). De la misma manera, las cepas mutantes de *Schizosaccaromyces pombe* resistentes a 2-dog produjeron entre 5 y 16 veces mayor actividad de invertasa en medio de glucosa que las cepas silvestres, los porcentajes de consumo de glucosa fueron variables entre las cepas dependiendo del grupo de alteración en la que se encontraban dichas cepas (Kig y col., 2005).

## **2.8 Insectos**

Los insectos abarcan el grupo de animales más diverso sobre la tierra, con aproximadamente 1.5 millones de especies descritas (Kunimi, 2007). Poseen una capa externa rígida, patas articuladas y el cuerpo dividido en segmentos generalmente bien diferenciados. Varios insectos del orden Coleóptera constituyen plagas de postcosecha de importancia económica, tanto las larvas como los adultos son los responsables de los daños.

Algunos conceptos relacionados se encuentran en el anexo B

### **2.8.1 Tenebrio molitor**

Según la clasificación taxonómica de *Tenebrio molitor*, es un insecto de la clase Endopterigota, pertenece al orden Coleóptera y a la familia Tenebrionidae (The National Center for Biotechnology Information, NCBI tax browser, 2009). Como características morfológicas, poseen dos pares de alas, las delanteras, son endurecidas y son llamadas

elitros. Las alas internas, son membranosas y usadas para volar. Estos insectos poseen metamorfosis completa, con las etapas de huevo, larva, pupa y adulto. La larva se especializa en la búsqueda de distintos tipos de alimentos; la pupa, es una etapa de quietud, y el adulto que se especializa en la reproducción y la dispersión (Pedigo, 1996).

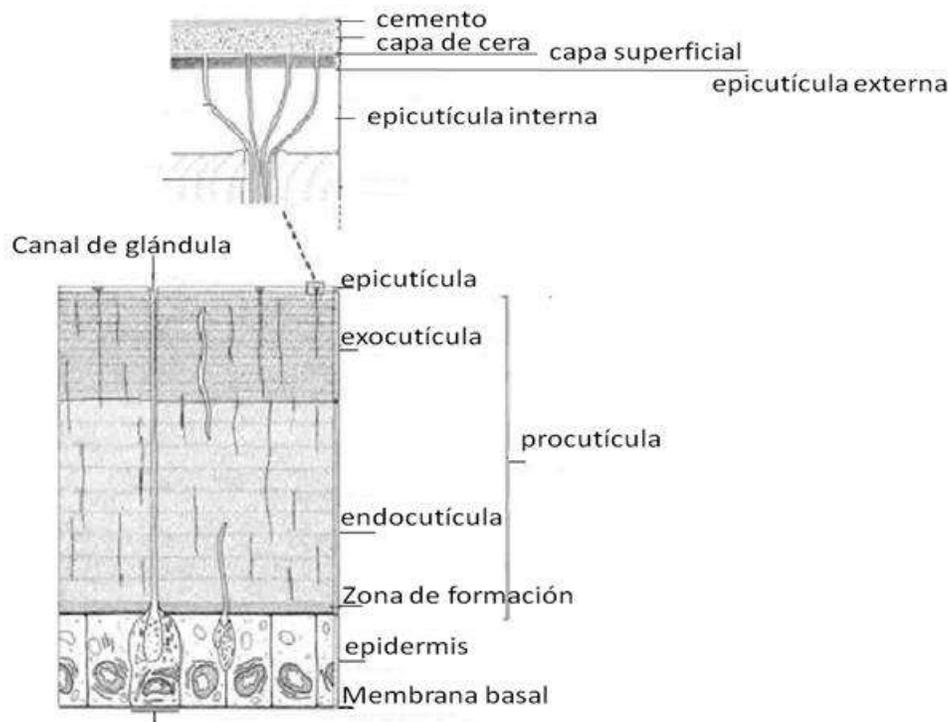
La familia Tenebrionidae (escarabajos oscuros) contiene más de 100 especies relacionadas con los productos almacenados, entre los que destaca *Tribolium castaneum* Herbst y *Tribolium confusum* J. du Val. Por otra parte *Capnodis tenebrionis* Linnaeus, es una plaga primaria de algunas cosechas frutales en el este de Europa y el Mediterráneo (Marannino y col., 2006) y *Alphitobius diaperinus* Panzer, es una de las plagas principales de la avicultura moderna, por colonizar el alimento en los aviarios (Rohde y col., 2006).

*Tenebrio molitor* L. (Yellow Mealworm) se encuentra distribuido por todo el mundo. Las larvas son muy voraces, se alimentan de una gran variedad de productos como: Granos, harinas, tabaco, y comida en general, y altamente resistentes a temperaturas extremas, ya que pueden permanecer vivas durante 80 días a -50°C (Sallam, 2008). Los adultos de *Tenebrio Molitor* L. son utilizados por el parásito *Hymenolepis diminuta* como hospedero intermediario para facilitar su transmisión a la rata, que es su hospedero definitivo, al alimentarse de las heces de las ratas (Shea, 2003).

*Tenebrio Molitor* ha servido como modelo de investigación en muchos estudios de laboratorio debido a que son fáciles de adquirir de manera comercial. Además, su cría dentro del laboratorio es muy sencilla, debido al tipo de alimentación y las condiciones para su mantenimiento.

### 2.8.2 Cutícula de los insectos

La cutícula de los insectos no sólo actúa como una barrera entre el insecto y el mundo exterior, sino que también sirve como exoesqueleto en el que se insertan los músculos de la locomoción. Una consecuencia de la posesión de un exoesqueleto rígido es el proceso de muda, necesario para permitir que los estados larvarios aumenten de tamaño. El esquema básico de la cutícula de un insecto (Figura 2.8) muestra una construcción multilaminar, que es el producto de la secreción de una única capa de células epidérmicas que contiene glándulas especializadas y receptores sensitivos.



**Figura 2.8** Esquema de las capas que componen la cutícula de los insectos

La cutícula se compone de las siguientes capas de afuera hacia dentro:

En las capas superpuestas podemos distinguir una **epicutícula** muy fina, **procutícula** que consta de una exocutícula pigmentada, dos capas no pigmentadas: La mesocutícula y la endocutícula.

La **epicutícula** no es quitinosa, contiene lípidos y proteínas; es mecánicamente frágil, de solo unas micras de grosor y sería fácilmente penetrada. La capa más externa, llamada cemento, una sustancia proteica pigmentada que se comporta como una cubierta barnizada. La capa superficial y la capa de cera, impiden la pérdida de agua en estos animales. La capa más interna, es homogénea y contiene láminas de una lipoproteína llamada cuticulina, estabilizado por quinonas, proteínas, polifenoles y fenolasa, que es responsable de la dureza (Pedigo, 1996).

La **procutícula**, los principales componentes de la exocutícula, la meso y la endocutícula son la quitina (25-40%) y las proteínas (75-80%), la proporción está determinada por la especie en cuestión.

La **exocutícula**, es la capa más gruesa, le da la fuerza y resiliencia a la estructura (propiedad similar a la elasticidad) está formada por quitina y quinonas, las cuales, derivan principalmente de la hemolinfa. Algunas se incorporan directamente, otras son metabolizadas a melanina o a la formación de esclerotinas, y el entrecruzamiento de moléculas proteicas en la cutícula, tiene alto contenido de tirosina que les impide los movimientos libres, al tiempo que la cutícula se hace tenaz, inflexible y oscura (Pedigo, 1996).

Con cada muda, el líquido exuvial, secretado por las **células epidérmicas**, digiere la **endocutícula**, que es posteriormente reabsorbida por estas células. Los productos se usan para la deposición de la cutícula del próximo estado larvario, pero la exocutícula no puede ser reabsorbida, debido al proceso de pigmentación, y por tanto se elimina durante la ecdisis. El sistema traqueal, es esencial para el transporte de gases en los insectos, se compone de tráqueas que se forman en grupos y se abren al exterior a través de los **espiráculos**, a cada paso de la mayoría de los segmentos del cuerpo (Pedigo, 1996).

### 2.8.3 Susceptibilidad de los insectos al ataque de los microorganismos

La susceptibilidad de los insectos a los hongos patógenos varía según la etapa de desarrollo. La etapa de adulto del trips de las flores de leguminosa, *Megalurothrips sjostedti* Trybom (Thysanoptera: Thripidae), resultó ser más susceptible a la infección por *M. anisopliae* que las etapas larval y pupal (Ekesi y Maniania, 2000). Ekesi y col. (1999), encontraron que los adultos de *Clavigralla tomentosicollis* (Hemiptera: Coreidae) eran más susceptibles que las ninfas al ataque por *M. anisopliae* y a *B. bassiana*. Los adultos de *Frankliniella occidentalis* Pergande (Thysanoptera: Thripidae) son más susceptibles a *M. anisopliae* en comparación con las etapas larvales (Vestergaard y col., 1995; Maniania y col., 2001). En las mosquitas blancas, la susceptibilidad a *Aschersonia aleyrodis* disminuye con la edad, pues las primeras etapas son mucho más susceptibles a la infección que las últimas fases (Fransen y col., 1987).

Cuthbertson y col. (2005) estudiaron la susceptibilidad de los estadios larvales de *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) a *Lecanicillium muscarium* y encontraron que el segundo estadio, en general, fue más sensible a las infecciones. Osborne y col. (1990) también informaron que los terceros instares de distintos insectos fueron menos susceptibles

a la infección por hongos que los de segundo instar. Según James y col. (2003), los instares segundo y tercero de *Bemisia argentifolii* Bellows & Perring. fueron más susceptibles a *B. bassiana*, mientras que el segundo instar fue más susceptible a *P. fumosoroseus*. Las larvas de *A. diaperinus* Panzer fueron 5 a 6 veces más susceptibles que los adultos a una variedad de cepas de *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *P. farinosus*, *P. fumosoroseus*, *M. anisopliae*, *L. lecanii*, *Acremonium* sp. y *Fusarium* sp. (Steenberg y Jespersen, 1996, En: Chernaki-Leffer, 2007). Rohde y col. (2006) seleccionaron cepas de *B. bassiana* que actuaban contra adultos de *A. diaperinus* P., estos autores observaron que, de 59 cepas, sólo siete causaron mortalidades superiores al 50%. Sin embargo, para los estadios larvales, 38 cepas causaron muertes confirmadas superiores al 50%, las diferentes susceptibilidades entre los adultos y las larvas fueron probablemente vinculadas a su capacidad de penetrar el integumento de los insectos.

Las diferencias de la infección relacionada a la etapa de desarrollo podrían estar asociadas a la naturaleza de la superficie de la cutícula de los adultos de la familia Coleóptera y a la presencia de algunas sustancias externas, como el mucílago, que puede mejorar la adhesión de los conidios (Hajek y St Leger, 1994). Además, la presencia de membranas bajo las elitros y la abundancia de espiráculos, canales de poros y espacios Intersegmentales que podrían hacer más fácil la penetración de los micelios en los adultos, en comparación con las larvas. Otro factor importante puede estar relacionado con el proceso de ecdisis. Vestergaard y col. (1999) describieron la presencia de pocas esporas adheridas a la exuvia arrojada o desechada de las larvas y las pupas después de la muda. Otra razón para una mayor susceptibilidad a la infección en adultos podría ser una disminución en la respuesta inmune relacionada con la edad, a su vez vinculada a una mayor inversión de energía en la reproducción que en la defensa. Ésto se ha relacionado también a la actividad fenoloxidasa (PO) y a la velocidad de encapsulamiento (Schmid-Hempel, 2005), ya que el apareamiento y la inmunidad están íntimamente ligados. En los adultos de *Tenebrio molitor* L., la hormona juvenil regula el apareamiento, mientras que reprime la expresión de fenoloxidasa y reduce potencialmente la resistencia a los patógenos (Lawniczak y col., 2006).

#### 2.8.4 Pruebas de efectividad biológica

Otra de las herramientas de estudio empleadas en esta tesis es la prueba de virulencia, debido a que existen variaciones en la virulencia entre las razas o aislamientos de un HE.

Por ello es necesario contar con la caracterización de las cepas y el desarrollo de pruebas de patogenicidad sobre insectos hospederos específicos, que permitan la selección de la cepa con mayores atributos como ACB (Camargo, 2000).

Las pruebas de virulencia de laboratorio son herramientas usadas para predecir el comportamiento de los HE en campo. La patogenicidad está determinada por la biología del entomopatógeno, la fisiología del hospedero, la interacción con las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestas en la naturaleza (Inglis y col., 2001). Sin embargo, también hay una relación entre la metodología del bioensayo y la virulencia encontrada (Santoro y col., 2007).

Un método ampliamente utilizado en los análisis de virulencia es el Probit, el cual permite obtener la  $CL_{50}$  y los intervalos de confianza, además de definir la concentración o dosis a aplicar en campo (Alatorre, 2007). El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. Esta prueba no provee información suficiente sobre el fenómeno de virulencia tanto en cepas silvestres como en los modificados genéticamente (Pava-Ripoll y col., 2008) por lo que se ha sugerido que el parámetro  $CL_{50}$  sea complementado con otras pruebas como la distribución de la mortalidad diaria, la duración de los ciclos saprobios y patogénicos (Posada y Vega, 2005).

Además, la exposición de los insectos al método de inmersión es muy usada en laboratorios como técnica inicial de evaluación de múltiples cepas, por ser poco laboriosa, aunque no refleja en nada las condiciones de infección de los insectos en el campo (Santoro y col., 2007) pero tiene la ventaja adicional de la rapidez de la mortalidad debida a una alta exposición del insecto al inóculo (Posada y Vega, 2005), y la comparación con la bibliografía disponible.

Algunos conceptos de efectividad biológica se encuentran en el anexo B.

# **PARTE I, ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y ALCANCE DE LA TESIS**

## **ALCANCE DE LA TESIS**

### 3. ALCANCE DE LA TESIS

#### 3.1 Antecedente directo

El control biológico como estrategia dentro del escenario actual de la agricultura sustentable presenta una desventaja que es el prolongado tiempo de acción, por lo cual, se ha privilegiado la búsqueda de microorganismos con eficiencia mejorada, uso de mezclas de microorganismos con diferentes grados de virulencia, el aprovechamiento de la biodiversidad y el mejoramiento genético a través de la fusión de protoplastos, la transformación, la clonación y la sobreexpresión de los genes involucrados en la virulencia (St Leger, 2008).

Como antecedente directo de este trabajo, en nuestro grupo de investigación se obtuvo una cepa mutante del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, mediante un método de mutación aleatoria, que consistió en la exposición a la radiación ultravioleta, y posterior aislamiento con base en la resistencia al compuesto 2-desoxiglucosa en medio con quitina cruda (Robledo y Monterrubio y col., 2004) con el fin de incrementar su virulencia.

Lo que se conoce hasta ahora sobre el fenotipo conferido por la resistencia a 2-dog, es principalmente la desrepresión catabólica por glucosa y aumento en la producción de enzimas específicas en presencia de glucosa (Allen y col., 1989; Antier y col., 1993; Minjares-Carranco y col., 1997). Sin embargo, no se han realizado estudios de caracterización del fenotipo generado por este tipo de mutaciones en HE.

#### 3.2 Hipótesis

“El fenotipo de resistencia a 2-dog de la cepa mutante de *Beauveria bassiana* en comparación con su cepa silvestre podría mostrar diferencias en la virulencia frente a larvas y adultos de *Tenebrio molitor*, morfometría de crecimiento, así como en la producción de enzimas hidrolíticas (hexosaminidasas y proteasas) y esporas, eventos que ocurren en momentos bien definidos durante los cultivos de los estos hongos en medio sólido y caja de Petri”.

### 3.3 Objetivos

#### 3.3.1 Objetivo general

Caracterizar y comparar los fenotipos presentados por dos cepas de *Beauveria bassiana*, la mutante y la silvestre de la cual derivó, en función de su fisiología de crecimiento, producción de enzimas hidrolíticas y la virulencia frente al insecto *Tenebrio molitor* en sus estados de larva y de adulto.

#### 3.3.2 Objetivos específicos

1. Comparar las dos cepas de *Beauveria bassiana*, la cepa silvestre (88) y la cepa mutante resistente a 2-dog (885.2), en función del efecto de diversos sustratos inductores sobre la actividad quitinolítica y proteolítica en cultivo en medio sólido.
2. Evaluar los parámetros obtenidos a través de la aplicación de un modelo de crecimiento de dos fases en cultivo en medio sólido sobre diferentes sustratos.
3. Comparar los parámetros de fisiología y morfometría de crecimiento de las dos cepas de *Beauveria bassiana* en cultivo en cajas de Petri sobre diferentes sustratos.
4. Establecer las diferencias de virulencia de las dos cepas sobre estados de larvas y de adultos de *Tenebrio molitor*.

# **PARTE I, ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y ALCANCE DE LA TESIS**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describe la preparación de los materiales, el diseño experimental y los métodos analíticos para la evaluación de la fisiología de crecimiento en CMS y en caja de Petri, así como la producción de enzimas hidrolíticas. Asimismo, se describen los experimentos para la evaluación de la virulencia frente al insecto *Tenebrio molitor* por parte de las dos cepas de *Beauveria bassiana* estudiadas.

### 4.1 Preparación de los materiales, previo a la realización de los experimentos

#### 4.1.1 Microorganismos

Se utilizó la cepa 88 de *Beauveria bassiana*, proveniente de la colección de hongos entomopatógenos del Colegio de Posgraduados, campus Montecillo, Texcoco (Estado de México), aislada de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Oaxaca, México.

La cepa 885.2 fue obtenida previamente por modificación genética de la cepa 88 por medio de exposición a radiación ultravioleta y posterior selección con base en la resistencia a 2-dog ( $0.5 \text{ g l}^{-1}$ ) en medio con quitina cruda ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ) (Robledo-Monterrubio y col., 2004).

Las cepas 88R y 885.2R fueron obtenidas a partir del repase por larvas de *T. molitor*, y posterior reaislamiento sobre medio Agar maltosa Sabouraud de las cepas 88 y 885.2, respectivamente (Montesinos, 2008).

En el anexo C se presenta una aclaración respecto a la terminología y nomenclatura de estas cepas.

#### 4.1.2 Conservación de las cepas y preparación del inóculo

Los inóculos iniciales de las dos cepas fueron recuperados, a partir de cadáveres de chapulines (*Sphenarium purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Pyrgomorphidae)) previamente infectados con dichas cepas por separado. Ésto se hizo mediante siembra directa con asa microbiológica del hongo en cajas de Petri que contenían medio con agar ( $15 \text{ g l}^{-1}$ ) y la misma formulación del medio **CHA** de la Tabla 4.2, el cual contiene las sales minerales reportadas por Barranco-Florido (2004) y cutícula molida de chapulín ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ).

Para la conservación a largo plazo, las cepas se crecieron en césped en el medio **ADS**, se incubaron a 28°C durante 10 d en la incubadora Imperial III de Labline, se cosecharon en solución acuosa 0.01% de Tween 80 y posteriormente se almacenaron. La cepa 88 fue mantenida en tubos inclinados de medio **ADS** a -20°C con glicerol y la cepa 885.2 en el medio **ADS** adicionado con 0.5 g l<sup>-1</sup> de 2-dog durante el primer año de la parte experimental de la tesis. Posteriormente se realizó la conservación a largo plazo en tubos de crioconservación de 2 ml a -20°C (Corning Incorporated, 2028).

El inóculo para los diferentes experimentos se obtuvo al crecer las cepas sobre 50 ml de medio **ADS** en matraces de 250 ml incubados a 28°C durante 10 d, al cabo de los cuales se cosecharon las esporas agregando 10 ml de solución acuosa 0.01% de Tween 80 y con agitación en una parrilla para despegar las esporas. La suspensión resultante se pasó a través de una gasa doblada en 4 partes y se recolectó en otro matraz bajo condiciones de esterilidad, todo esto para evitar la presencia de micelio y de racimos de esporas que dieran lugar a subvaloración del conteo. La concentración de las esporas se determinó por conteo con hemocitómetro de Neubauer bajo microscopio óptico Boeco BM-180 (Alemania) con una ampliación de 400 x.

#### 4.1.3 Preparación del sustrato y el soporte para los cultivos

##### 4.1.3.1 Preparación de la quitina coloidal

La quitina coloidal se obtuvo por el método modificado de Hsu y Lockwood, (1975). Se disolvieron 50 g de quitina de caparazón de camarón (Sigma Chemical Co., C-7170) en 200 ml de ácido clorhídrico 12.3 M, manteniéndose en agitación constante en baño de hielo hasta su solubilización total. La quitina se precipitó como suspensión coloidal al agregar lentamente 500 ml de agua destilada fría (Kang y col., 1999). La suspensión obtenida se neutralizó por lavados consecutivos con agua destilada, mediante centrifugación a 10000 rpm, durante 15 min a 4°C. Se retiró el exceso de agua hasta obtener una concentración de quitina coloidal mayor a 2%, la cual se evaluó por gravimetría, por triplicado. La quitina coloidal obtenida se conservó en refrigeración a 4°C hasta el momento de usarse.

#### **4.1.3.2 Preparación de la cutícula de *Sphenarium purpurascens* Charpentier (Orthoptera: Pyrgomorphidae)**

Dos kilos de chapulines de la milpa (*Sphenarium purpurascens*) de estado adulto fueron recolectados en la zona de Cuautitlán Izcalli (Estado de México) y procesados mediante el retiro de la cabeza y las patas, el conjunto del tórax y el abdomen resultantes fue tratado con NaOH 0.1 N durante 30 min, después se lavó 2 veces con agua destilada y una vez con HCl 0.2 N durante 30 min; por último, para eliminar el exceso de ácido se lavó dos veces con agua destilada. Posteriormente se secó en estufa a 60°C y se retiró cualquier material interno residual. El material resultante se trituró con mortero y tamizó con malla N° 30, 50 y 80 para obtener un tamaño de partícula entre 0.52 y 0.8 mm de diámetro para los cultivos en medio sólido y un tamaño de 0.18 a 0.3 mm para los cultivos en caja de Petri. Se conservó a temperatura ambiente hasta su utilización (Barranco-Florido y col., 2002).

#### **4.1.3.3 Preparación del soporte sólido**

El soporte inerte utilizado fue espuma de poliuretano (polyurethane foam, PUF) de baja densidad (0.017 g l<sup>-1</sup>). Para los experimentos en que se especifica PUF cortado, la espuma se cortó en cubos de 5 mm de lado y luego se lavó. Para los experimentos con PUF molido, la espuma se cortó en laminas de 15 cm de lado, se lavó y posteriormente se molió con malla de 1.5 mm de diámetro en un molino pulverizador rotativo Brabender (Duisburg, Alemania), a continuación se tamizó utilizando mallas N° 30, 50 y 80. El soporte se lavó 2 veces con agua hervida, una vez con agua destilada a temperatura ambiente y se secó durante 24 h en estufa a 60°C, según lo indicado por Zhu y col. (1994). Se conservó en desecador en bolsa de plástico negra para protegerla de la luz hasta el momento de su uso.

Para evaluar la porosidad del PUF molido, se empacó una cantidad pesada de PUF en un eppendorf de 2 ml y posteriormente se atoró con agua destilada para que ocupara el total del volumen. Además, se obtuvo la densidad del PUF, empacando cantidades pesadas de PUF con los distintos tamaños de partícula, en eppendorf de 2 ml. Se tomó la gravedad específica del agua como la unidad, con los pesos obtenidos del agua y del PUF se estimó el espacio intersticial, mediante la ecuación 1 (Foust, 1987).

$$\alpha = \frac{\text{volumen agua}}{\text{volumen total}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

## 4.2 Cultivo en medio sólido

### 4.2.1 Cinética de producción de hexosaminidasas en CMS en matraces

Se utilizaron matraces de 250 ml, que contenían 1 g de los cubos de espuma de poliuretano y 20 ml de medio (el pH del medio se ajustó a 7 utilizando NaOH 1 N, NaOH 0.1 N, HCl 1 N o HCl 0.1 N, según el caso), y se llevó a esterilizar en autoclave a 15 psi durante 15 min. Se utilizó la formulación modificada de las sales del medio Czapek-Dox (Manual Merck, 2000) y se adicionaron los sustratos en las concentraciones que se indican en la Tabla 4.1. El inóculo fue de  $8 \times 10^7$  esporas por gramo de soporte seco (g SS). El contenido de humedad fue de 92% y la actividad de agua ( $a_w$ ) de 0.99. Los matraces se incubaron a 28°C durante 7 d. A intervalos definidos fueron retirados dos matraces por cada cepa por cada medio para realizar los análisis correspondientes. En el medio **GN** se midió la producción enzimática en un solo punto, a 56 h de cultivo.

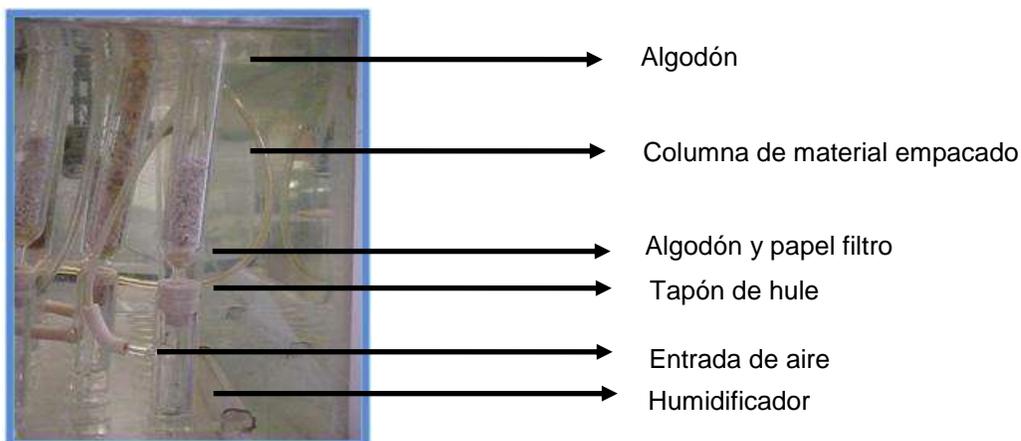
**Tabla 4.1** Formulación de los medios de cultivo usados en la cinética de producción de hexosaminidasas en cultivo en medio sólido en matraces

Sustrato g l <sup>-1</sup>	GN	QC
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3H <sub>2</sub> O	1.25	1.25
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1	1
KCl	0.5	0.5
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.018	0.018
Quitina coloidal		20
Glucosa	28	
Nitrato de sodio	2	
Relación C: N	6.9	6.75

### 4.2.2 Sistema experimental de CMS en columna

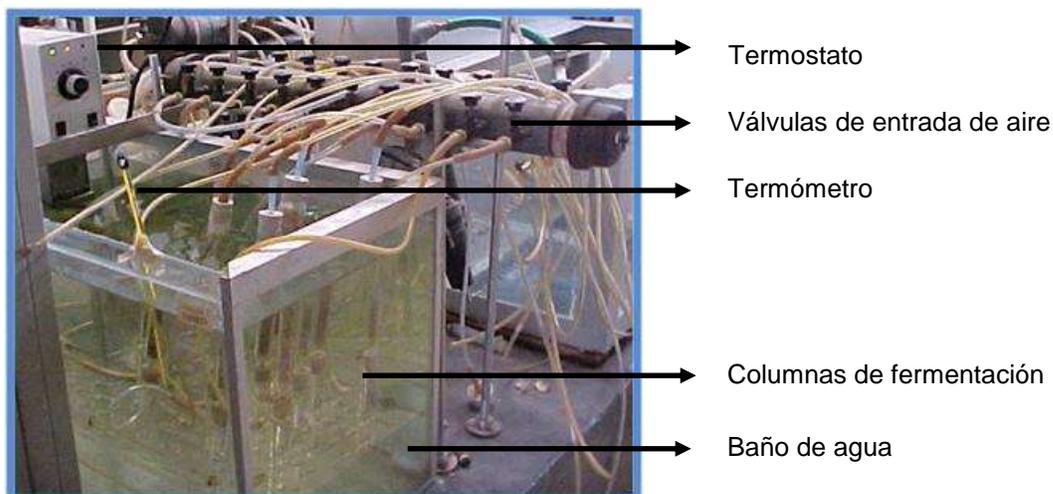
Los experimentos de CMS en columna se realizaron en reactores de vidrio de 2.3 cm de diámetro interno, por 19 cm de largo y un volumen total de 50 ml, los cuales se esterilizaron antes de cada proceso con tapones de algodón en ambos extremos y un círculo de papel filtro (2.3 cm de diámetro) en la parte inferior para contener el material total del cultivo. Se prepararon los medios de cultivo según la formulación, y en todos los casos el pH fue ajustado a 7 (se utilizó NaOH 1 N, NaOH 0.1 N, HCl 1 N o HCl 0.1 N). El medio de cultivo estéril se inoculó (el inóculo para todos los experimentos se estableció en  $1 \times 10^7$  esporas por gramo de materia total), y posteriormente se mezcló con el SS estéril, esta mezcla

homogénea se empacó en condiciones de asepsia y cada uno de los fermentadores se acopló con un tapón de hule a un humidificador de vidrio de 12 cm de longitud y 2.3 cm de diámetro interno, el cual contenía agua destilada hasta las tres cuartas partes de su volumen, posteriormente cada uno se conectó a la entrada del aire en forma independiente, según se muestra en la Figura 4.1.



**Figura 4.1** Esquema de los fermentadores empleados en el cultivo en medio sólido

El flujo volumétrico se reguló manualmente por medio de válvulas y de un flujómetro digital ADM 2000 (Agilent Technologies, Wilmington, USA). El conjunto de las columnas de fermentación y los humidificadores se sumergieron en un baño de agua a temperatura constante durante toda la fermentación, el cual se reguló por medio de un termostato HAAKE C10 a 28°C, según se muestra en la Figura 4.2.



**Figura 4.2** Esquema del sistema experimental de cultivo en medio sólido

#### 4.2.3 Elección del tipo de soporte para CMS en columna

Cada columna de vidrio se empacó homogéneamente de acuerdo a lo presentado anteriormente, y según se indica en la Tabla III del anexo D. La participación de cada componente en la columna fue determinada mediante un balance de materiales para sólidos y agua, teniendo en cuenta el contenido de los sólidos en los diferentes tratamientos y el contenido de humedad del inicio del cultivo, que se estableció en 80%, según se muestra en la Tabla II del anexo D. El medio **CHA**, (la formulación se indica en la Tabla 4.2), se inoculó con la cepa 885.2 y se mezcló con el PUF molido o PUF cortado, preparado según se indicó anteriormente. El cultivo se mantuvo durante 88 h. Los experimentos se realizaron por duplicado (Barranco-Florido y col., 2002).

#### 4.2.4 Cinética de producción de proteasas y hexosaminidasas en columnas

Cada columna de vidrio se empacó homogéneamente de acuerdo a lo presentado anteriormente y según se indica en la Tabla V del anexo D. El balance de los materiales incluidos en la columna se muestra en la Tabla IV del anexo D. Se utilizó el medio de cultivo **CHA**, preparado de acuerdo a lo indicado en la Tabla 4.2, el pH se ajustó a 7 antes de ser esterilizado. El cultivo se mantuvo durante 88 h. A intervalos definidos fueron retiradas dos columnas por cada cepa, para realizar los análisis correspondientes (Barranco-Florido y col., 2002).

#### 4.2.5 CMS en columna sobre diversos medios de cultivo

Las columnas de vidrio se empacaron homogéneamente de acuerdo a lo presentado anteriormente y según se indica en la Tabla VII del anexo D, de acuerdo al balance de materiales de la Tabla VI del anexo D. Los medios de cultivo se formularon de acuerdo a lo indicado en la Tabla 4.2. Se usó la formulación de sales según Barranco-Florido y col. (2002), adicionada con los siguientes sustratos: Glucosa y sulfato de amonio, **GNS**; quitina coloidal como única fuente de carbono y nitrógeno, **QCS**; quitina coloidal adicionada con glucosa y sulfato de amonio como fuentes alternas, **QGNS**; cutícula de chapulín molida (*S. purpurascens*), **CHA**; salvado de trigo con y sin adición de las sales, **STS** y **ST**, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron por diferentes periodos de tiempo de acuerdo al avance en el crecimiento fúngico. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

**Tabla 4.2** Formulación de los medios de cultivo usados en las cinéticas de producción de hexosaminidasas y proteasas en cultivo en medio sólido sobre columnas

Sustrato g l <sup>-1</sup>	GNS	QCS	QGNS	CHA	ST	STS
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	1.2	1.2	1.2	1.2		1.2
NaCl	1	1	1	1		1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15	15	15	15		15
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.028	0.028	0.028	0.028		0.028
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.032	0.032	0.032	0.032		0.032
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6		6			
Glucosa	28		5			
Quitina coloidal		20	20			
Cutícula de chapulín				60		
Salvado de trigo					60	60
Relación C: N	8.81	6.9	4.23	4.27	17.2	17.2

#### 4.2.6 Preparación de los extractos enzimáticos

Los extractos enzimáticos se obtuvieron por el drenado de la espuma de poliuretano con jeringa de vidrio de 20 ml de capacidad. Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min, para retirar el exceso de material sólido, y luego se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.45 µm. Los extractos obtenidos se almacenaron a -20°C para análisis posteriores. En el caso del cultivo en columnas de aireación forzada, se diluyó la muestra 1: 2 respecto al peso final con agua destilada (Barranco-Florida, 2004) y posteriormente se realizó el mismo procedimiento del caso anterior. Para el caso de los extractos a los que se les realizó electroforesis, después del procedimiento anterior se les dializó con sacarosa a 4°C durante 12 h, utilizando una membrana de celulosa de poro de retención de proteínas de 12 KDa (Sigma Chemical Co. D-9527) y se pasaron por filtros para centrifugación Amicon® Ultra-15 (Millipore Co., USA), aditamento que permite la concentración de proteínas de tamaño superiores a 15 KDa y la desalación de las muestras, mediante centrifugación a 5000 rpm durante 15 min a 4°C.

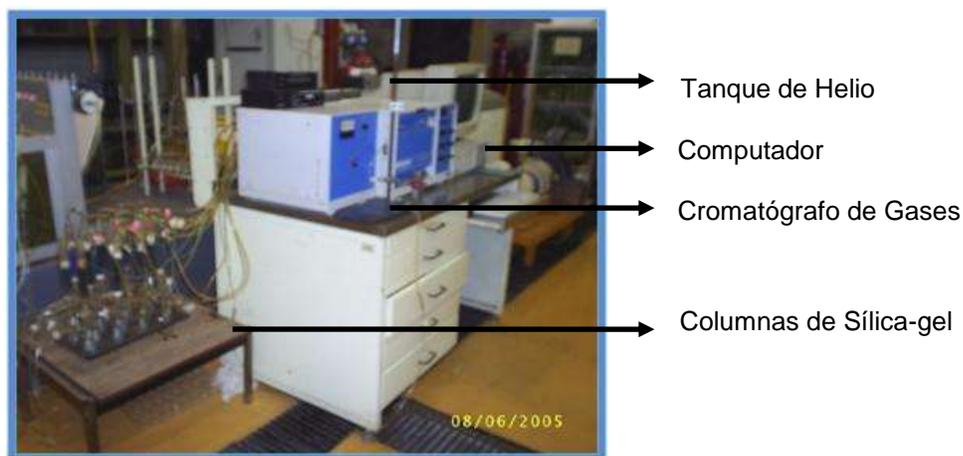
### 4.3 Determinaciones analíticas

#### 4.3.1 Biomasa en los cultivos en matraz

El crecimiento del hongo se evaluó directamente por gravimetría. El medio de cultivo se drenó del soporte sólido por compresión dentro de una jeringa de 20 ml. El soporte sólido que contenía la biomasa retenida fue enjuagado con 20 ml de agua, los cuales se drenaron. El soporte inerte se secó por un periodo aproximado de 24 h hasta peso constante en una estufa a 60°C. Se sustrajo el peso del soporte sólido del peso del soporte sólido después de secado (Zhu y col., 1994).

#### 4.3.2 Crecimiento de los cultivos en columna

Se estimó el crecimiento fúngico a través del análisis respirométrico de la composición de los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ) de la salida de cada columna. Los gases se secaron a través de una columna de sílica, luego de lo cual, se inyectaron en el cromatógrafo de gases (Gow mac Instrument Co, series 580), según se indica en la Figura 4.3.



**Figura 4.3** Esquema del sistema de detección de gases

El cromatógrafo de gases está equipado con un detector de conductividad térmica, inyector automático y una columna concéntrica separadora de gases (CTR I Alltech, USA) de acero inoxidable empacada con 5% de chromosorb P OV-101, el cual está acoplado a un computador que utiliza el programa integrador CHROMA de la sociedad Biosysteme para obtener la concentración porcentual de  $\text{CO}_2$  (Saucedo-Castañeda y col., 1994).

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases fueron:

Parámetro	Condiciones
<b>Detector</b>	Conductividad térmica
<b>Temperatura del detector</b>	80°C
<b>Temperatura del inyector</b>	80°C
<b>Temperatura de la columna</b>	50°C
<b>Fase móvil</b>	Helio
<b>Presión de salida del eluyente</b>	40 psi
<b>Flujo del eluyente</b>	40 ml min <sup>-1</sup>
<b>Corriente del detector</b>	150 mA

Cada gas presenta una conductividad térmica diferente, por tanto, fue necesario establecer una curva de calibración antes de proceder al análisis de la medición de gases, para lo cual se utilizaron 4 mezclas de gases con concentraciones conocidas de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. Además se estandarizaron los tiempos de retención (TR) para cada gas, según se muestra a continuación, el TR del aire en la columna fue de 0.38 min.

Mezcla de gases	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
aire	0.03	20	80
1	5	15	80
2	10	10	80
3	10.15	20.98	68.87
TR (min)	0.8	2.2	3.5

Las mediciones en cada columna se realizaron cada 30 min y los resultados se expresaron como mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MSI. Estos resultados se integraron, para obtener la producción total de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MSI). Los datos se ajustaron a los modelos de crecimiento de hongos en cultivo en medio sólido que son indicados posteriormente en el anexo I, para obtener los parámetros de crecimiento.

La expresión de los resultados se obtuvo por medio de la ecuación 2:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{(\%CO_2s) \times flujo \times 60 \times a \times b \times c}{gMSI \times d} = \frac{mg CO_2}{h gMSI} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde,

$\frac{dCO_2}{dt}$  = Tasa instantánea de producción de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MSI)

%CO<sub>2s</sub> = CO<sub>2</sub> en la salida del venteo del cromatógrafo para cada columna (%)

*flujo* = Flujo de salida del venteo del cromatógrafo para cada columna (ml h<sup>-1</sup>)

*a* = Factor de corrección de la presión atmosférica a la altura de la ciudad de México /Presión atmosférica en condiciones estándar de los gases (0.7697).

*b* = Factor de corrección de la temperatura de trabajo (28°C) respecto a las condiciones estándar de los gases en escala Kelvin (0.9070).

*c* = Peso molecular del CO<sub>2</sub> / mmol CO<sub>2</sub> (mg mmol<sup>-1</sup>)

*gMSI* = Materia seca inicial (g)

*d* =Factor de conversión mmoles de CO<sub>2</sub> a ml (22.415 mmol ocupa 1 ml), en condiciones estándar (ml mmol<sup>-1</sup>) (Barranco-Flrido, 2004).

### 4.3.3 Actividad enzimática

#### 4.3.3.1 Actividad quitinolítica (N-acetil-hexosaminidasa)

Esta actividad se determinó por el método modificado de Coudron y col. (1984), usando *p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma Chemical Co.) como sustrato. La mezcla de reacción consistió en 50 µl del extracto enzimático, 150 µl de agua destilada, 200 µl del amortiguador citrato-fosfato 0.2 M pH 5.6, y 200 µl del sustrato (1 mg ml<sup>-1</sup>). Se incubó en baño de agua a 37°C, durante 1 h con agitación constante a 180 rpm en el agitador con circulador Circulator Polystat, Cole Parmer (USA). En el blanco se sustituyó el extracto enzimático por agua destilada. La reacción se detuvo agregando 1 ml de NaOH 0.02 M. La lectura de absorbancia se realizó a 400 nm en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU® Series 640 (USA).

Para realizar la estimación de la concentración de *p*-nitrofenol (*p-nf*) liberada se empleó una curva de calibración con concentraciones crecientes de *p*-nitrofenol hasta 0.72 µmol ml<sup>-1</sup> (100 µg ml<sup>-1</sup>), la cual se muestra en el anexo F, previa corroboración de la linealidad del *p*-nitrofenol durante la hora de la reacción, la cual se muestra en el anexo E.

Una unidad internacional de actividad enzimática (UI) fue definida como *la cantidad de enzima requerida para liberar un  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto en la mezcla de reacción* (Tronsmo y Harman, 1993).

La producción de la enzima en el cultivo en medio sólido se expresó en términos de unidades internacionales por gramo de materia seca, de acuerdo a la ecuación 4.

$$UE = \frac{[p - nf] \times Dil \times V_1}{t \times g \text{ MS}} = UI \text{ g}^{-1} \text{ MS} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde,

$UE$ = Unidades enzimáticas en la unidad experimental de cultivo en medio sólido ( $UI \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ )

$UI$ = Unidades internacionales enzimáticas ( $\mu\text{mol p-nf min}^{-1}$ )

$V_1$ = Volumen del líquido de extracción + volumen del líquido de fermentación (ml)

$Dil$ = Dilución del extracto filtrado en la mezcla de reacción

$t$ = Tiempo de incubación de la mezcla reactiva (min)

$g \text{ MS}$ = Gramos de materia seca de cada unidad experimental (g)

(Barranco-Florido, 2004).

#### 4.3.3.2 Actividad proteolítica

Las proteasas se determinaron por medio del método de Azocoll (Sigma Chemical Co.). La mezcla de reacción consistió en una suspensión de 10 mg de Azocoll en 1 ml de buffer glicina-NaOH (pH 8.5), 3.9 ml de agua destilada y 0.1 ml de extracto enzimático, la cual se llevó a baño de agua a 37°C, a agitación de 180 rpm durante 30 min en el agitador con circulador Circulator Polystat, Cole Parmer (USA). El blanco contenía la mezcla de reacción, con excepción del extracto enzimático que se sustituyó por agua destilada. La reacción se detuvo filtrando con filtro Whatman # 44 (tamaño de poro 0.3  $\mu\text{m}$ ). La lectura de absorbancia se realizó a 520 nm en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU® Series 640 (USA).

Una unidad de actividad enzimática (UA) fue definida como *la cantidad de enzima requerida para incrementar la absorbancia de la mezcla de reacción en 0.01 unidad de absorbancia por minuto a 520 nm, respecto al blanco* (Chavira y col., 1984).

Para obtener el cambio de la absorbancia a 520 nm ( $\Delta abs$ ) se restó la absorbancia del blanco a la absorbancia de la muestra y se dividió entre 0.01.

La producción de la enzima en el cultivo en medio sólido se expresó en términos de unidades enzimáticas por gramo de materia seca, de acuerdo a la ecuación 3.

$$UE = \frac{\Delta abs \times Dil \times V_1}{t \times V_2 \times g MS} = UA \text{ g}^{-1} MS \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde,

$UE$ = Unidades enzimáticas en la unidad experimental de cultivo en medio sólido ( $UA \text{ g}^{-1} MS$ )

$UA$ = Unidades enzimáticas en la mezcla de reacción ( $\Delta abs \text{ min}^{-1}$ )

$\Delta abs$ = Cambio de absorbancia a D.O. de 520 nm

$Dil$ = Dilución del extracto filtrado en la mezcla de reacción

$V_1$ = Volumen del líquido de extracción + volumen del líquido de fermentación (ml)

$t$ = Tiempo de incubación de la mezcla reactiva (min)

$V_2$ = Volumen de la mezcla de reacción (ml)

$g MS$ = Gramos de materia seca de cada unidad experimental (g) (Barranco-Florida, 2004).

#### 4.3.4 pH

La medición del pH se realizó directamente sobre la suspensión obtenida después de separar el extracto crudo enzimático de la materia total obtenida de los cultivos. Para realizar las mediciones se utilizó un potenciómetro digital Conductronic pH 120 provisto de un electrodo combinado. El potenciómetro se calibró previamente con soluciones amortiguadoras de pH 4.0 y 7.0 (Sigma de México S. A. de C. V.).

#### 4.3.5 Proteína

La concentración de la proteína del extracto enzimático (libre de células) se determinó mediante el reactivo de Bradford (Sigma Chemical Co. B-6916, Bradford, 1976). El microensayo consistió en 1 ml del extracto enzimático diluido en NaCl 0.15 M (el factor de dilución varió según la concentración de la proteína en la muestra), y 1 ml del reactivo de

Bradford, después de agitar suavemente se esperó 5 min y se leyó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Beckman Coulter DU® Series 640 (USA). Se calculó la concentración de la proteína utilizando albúmina sérica bovina como estándar hasta la concentración de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , la curva de calibración se muestra en el anexo G. La concentración de proteína en el cultivo en medio sólido se expresó en términos de miligramos por gramo de materia seca.

#### 4.3.6 Actividad de agua ( $a_w$ )

La actividad de agua se midió en un analizador Aqua Lab CX-2 (Decagon Devices, Inc., Washington, USA), el cual utiliza la técnica del punto de condensación del espejo frío. Se colocó de forma homogénea una porción suficiente del material en la charola de plástico, posteriormente se introdujo en el compartimento indicado del equipo Aqualab CX-2, el cual fue previamente calibrado con agua destilada y desionizada.

#### 4.3.7 Glucosa

La glucosa fue cuantificada con el analizador bioquímico YSI 2700 Select (Yellow Springs Instrument, Ohio, USA), se utilizó una membrana de policarbonato que contenía la enzima glucosa oxidasa inmovilizada, la detección se realizó a través de la señal de oxidación del peróxido de hidrógeno producto de la reacción enzimática específica, se utilizó una solución de glucosa de concentración conocida para la validación de los resultados.

#### 4.3.8 Ácido Oxálico

El ácido oxálico se determinó por cromatografía líquida de alta resolución, (HPLC), en el equipo Termo Separation Constametric 4100, usando como eluyente  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.005 M a un flujo de 0.6  $\text{ml min}^{-1}$ , en una columna ALLTECH OA-1000 para ácidos orgánicos, a 35 °C. Se usó un detector UV/visible Perkin Elmer Series 200, operado a 210 nm. También se realizó cromatografía en capa fina, (TLC), en placas de sílica gel 60 F254 Merck, con  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9: 1) y n-BuOH:  $\text{H}_2\text{O}$ : AcOH (12: 5: 3) como eluyentes y sulfato cerico amoniacal 0.051 M y luz UV como reveladores (Asaff, 2006).

#### 4.3.9 Contenido de humedad

El contenido de humedad de las muestras se determinó por gravimetría. Se tomó una muestra del material contenido en las columnas del cultivo en medio sólido, la cual se pesó y secó en estufa a 60°C durante 24 h, posteriormente cada muestra se pasó a un desecador con sílica-gel durante dos horas, luego de lo cual se pesó en la balanza analítica GA200 marca OHAUS. Las determinaciones se hicieron por duplicado en charolas de aluminio. Se realizaron los cálculos según la ecuación 5.

$$\%H = \frac{\text{peso húmedo de la muestra} - \text{peso seco de la muestra}}{\text{peso húmedo de la muestra}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

#### 4.3.10 Composición elemental de C, H y N

Las esporas de los dos cepas (obtenidas como se describe en el inóculo para todos los experimentos) y los sustratos utilizados en la formulación de los medios de cultivo se secaron en estufa a 60°C durante 24 h. La composición elemental (C, H y N) se determinó en un analizador Series II 2400 CHNS/O (Perkin Elmer, Boston, USA). Este equipo está provisto de dos columnas, la primera utilizó una temperatura de combustión de 925°C y en la segunda se usó temperatura de reducción de 640°C. El gas acarreador fue helio y la detección de los compuestos se realizó con un detector de conductividad térmica. La calibración se realizó con una estándar de cisteína (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub>S). Las muestras se pesaron en una microbalanza de alta precisión, la cantidad de muestra requerida para el análisis fue entre 1.5 y 3 mg. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de cada compuesto referido a la materia seca de la muestra, asumiendo que el % restante era oxígeno, y se calculó la fórmula elemental de cada muestra.

#### 4.3.11 Secuenciamiento de las proteínas

##### 4.3.11.1 **Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**

Se realizó la electroforesis monodimensional de las proteínas del extracto enzimático extracelular en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) por el método de Laemmli (1970). Se tomó un volumen de los extractos enzimáticos obtenidos de los diferentes medios de cultivo evaluados, equivalente a 50 µg de proteína total, se adicionaron cuatro volúmenes

de acetona absoluta fría, se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4°C, seguido de precipitación con acetona al 70% para retirar el exceso de sales de la muestra. El precipitado de cada muestra se disolvió en buffer de muestra (tris/HCl, pH 6.8, 65 mM; glicerol 10%; SDS 2%; 2-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0.1%). La mezcla se llevó a un baño de agua a 100°C durante 4 min. Posteriormente un volumen de 10 µl de cada muestra fue cargado en el gel de poliacrilamida (gel de separación 13%, compactación 3%). La separación se realizó en cámara Miniprotean a 150 V durante una hora. El buffer de corrimiento contenía: Tris, 25 mM; glicina, 192 mM; SDS 0.1%, pH 8.3 (Garfin, 1990). Se utilizaron los marcadores de peso molecular de alto rango (miosina, 200 KDa; β-galactosidasa, 116.25 KDa; fosforilasa B, 97.4 KDa; albúmina sérica bovina, 66.2 KDa, ovoalbúmina, 45 KDa) y el de bajo rango (fosforilasa B, 97.4 KDa; albúmina sérica bovina, 66.2 KDa; ovoalbúmina, 45 KDa; anhidrasa carbónica, 31 KDa; inhibidor de tripsina, 21.5 KDa; lisozima, 14.4 KDa). Los geles se revelaron con nitrato de plata y con azul de Coomassie, según se indica. Todos los reactivos y equipos utilizados en estas técnicas son marca Bio-Rad. Los análisis de peso molecular de los geles fueron realizados por medio del software Labworks 4.0, de UVP Imaging Systems inc.

#### **4.3.11.2 Digestión de los geles**

Los extractos enzimáticos, procesados según lo indicado anteriormente, se liofilizaron, y posteriormente se les realizó la electroforesis SDS-PAGE, las bandas de interés fueron cortadas de los geles sin haber sido teñidos. Se guardaron en tubos eppendorf a temperatura ambiente hasta el momento del análisis. Las bandas se cortaron en piezas pequeñas (1 x 1 mm), se secaron por centrifugación al vacío, y se redujeron por inmersión en una solución de bicarbonato de amonio, 100 mM, que contenía ditioneol, 10 mM, durante una hora a 55°C. El exceso de ditioneol/bicarbonato de amonio se removió y se agregó el mismo volumen de bicarbonato de amonio, 100 mM, conteniendo iodoacetamida, 55 mM, y se incubó durante 45 min en la oscuridad. Después de la alquilación, las piezas del gel se trataron con bicarbonato de amonio, 100 mM, y acetonitrilo, secuencialmente, y luego se secaron por centrifugación al vacío. A continuación, se agregaron 2 mg de tripsina en suficiente solución de bicarbonato de amonio, 100 mM, para sumergir cada pieza de gel. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante toda la noche. El gel se lavó una vez con bicarbonato de amonio seguido de acetonitrilo, y dos veces con ácido fórmico 5% seguido de

acetonitrilo. Finalmente, se colectaron los péptidos a partir de los lavados, se secaron por centrifugación al vacío y se resuspendieron en una solución de ácido fórmico 0.1% para el posterior análisis de espectrometría de masas.

#### **4.3.11.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)**

Los péptidos de cada muestra se analizaron por duplicado. Un capilar LC Agilent 1100 (Palo Alto, CA) se conectó al espectrómetro de masas por medio de un separador de T para permitir la infusión a velocidades de flujo de  $\mu\text{l}$ . Las camas de cinco mm de diámetro C18 (Rainin, Woburn, MA) se empacaron en una tira capilar de sílice fundida (10.5 cm x 100 mm de diámetro interior) a 1000 psi de presión utilizando nitrógeno gaseoso. Las muestras de los péptidos se cargaron en la columna durante 45 min bajo la misma presión. Los péptidos se eluyeron con un gradiente, usando ácido fórmico 0.1% (amortiguador A) y acetonitrilo 99.9% /ácido fórmico 0.1% (amortiguador B). Después del primer lavado durante 10 min con 95% de amortiguador A, los péptidos se eluyeron de la columna durante 90 min con un gradiente lineal de 5 a 60% del amortiguador B, a una velocidad de flujo de  $\sim 200 \mu\text{l min}^{-1}$  directamente en una espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ (Thermo Fisher, San José, CA) a un voltaje de 2500 V. El instrumento fue establecido para adquirir espectros MS/MS de los nueve más abundantes iones precursores de cada barrido de MS, con una serie de repeticiones de tres y la duración de cada repetición fue de 5 s. La dinámica de exclusión se habilitó para 160 s. Los espectros de masas en tándem en bruto se convirtieron en una lista de picos utilizando ReAdW seguido por algoritmos mzXML2Other (Pedioloni y col., 2004). La lista de picos se buscó utilizando Mascot 1.9 (Matrix Science, Boston, MA).

#### **4.3.11.4 Búsqueda en las bases de datos e identificación de las proteínas**

Se construyó una base de datos de destino a partir de la base de hongos entomopatógenos (Broad Institute, MA). Se construyó una base de datos señuelo mediante la inversión de las secuencias en la base de datos normal. Las búsquedas se realizaron en contra del objetivo y en las bases de datos señuelo utilizando los siguientes parámetros: 1) Escisión enzimática totalmente triptica con dos posibles divisiones perdidas; 2) tolerancia de péptidos de 800 partes por millón; 3) tolerancia del fragmento de iones de 0.8 Da; y 4) modificaciones variables debido a las carboxiamidometilaciones de los residuos de cisteína (+ 57 Da) y desamidaciones de los residuos de asparagina (1 Da). Después de la búsqueda en las bases

de datos, las proteínas estadísticamente significativas fueron determinadas para cada una de las cuatro muestras en proteína FDR 1%, utilizando el algoritmo ProValT (Weatherly y col., 2005).

#### **4.3.11.5 Anotación de las proteínas funcionales**

Se realizó la búsqueda de las similitudes para las proteínas con funciones no asignadas, utilizando el programa BlastP contra todas las secuencias de las proteínas no-redundantes presentes en la base de datos de The National Center for Biotechnology Information. Los alineamientos de las proteínas se consideraron significativos si estaban por debajo de un valor de E de 50. Se utilizó SignalP para predecir los mecanismos de secreción y SecretomeP para identificar los motivos clásicos (Bendtsen y col., 2004; [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) y la base de datos UniProtKB / Swiss-Prot (Swiss Institute for Bioinformatics (SIB) y European Bioinformatics Institute (EBI)) para hallar las propiedades de las estructuras protéicas.

#### **4.3.12 Microscopía electrónica de barrido**

Se realizó el cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín, de los cuales se tomaron muestras de cada cepa de 0, 8, 16, 24 y 36 h de crecimiento. Las cuales se sometieron a un tratamiento de fijación por inmersión en glutaraldehído 5% (v/v) durante 24 h a 4°C. Se realizó una fijación secundaria con tetraóxido de osmio 1% (v/v) durante 2 h a 4°C. Las muestras se deshidrataron en diluciones seriadas de acetona al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%. Posteriormente se desecaron en CO<sub>2</sub> bajo condiciones de punto crítico: 36°C, 1070 lb pg<sup>-2</sup> (Samdri 780B, Tousimis Research corporation). Posteriormente, las muestras se fijaron en una cinta de carbón conductivo de doble cara adhesiva y se cubrieron con carbono evaporado y una deposición de iones de oro en el vacío (Baltec SCD 050) (Bozzola y Russell, 1992). Las muestras se examinaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 KV, Tokio) a 10–20 kV.

## 4.4 Análisis en caja de Petri

### 4.4.1 Crecimiento radial y esporulación a diferentes temperaturas

Las cajas de Petri de 5 cm de diámetro que contenían 5 ml de medio de **ADS** se inocularon en el centro del agar con un palillo de madera estéril, previamente puesto en una suspensión esporal de  $5 \times 10^5$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ . Las cajas fueron selladas con Parafilm e incubadas a 23, 25, 28 y 30°C. La velocidad de crecimiento radial se determinó por medición del diámetro de las colonias con un Vernier, cada 24 h durante 5 d. Se calculó la pendiente de la gráfica de crecimiento radial medida en mm contra el tiempo medido en días, por regresión lineal, este parámetro se llamó  $U_r$ , se expresó en  $\text{mm d}^{-1}$ . La producción de esporas se midió al final del crecimiento radial; se cortó la colonia y se suspendió en 10 ml de solución de Tween 80 al 0.01%, contenidos en tubos cónicos de 15 ml, la suspensión de esporas se agitó vigorosamente en un agitador vortex por aproximadamente 1 min. Se realizaron tres conteos con hematócrito para cada colonia. Se calculó la densidad de esporas,  $\rho_{\text{esp}}$ , expresada como esporas  $\text{cm}^{-2}$  (Varela y Morales, 1996). El análisis de cada cepa se llevó a cabo por triplicado.

### 4.4.2 Caracterización de las cepas en función del medio de cultivo

Las cajas de Petri de 5 cm de diámetro contenían 5 ml de medio mineral de acuerdo a Barranco-Florido, (2004), y agar; el cual se suplió con diferentes sustratos como única fuente de carbono y nitrógeno; los medios son los mismos de los experimentos de cultivo en medio sólido en columna, la composición se detalla en la Tabla 4.3. Las fuentes de carbono y nitrógeno de los medios fueron: Glucosa y sulfato de amonio, **GNS**; quitina coloidal, **QCS**; quitina coloidal, adicionado con glucosa y sulfato de amonio, **QGNS**; partículas de cutícula de chapulín (*S. purpurascens*), **CHA**; salvado de trigo, sin sales, **ST** y salvado de trigo con sales, **STS**. Además se usaron cajas que contenían agar dextrosa Sabouraud, marcado como **ADS**. El pH se ajustó a 7 antes de ser esterilizado. Todos los cultivos se incubaron a 28°C.

**Tabla 4.3** Composición de los medios de cultivo usados en los experimentos en caja de Petri

Sustrato, g l <sup>-1</sup>	GNS	QCS	QGNS	CHA	ST	STS	ADS
<b>MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b>	1.2	1.2	1.2	1.2		1.2	
<b>NaCl</b>	1	1	1	1		1	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	15	15	15	15		15	
<b>FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b>	0.1	0.1	0.1	0.1		0.1	
<b>ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O</b>	0.028	0.028	0.028	0.028		0.028	
<b>MnSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O</b>	0.032	0.032	0.032	0.032		0.032	
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	6		6				
<b>Glucosa</b>	20		5				40
<b>Quitina coloidal</b>		20	20				
<b>Cutícula de chapulín</b>				20			
<b>Salvado de trigo</b>					10	10	
<b>Peptona</b>							10
<b>Agar</b>	15	15	15	15	15	15	15
<b>Relación C: N</b>	6.3	6.9	4.23	4.27	17.2	17.2	15.6

#### 4.4.3 Velocidad radial y tasa específica de crecimiento

Las cajas de Petri se sembraron en el centro del agar con un palillo de madera estéril, previamente puesto en una suspensión esporal de  $5 \times 10^5$  esporas ml<sup>-1</sup>. Las cajas se sellaron con Parafilm e incubaron. La velocidad de crecimiento radial se determinó por medición del diámetro de las colonias con un Vernier cada 24 h durante 10 d. Se calculó la pendiente por regresión lineal este parámetro se llamó  $U_r$ , y se expresó en mm d<sup>-1</sup>. El análisis de cada cepa se llevó a cabo por triplicado. Al final de las mediciones, los bordes de las colonias se observaron bajo el microscopio, el cual estaba conectado a una cámara fotográfica y a un procesador de imágenes, el software Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Maryland, USA). Se realizaron 15 mediciones de los diámetros de las hifas en la parte distal y de la longitud de la hifa desde la punta hasta la primera ramificación visible, por cada colonia (repetición) para obtener el promedio y la desviación estándar de las mediciones. Los datos se ajustaron al modelo de crecimiento de hongos filamentosos, (Loera y Viniegra-González, 1998), detallado en la ecuación 6.

$$\mu = \frac{U_r \ln(2)}{L_{av} \ln\left(\frac{L_{av}}{D_h}\right)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde,

$\mu$  = Tasa específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ );  $U_r$  = Máxima velocidad de extensión radial de la hifa líder ( $\mu\text{m h}^{-1}$ );  $L_{av}$  = Longitud promedio de la hifa líder en la periferia de la colonia ( $\mu\text{m}$ );  $D_h$  = Diámetro promedio de las hifas en la periferia de la colonia ( $\mu\text{m}$ ).

#### 4.4.4 Cinética de germinación

Las cajas de Petri se inocularon con una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de la suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , el inóculo fue esparcido homogéneamente con una varilla de vidrio estéril. Las cajas se sellaron con Parafilm e incubaron. Dos círculos de agar de 1 cm de diámetro fueron tomados cada 2 h empezando a las 10 hasta las 24 h de cultivo. Estos círculos se montaron sobre un portaobjetos y se les agregó una gota de azul de lactofenol de algodón, para su posterior visualización al microscopio óptico, ésto con el fin de poder procesar varias muestras a la vez, ya que este reactivo detiene la germinación y el crecimiento del hongo sin alterar su morfología (Kassa y col., 2008). El porcentaje de germinación se determinó por el conteo de dos campos de 100 esporas por cada círculo, posteriormente se calculó el tiempo requerido para el 50% de la germinación,  $TG_{50}$  (Varela y Morales, 1996). Se consideró que una espora había germinado si el tubo germinal era igual o mayor que el ancho de la espora (Ibrahim y col., 2002).

#### 4.4.5 Cinética de esporulación

Una suspensión de  $5 \times 10^6$  esporas por caja de Petri se esparció sobre el medio de cultivo con una varilla de vidrio estéril, luego las cajas se sellaron con Parafilm e incubaron. Un círculo de agar de 1 cm de diámetro de cada caja se tomó con un horador, cada 24 h durante 10 d, el cual se suspendió en 10 ml de solución de Tween 80 al 0.01% contenidos en tubos cónicos de 15 ml. La suspensión de esporas se agitó vigorosamente en un vortex por aproximadamente 1 min para desprender las esporas del agar. Se realizaron tres conteos de

cada suspensión esporal con hematocitómetro para cada tiempo, cada medio y cada cepa. Se calculó la densidad de esporas,  $\rho_{\text{esp}}$ , expresada como esporas  $\text{cm}^{-2}$  (Varela y Morales, 1996).

#### 4.4.6 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad se determinó mediante el método modificado de exclusión de fases (Boucias y col., 1988; reportado por Romano, 1996). Se estandarizaron suspensiones de Tween 80 0.05% que contenían esporas obtenidas en medio **ADS**, las cuales se centrifugaron a 5000 rpm, durante 30 min a temperatura ambiente en la centrífuga J2-HS Beckman. Las esporas recuperadas se lavaron dos veces con agua destilada a una temperatura de 60°C y se suspendieron en solución amortiguadora de acetato de sodio (0.1M, pH 6). Después se mezclaron volúmenes iguales de esta suspensión y tolueno en tubos de vidrio, los cuales se taparon con Parafilm y se agitaron durante 15 s con vortex. Los tubos se mantuvieron a 4°C durante 12 h para asegurar la separación total de los solventes. Se recuperó la fase acuosa excluida de la fase orgánica y se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro Beckman Coulter DU® Series 640 (USA), usando como testigo la misma solución amortiguadora. La hidrofobicidad de las esporas se calculó mediante la ecuación 7:

$$Hf = \left( \frac{absS - absA}{absS} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde,

$Hf$ = Hidrofobicidad de las esporas (%);  $absS$ = Absorbancia de la suspensión de esporas en la solución amortiguadora de acetato de sodio;  $absA$ = Absorbancia de la fase acuosa excluida del solvente orgánico.

### 4.5 Bioensayo de virulencia

#### 4.5.1 Mantenimiento del insecto hospedero

La virulencia de las dos cepas se probó sobre larvas de aproximadamente 2 cm de longitud y  $0.1 \pm 0.02$  g de peso y sobre adultos de *Tenebrio molitor* (escarabajo de la harina), los cuales

corresponden a las fotografías primera y última de la Figura 4.4, donde se detallan las diferentes etapas del ciclo del insecto. Los insectos se mantuvieron en cría en el laboratorio en cajas de plástico, a temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C), y se alimentaron diariamente con salvado de trigo y avena (1: 1). La selección de los insectos se realizó completamente al azar. Cada unidad experimental consistió de 12 insectos, larvas o adultos, en cajas de Petri de vidrio de 9 cm de diámetro. Se utilizaron 3 réplicas por tratamiento por concentración o por medio de cultivo, incluyendo los controles.



**Figura 4.4** Estados del ciclo biológico de *Tenebrio molitor*

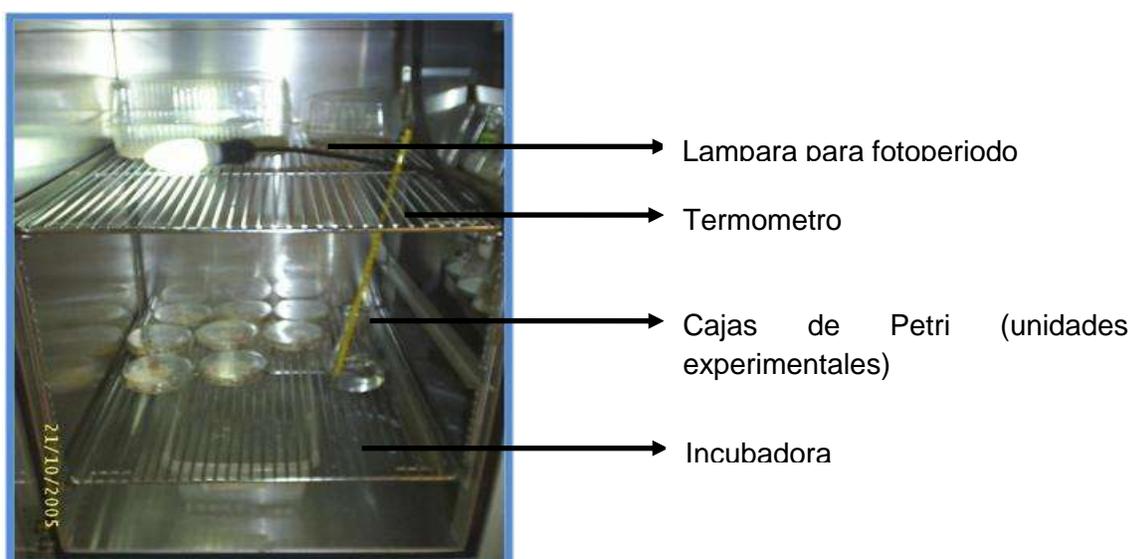
#### 4.5.2 Preparación de las suspensiones de esporas

Para las pruebas de virulencia se prepararon las dosis  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  esporas  $\text{ml}^{-1}$ , a partir de esporas cosechadas en 10 ml de Tween 80 al 0.01%, de medio de **ADS** que había sido mantenido a 28°C durante 12 d. Para los experimentos de determinación de la virulencia de las esporas producidas sobre diferentes medios de cultivo se utilizó una suspensión de  $1 \times 10^8$  esporas  $\text{ml}^{-1}$  cosechada en 10 ml de Tween 80 al 0.01%, a partir de los medios **ADS**, **QCS**, **CHA** y **STS**. El número de esporas se determinó por conteo con el hemocitómetro. Para determinar la viabilidad de los esporas usadas en los bioensayos, se prepararon cajas de **ADS** sobre las que se aplicó una dosis conocida de esporas, se incubó a 28°C durante 24 h, transcurrido el tiempo de incubación se agregó azul de lactofenol para fijar y se estimó el porcentaje de germinación mediante examen microscópico a una ampliación de 400x.

#### 4.5.3 Aplicación del inóculo a los insectos

La suspensión de esporas (20 ml) se mantuvo en un vaso de precipitado de 50 ml en constante agitación, los insectos se colocaron dentro de una canastilla de alambre y se sumergieron, simultáneamente los 12 insectos, durante 3 s en la suspensión. Los controles fueron inmersos en una solución de Tween 80, al 0.01%, estéril. Los insectos se pasaron a

las cajas de Petri, durante 15 min aproximadamente, hasta que el cuerpo del insecto estuvo completamente seco, y se les agregó avena estéril. Las unidades experimentales se incubaron a 28°C, en cámaras húmedas manteniendo la HR de 75%, y ciclos de luz: oscuridad de 12 h: 12 h, según se muestra en la Figura 4.5. La mortalidad se registró cada 24 h durante 10 d. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Una vez muerto el insecto fue retirado de la caja de Petri en donde se encontraba confinado, se dejó secar y posteriormente se colocó en una cámara húmeda para favorecer el desarrollo y esporulación del hongo.



**Figura 4.5** Esquema de la cámara de incubación para los bioensayos de virulencia

#### 4.5.4 Análisis de los resultados de virulencia

El resultado se expresó en porcentaje de sobrevivencia acumulada y se obtuvieron los parámetros  $TS_{50}$  y  $TS_{10}$ , donde,  $TS_{50}$  es el tiempo al cual se obtiene el 50% de la sobrevivencia de los insectos en las unidades experimentales; y el  $TS_{10}$  es el tiempo al cual se obtiene el 10% de la sobrevivencia de los insectos en las unidades experimentales. Se usó el análisis Probit para estimar las  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  (adultos infectados con esporas provenientes de **ADS**) de cada cepa, donde,  $CL_{50}$  es la concentración de la suspensión de las esporas a la cual se obtiene el 50% de la muerte de los insectos en las unidades experimentales y  $CL_{90}$  es la concentración de la suspensión de las esporas a la cual se obtiene el 90% de la muerte de los insectos en las unidades experimentales.

Los datos experimentales se ajustaron a una función de decaimiento exponencial detallada en la ecuación 8:

$$Y = 100; \text{ si } 0 \leq t \leq t_0$$
$$Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S; \text{ si } t > t_0 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde,

$Y$ = Sobrevivencia a tiempo  $t$  (%);  $k$ = Tasa específica de mortalidad ( $d^{-1}$ );  $t_0$ = Tiempo de retardo de inicio de la muerte ( $d$ );  $S$ = Nivel de sobrevivencia asintótica estimada (%).

Este modelo corresponde a la solución de una ecuación diferencial de primer orden con el tiempo de retardo indicado y el valor asintótico, con la condición que:  $Y \rightarrow S, \text{ para } t \rightarrow \infty$

#### 4.6 Consideraciones teóricas

Los datos experimentales del crecimiento fúngico en medio sólido se utilizaron para estimar todos los parámetros cinéticos por ajuste a los diferentes modelos, usando el programa Origin 8.0 y la herramienta Solver que utiliza un ajuste de suma mínima de errores (Excel 2007, Microsoft Windows).

El crecimiento fúngico en medio sólido se ajustó por las ecuaciones de los modelos: Logístico (Mitchell, 2004), el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990), el modelo de dos fases desarrollado por Ikasari y Mitchell (2000) y el modelo doble exponencial (DE) propuesto en este trabajo, los cuales se describen en el anexo I.

#### 4.7 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados por medio del análisis de varianzas, (ANOVA), usando la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey-Kramer LSD test y por medio de la prueba de  $t$  de Student, según el caso. El nivel de significancia estadística empleado fue de 5%. Se utilizaron los programas estadísticos NCSS 2000 y SPSS. La prueba de  $ji$  cuadrada ( $\chi^2$ ) se realizó en el programa Excel 2007 (Microsoft, Windows).

## **PARTE II, RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **EFFECTO DE LOS SUSTRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD QUITINOLÍTICA Y PROTEOLÍTICA EN CMS**

## 5. EFECTO DE LOS SUSTRATOS SOBRE LA ACTIVIDAD HEXOSAMINIDASA Y PROTEASA EN CMS

En esta sección se evaluó el efecto de algunas fuentes de carbono como inductores de la actividad hexosaminidasa y proteasa en CMS y las diferencias presentadas por la cepa mutante respecto a la silvestre. Las fuentes de carbono evaluadas fueron la glucosa (**GN**), para observar la producción basal de las enzimas, la quitina coloidal (**QC**) como sustrato de inducción directa, y la quitina coloidal adicionada con glucosa (**QGN**) para observar el efecto represor de este polisacárido en la producción de las enzimas. Además, se utilizó el medio de cultivo que contenía partículas molidas de cutícula de chapulín (*Sphenarium purpurascens*) (**CHA**) como sustrato natural en estado sólido, por contener las moléculas de proteína y quitina de manera acomplejada.

### 5.1 Cinética de producción de las enzimas quitinolíticas sobre quitina coloidal

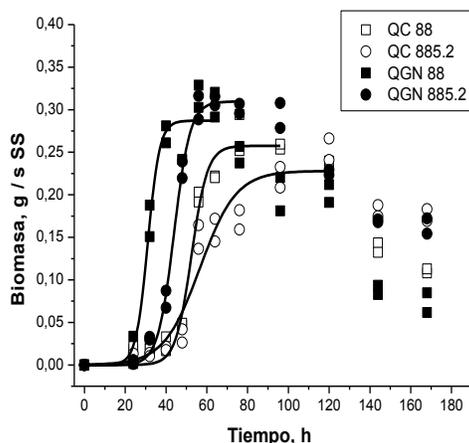
#### 5.1.1 Crecimiento

Se evaluaron las cepas silvestre y mutante creciendo sobre un medio que contenía solo quitina coloidal y sobre quitina coloidal adicionada con glucosa y nitrato de sodio. Las cepas presentaron diferencias significativas en cuanto a su crecimiento sobre los sustratos y la producción de enzima hexosaminidasa.

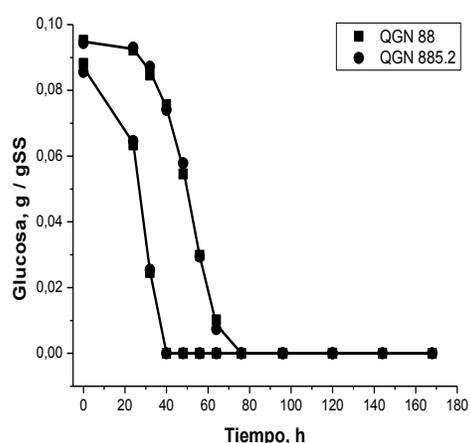
En la figura 5.1 se muestra la producción de biomasa de las dos cepas en los medios **QC** y **QGN**. La biomasa máxima obtenida mediante el ajuste de los datos al modelo Logístico de crecimiento fue mayor en el medio **QGN** que en **QC** para la cepa mutante (27.3%), mientras que en la cepa silvestre no se presentó diferencia estadísticamente significativa en este parámetro. La biomasa máxima en el medio **QC** fue mayor en la cepa silvestre que en la mutante (14%). Mientras que en el medio **QGN** no se halló diferencia en la concentración de biomasa máxima alcanzada por las dos cepas, el valor máximo se presentó 6 horas antes en la cepa 88 que en la 885.2.

La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenida mediante el ajuste de los datos con el modelo logístico fue mayor en el medio **QGN** que en **QC** para las dos cepas, esto fue 44% mayor para la cepa 88 y 18.2% para la cepa 885.2. Aunque las diferencias no fueron

estadísticamente significativas entre las cepas en el medio **QC** pero si en **QGN** (31.2% mayor en la cepa 88 que en 885.2). Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 5.1.



**Figura 5.1** Producción de la biomasa en los medios **QC** y **QGN**



**Figura 5.2** Consumo de la glucosa en el medio **QGN**

La Figura 5.2 muestra el consumo de glucosa en el medio **QGN**, el cual se llevó a cabo en 40 h en la cepa silvestre y en 80 h en la cepa mutante. La tasa de consumo de glucosa fue igual en las dos cepas, sin embargo en la cepa mutante se presentó un retraso en las primeras 24 horas, respecto a lo consumido por la cepa silvestre, lo cual se reflejó en el tiempo que duró la fase *lag* en el medio **QGN**, esto es 24 h para la cepa silvestre y 32 h en la cepa mutante. No obstante, fue menor que la presentada en el medio **QC**, 40 h.

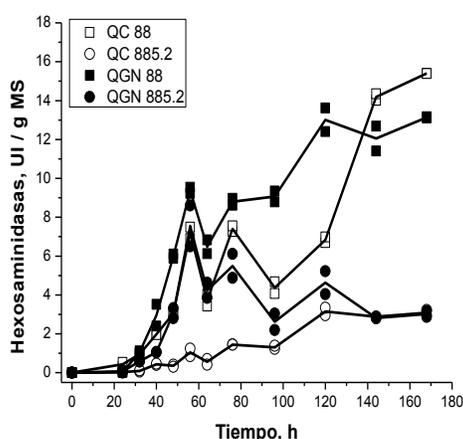
**Tabla 5.1** Parámetros de crecimiento de las cepas en los medios **QC** y **QGN**, según el modelo Logístico

	$X_{\max}$ (g g <sup>-1</sup> SS)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
88 ( <b>QC</b> )	0.28 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.09 ± 0.001 <sup>a</sup>
885.2 ( <b>QC</b> )	0.24 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.007 <sup>a</sup>
88 ( <b>QGN</b> )	0.31 ± 0.01 <sup>bc</sup>	0.16 ± 0.002 <sup>c</sup>
885.2 ( <b>QGN</b> )	0.33 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.11 ± 0.003 <sup>b</sup>

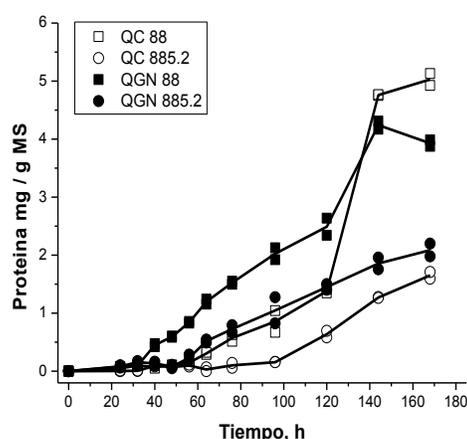
### 5.1.2 Producción de hexosaminidasas

La actividad hexosaminidasa evaluada en el extracto extracelular obtenido de los cultivos en los medios **QC** y **QGN** se muestra en la Figura 5.3. A 120 h de cultivo, esta actividad fue mayor para la cepa silvestre en los dos medios, esto es 5 veces más en el medio **QC** y 4.3

veces más en el medio **QGN**. Sin embargo en el medio **QGN** las diferencias se hacen significativas a partir de las 76 h de cultivo, y en el medio **QC** las diferencias son significativas a lo largo de todo el cultivo, excepto a las 24 horas. En cuanto a las diferencias respecto a las cepas entre los medios, en la cepa 88 se presentaron después de las 48 h de cultivo y en la cepa 885.2 se presentaron entre las 48 y 76 horas, la producción fue mayor en ambos casos en el medio **QGN**. La figura 5.4 muestra la concentración de proteínas en el extracto extracelular, con una tendencia permanente de continuo ascenso en el tiempo, y de mayor producción en la cepa silvestre que en la mutante después de las 24 h de cultivo. La concentración de proteínas en el cultivo es diferente entre los medios, siendo mayor en el medio **QGN**, siguiendo la tendencia obtenida en la producción de hexosaminidasas, según se indica en la Figura 5.4.



**Figura 5.3** Producción de hexosaminidasas en los medios **QC** y **QGN**



**Figura 5.4** Concentración de proteínas en los medios **QC** y **QGN**

Marín-Cervantes y col. (2008) crecieron a *Lecanicillium lecanii* en un sistema muy similar al presentado en este estudio. Los medios de cultivo utilizados contenían la misma composición de sales, pero con 36 g l<sup>-1</sup> de la quitina coloidal en el medio similar a **QC** y 23.3 g l<sup>-1</sup> de quitina coloidal en el medio similar a **QGN**. Al comparar los resultados de este estudio respecto a los reportados por ellos, la tasa de crecimiento de *L. lecanii* fue menor en **QGN** que en **QC**, debido probablemente a la represión catabólica dada por la concentración de glucosa utilizada por ellos (15 g l<sup>-1</sup>), aunque la concentración de biomasa fue 3 veces mayor en el medio **QGN** que en **QC**.

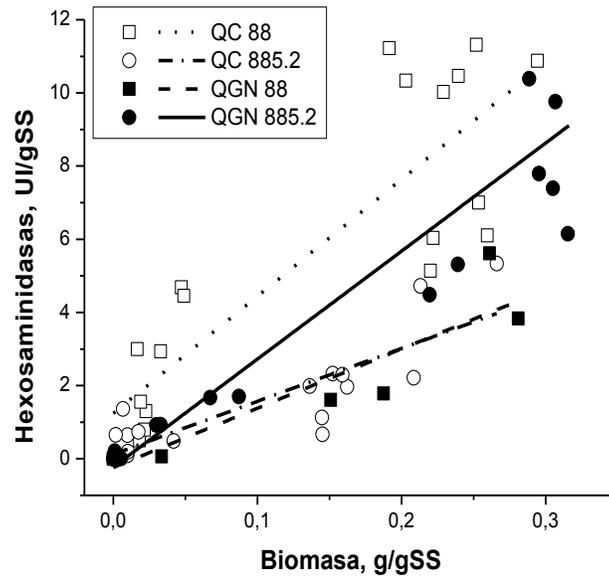
En este estudio, el uso de 5 g l<sup>-1</sup> de glucosa permitió estimular el crecimiento temprano, acortando la fase *lag*, y se produjo una alta cantidad de biomasa y por tanto una mayor producción de hexosaminidasas en el medio **QGN** que en el medio **QC**.

Marín-Cervantes y col. (2008) reportaron que la producción de hexosaminidasas a 120 h de cultivo fue de 5 UE g<sup>-1</sup> PUF en el medio **QC** y de 3 UE g<sup>-1</sup> PUF en el medio **QGN**. En este estudio la producción de la enzima, para el mismo tiempo, para las cepas 88 y 885.2, respectivamente, fue de 10.2 y 5 UI g<sup>-1</sup> PUF en el medio **QC** y de 21 y 7.4 UI g<sup>-1</sup> PUF en el medio **QGN**. Es importante resaltar que ellos catalogaron la cepa en estudio como una alta productora de hexosaminidasas y muy adaptada al sistema de CMS que trabajan, sin embargo las cepas de *B. bassiana* trabajadas en el presente estudio, demostraron ser mejores productoras de hexosaminidasas.

#### 5.1.3 Rendimiento de enzima: biomasa

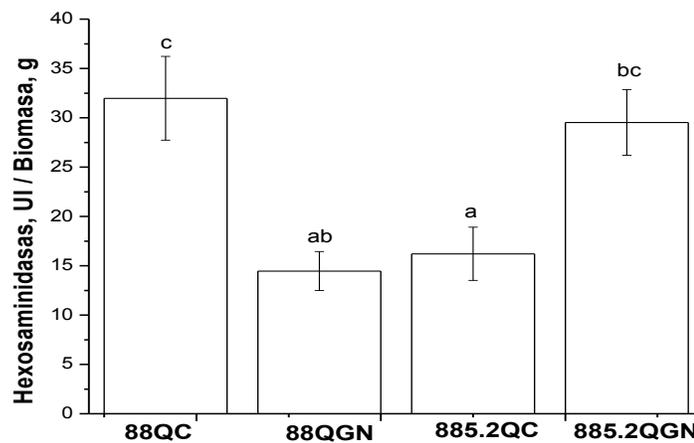
Se analizó el fenotipo de la cepa 885.2 en comparación con la cepa silvestre, en cuanto a la utilización de la quitina coloidal como sustrato inductor de hexosaminidasas, en presencia y ausencia de glucosa. Ya que en presencia de glucosa y otras fuentes de carbono, los microorganismos prefieren utilizar la glucosa, una vez agotada ésta, se inducen las enzimas necesarias para utilizar el sustrato menos disponible. El rendimiento de la enzima respecto a la biomasa, se evalúa mediante la comparación de las pendientes obtenidas del gráfico de producción de enzima contra la biomasa, durante el tiempo que se encuentra presente la glucosa en el medio (García, 2003). Se realizó dicho análisis para las dos cepas en los dos medios, según se muestra en la Figura 5.5.

La cepa silvestre consumió la glucosa antes de las 40 h y posteriormente produjo las hexosaminidasas en continuo ascenso hasta las 80 h de cultivo, punto en el que descendió la biomasa. Mientras que la cepa mutante utilizó la quitina en presencia de la glucosa, esto es durante las primeras 80 h del cultivo, apartir de ese momento presentó un comportamiento similar al medio **QC**, en el cual esta cepa presentó dificultad para crecer (Figura 5.1, 5.2, 5.3).



**Figura 5.5** Producción de enzima hexosaminidasa vs. producción de biomasa en los medios **QC** y **QGN**:

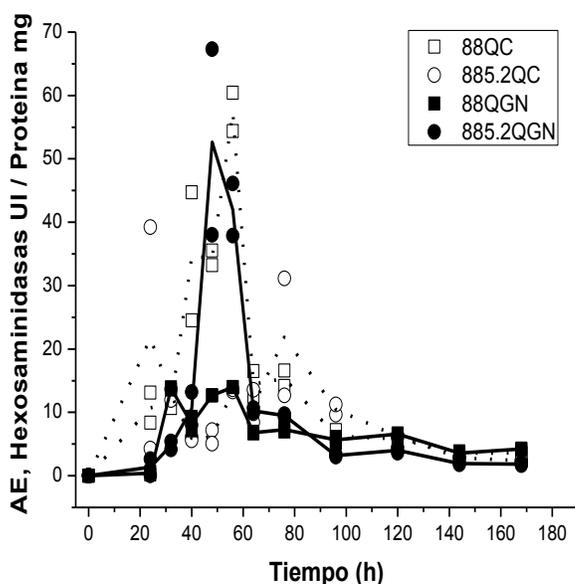
El análisis de las pendientes obtenidas por regresión lineal de la Figura 5.5 indica que el rendimiento de la cepa mutante crecida en **QGN** fue el doble que en el medio **QC**, mientras que en la cepa silvestre se observó lo contrario (Figura 5.6). Lo cual puede indicar represión por la glucosa presente en el medio en la cepa silvestre, condición que no se presentó en la cepa mutante.



**Figura 5.6** Rendimiento de enzima hexosaminidasa por unidad de biomasa, en los medios **QC** y **QGN**.

### 5.1.4 Actividad específica de hexosaminidasa

Se analizó la actividad específica de las hexosaminidasas extracelulares, es decir la producción de hexosaminidasas (UI) por gramo de proteína. La mayor actividad específica se presenta entre las 40 a 60 h de cultivo. Los picos de actividad corresponden a la cepa silvestre en el medio **QC** y a la cepa mutante en el medio **QGN** (Figura 5.7). Se observó además, que la cepa 885.2 produjo menos proteína y hexosaminidasa en cada unidad experimental en comparación con la cepa silvestre, sin embargo, la proporción de hexosaminidasas en el medio **QGN** fue 3 veces mayor entre las 48 a 56 h de cultivo. En cuanto al medio **QC**, la cepa 88 produjo entre 4 a 7 veces más actividad hexosaminidasa específica entre las 40 a 56 h de cultivo que la cepa mutante.



Actividad específica (UE hexosaminidasas/mg proteína)			
	120 h	144 h	168 h
<b>88 QC</b>	4.7±0.02 <sup>de</sup>	2.9±0.04 <sup>c</sup>	3±0.1 <sup>c</sup>
<b>885.2 QC</b>	4.2±0.05 <sup>d</sup>	2.1±0.03 <sup>b</sup>	1.8±0.03 <sup>ab</sup>
<b>88 QGN</b>	5.1±0.08 <sup>e</sup>	2.8±0.3 <sup>c</sup>	3.3±0.08 <sup>c</sup>
<b>885.2 QGN</b>	3.1±0.3 <sup>c</sup>	1.5±0.1 <sup>a</sup>	1.5±0.2 <sup>a</sup>

**Figura 5.7** Actividad hexosaminidasa específica en los medios **QC** y **QGN**

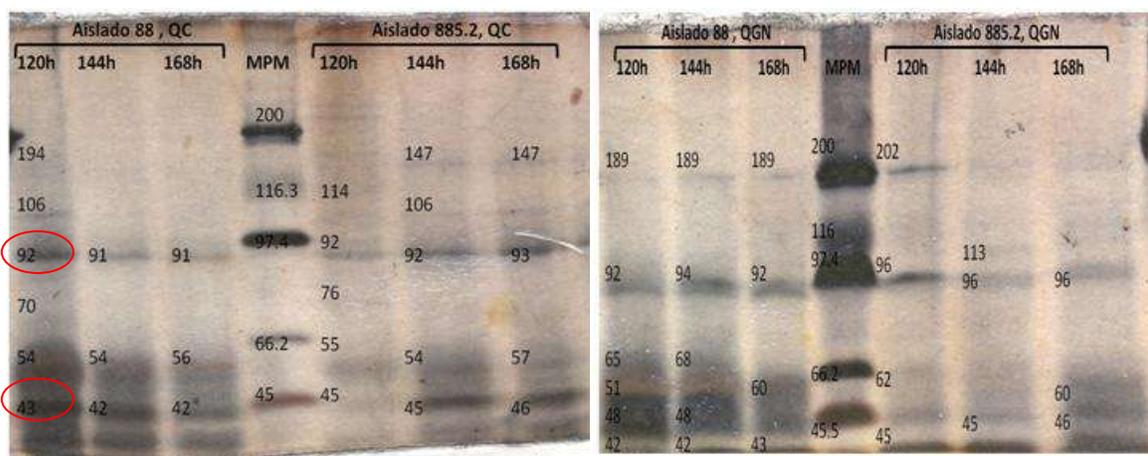
**Tabla 5.2** Actividad hexosaminidasa específica en los medios **QC** y **QGN**

### 5.1.5 Electroforesis monodimensional

Se llevó a cabo la electroforesis monodimensional de los extractos enzimáticos obtenidos a 120, 144 y 168 h de los CMS sobre los medios **QC** y **QGN** (Figura 5.8). En los dos medios y en las dos cepas se encontraron bandas comunes como las correspondientes a los pesos moleculares de 92-94 KDa y 42-45 KDa, las cuales podrían corresponder a una

hexosaminidasa y a una endoquitinasa respectivamente (Bidochka y col., 1993; Havukkala y col., 1993).

Los patrones de las bandas en los distintos tiempos y cepas son muy similares, sin embargo, en el carril de las proteínas de los extractos de 120 h de cultivo, se observó un mayor número de bandas que en los extractos de 144 h y 168 h de cultivo, que se relaciona con las actividades específicas encontradas en estos tiempos.

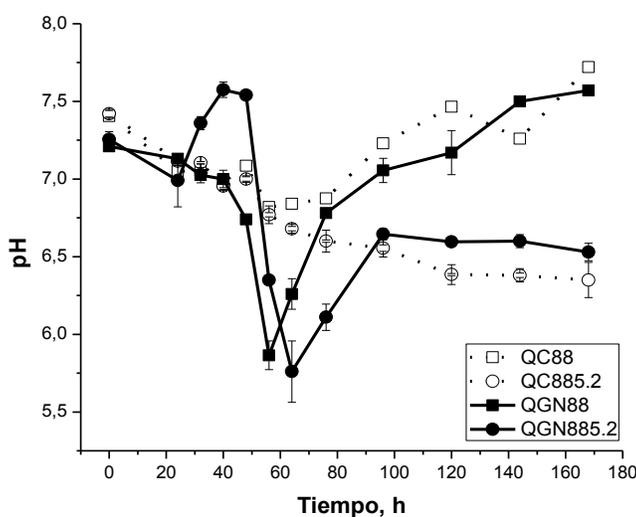


**Figura 5.8** PM aparentes de las proteínas de los extractos obtenidos en el medio **QC** (izquierda) y en el medio **QGN** (derecha).

#### 5.1.6 Cinética del pH

Según lo observado en el perfil del pH (Figura 5.9), las dos cepas presentaron el mismo perfil hasta las 60 h en el medio **QC**, a partir de entonces, la cepa 88 aumentó ligeramente el pH hacia la alcalinidad, y la cepa 885.2 lo modificó de pH 6.8 a 6.4. En el medio **QGN**, se observaron diferencias a partir de las 24 h, hubo una disminución cercana a un valor del pH de 5.7 y posteriormente un aumento hasta mantenerse en valores de 6.5 y 7.5, similares a los obtenidos en el medio **QC**. Esta caída abrupta pudiera estar vinculada al consumo de la fuente de carbono adicional, en forma de glucosa, posiblemente hacia la formación de ácidos orgánicos, durante la glucolisis y consecuente ciclo de Krebs. De los análisis de HPLC y TLC en búsqueda de ácido oxálico, ya reportado para esta especie de hongos, no se encontraron concentraciones detectables a la sensibilidad de los equipos utilizados en ninguno de los dos medios analizados.

El comportamiento del pH en el cultivo se asocia con los de la biomasa y la producción de hexosaminidasas, ya que es después de las 76 h de cultivo en el medio **QGN** que cae la biomasa, cambia el pH y cambia la tendencia de las curvas de hexosaminidasas entre las cepas. En el medio **QC** que se mantiene todo el tiempo el pH por debajo de 6.5 en la cepa mutante, y muy baja actividad hexosaminidasa (menos de 2 UI g<sup>-1</sup> MS). Puede ser debido a la relación entre producción de la enzima y pH óptimo de producción, ya que están reportados mayor actividad exoquitinasas a pH de 5 en medio sumergido (Matsumoto, 2001) y también a pH de 7 en CMS (Marín-Cervantes y col., 2008).



**Figura 5.9** Cinética de pH en los medios **QC** y **QGN**

En los estudios de Marín-Cervantes y col. (2008), realizados en un sistema similar de CMS, encontraron que el pH tiende a la alcalinidad y se mantiene en el tiempo en el medio **QC** mientras que en el medio **QGN** tiene el mismo comportamiento que en este estudio solamente a humedad relativa (HR) de 85%. Barranco-Florido (2004) al crecer el HE *L. lecanii* en CMS sobre cutícula de chapulín al 6% adicionada con sacarosa al 1%, observó un comportamiento similar, es decir, una disminución abrupta del pH en las primeras horas del cultivo para pasar a la alcalinidad hacia las 40 h, lo cual coincidió con el inicio de la producción de las proteasas. Mientras que en el medio que contenía solamente cutícula al 6% como fuente de carbono, el pH tendió a la alcalinidad desde las primeras horas, relacionado también con la producción de proteasas, sin embargo, no se evaluó producción de proteasas ni consumo de la fuente de nitrógeno.

El pH es un factor importante en el crecimiento fúngico y la producción enzimática, éste cambia asociado a modificaciones en el sustrato (Mitchell, 2000). En la naturaleza se han observado modificaciones en el pH debido a la utilización diferencial de los sustratos, modificando el nicho ecológico en pro del hongo y el mejoramiento de las condiciones circundantes, como posible mecanismo de aumento de la virulencia. Principalmente, se ha observado el aumento del pH sobre la cutícula del hospedero por parte del HE para poder solubilizar mejor los nutrientes encontrados allí (St Leger y col., 1986).

## 5.2 Producción basal de enzimas hexosaminidasas y proteasas

Se realizó una comparación a 56 h de cultivo de la producción de las enzimas proteolíticas y quitinolíticas en el medio con glucosa 2.8% y nitrato de sodio, como únicas fuentes de C y N (**GN**), respecto a los obtenidos en los medios **QC** y **QGN**. En el medio **GN** se observó que la cepa 88 consumió el 89% de la glucosa, mientras que la cepa 885.2 solo el 4%, reforzando la idea de que la cepa 885.2 tiene afectado el mecanismo de incorporación de la glucosa a la célula. Todo lo cual se relacionó con una mayor producción de biomasa (30 veces), proteína (20 veces), proteasas (2.8 veces) y hexosaminidasas (8 veces) en la cepa 88 que en la 885.2, según se muestra en la Tabla 5.3.

Se comparó también la producción de la enzima hexosaminidasa en presencia del sustrato inductor, quitina coloidal. La cepa 88 produjo 4 veces mas hexosaminidasas en el medio **QC** que en **GN** y no se observó diferencia en la producción entre los medios **QGN** y **QC**. Mientras que en la cepa 885.2, la producción de hexosaminidasas en **QGN** fue 7.5 veces mayor que en **QC** y 34 veces mayor que en **GN** (Tabla 5.3).

**Tabla 5.3** Producción de enzimas hexosaminidasas, proteasas y proteínas en los medios **GN**, **QC** y **QGN**

	GN		QC		QGN	
	88	885.2	88	885.2	88	885.2
Biomasa	0.15±0.01 <sup>b</sup>	0.005±0.002 <sup>a</sup>	0.2±0.01 <sup>b</sup>	0.15±0.02 <sup>b</sup>	0.32±0.02 <sup>cd</sup>	0.3±0.02 <sup>c</sup>
Proteína	0.6±0.03 <sup>c</sup>	0.03±0.02 <sup>a</sup>	0.14±0.02 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.84±0.02 <sup>d</sup>	0.23±0.08 <sup>b</sup>
Hexosaminidasas	1.74±0.3 <sup>a</sup>	0.22±0.08 <sup>a</sup>	7.2±0.4 <sup>b</sup>	1 ± 0.3 <sup>a</sup>	9.4±0.2 <sup>b</sup>	7.5±1.5 <sup>bc</sup>
Proteasas	310±22 <sup>b</sup>	110±61 <sup>a</sup>	NE	NE	NE	NE

**Biomasa** (g g<sup>-1</sup> SS), **Proteína** (mg g<sup>-1</sup> MS), **Hexosaminidasas** (UI g<sup>-1</sup> MS), **Proteasas** (UA g<sup>-1</sup> MS). NE: no evaluado

### 5.3 Cinética de producción de enzimas hexosaminidasas y proteasas sobre cutícula de chapulín

Para la evaluación del crecimiento de *Beauveria bassiana* sobre cutícula de chapulín (*S. purpurascens*) por medio de la medición de la producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> se cambió el sistema experimental a columnas de aireación forzada. Por lo cual se caracterizaron el tipo de corte del PUF a usar, así como la porosidad del soporte molido donde se obtuvieran los mejores crecimientos. Asimismo, se decidió usar este sistema para las evaluaciones posteriores de las cepas sobre diversos sustratos, por lo que se halló las relaciones C: N de los sustratos por medio del análisis de las composiciones elementales.

#### 5.3.1 Caracterización de los sustratos

En la Tabla 5.4 se muestran los resultados del análisis elemental de los sustratos empleados en los cultivos, los cuales permitieron calcular las relaciones C: N de los medios utilizados y reportados en la sección de Materiales y Métodos.

Se pueden observar ciertas diferencias respecto a las fórmulas encontradas en la literatura, la composición química de la cutícula de chapulín reportada por Barranco-Florido (2004) difiere de la encontrada en el presente estudio, debido a la naturaleza de la muestra que puede ser variable de acuerdo al lugar de recolección de los chapulines y demás características propias de la ecología del insecto.

**Tabla 5.4** Análisis elemental de los sustratos utilizados.

Sustrato	PM	C: N	Fórmula Elemental	Referencia
Salvado de trigo	24.98	17.2	C <sub>20.06</sub> H <sub>37.7</sub> N <sub>1</sub> O <sub>13.04</sub>	
Quitina Coloidal	27.15	6.9	C <sub>8.06</sub> H <sub>14.57</sub> N <sub>1</sub> O <sub>5.84</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>1</sub> O <sub>5</sub> <sup>(1)</sup>
Cutícula de Chapulín	23.89	4.27	C <sub>4.98</sub> H <sub>8.76</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2.28</sub>	C <sub>50.84</sub> H <sub>6.95</sub> N <sub>10.28</sub> <sup>(2)</sup>
Peptona	29.96	3.13	C <sub>3.65</sub> H <sub>7.35</sub> N <sub>1</sub> O <sub>2.76</sub>	

Referencias: (1) Sigma-Aldrich, 2009 (2) Barranco-Florido, 2004.

### 5.3.2 Elección del tipo de soporte para CMS en columna

#### 5.3.2.1 Determinación del tamaño de la partícula a usar

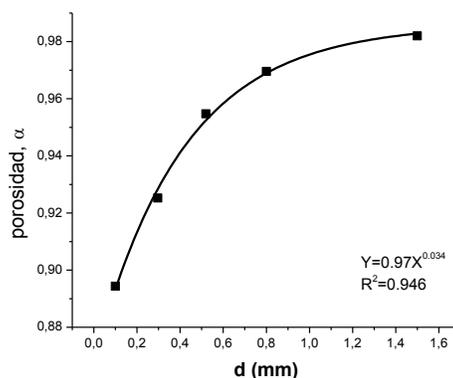
Se realizó una evaluación de la porosidad de las partículas de PUF molido, para escoger las que ofrecieran las mejores cualidades para continuar los estudios en CMS en columna. La determinación de la porosidad volumétrica se hizo según la fórmula presentada en la ecuación 1, donde la fracción del volumen total que está vacío o fracción hueca se denomina  $\alpha$  (Foust y col., 1987). Los datos experimentales se muestran en el anexo H. Para ello, se consideró que el poliuretano es prácticamente impermeable al agua y que por ello, el espacio intersticial está completamente ocupado por este líquido.

En la Tabla 5.5 y en la Figura 5.10 se muestran los valores de la porosidad volumétrica obtenida del poliuretano molido. Estos valores fueron directamente proporcionales al tamaño de la partícula, e inversamente proporcionales a la densidad aparente. La función que representó dicha relación es exponencial, y presentó un ajuste de  $R^2$  de 0.94.

**Tabla 5.5** Porosidad volumétrica de las partículas de PUF molido

d	v agua	v PUF + agua	$\alpha$
1.5	1.96	1.995	0.984
0.8	1.94	1.999	<b>0.971</b>
<b>0.52</b>	1.89	1.995	0.949
<b>0.297</b>	1.86	1.998	0.932
d= diámetro (mm); v= volumen (ml); $\alpha$ = porosidad (peso agua/peso total)			

**Figura 5.10** Porosidad volumétrica de las partículas de PUF molido

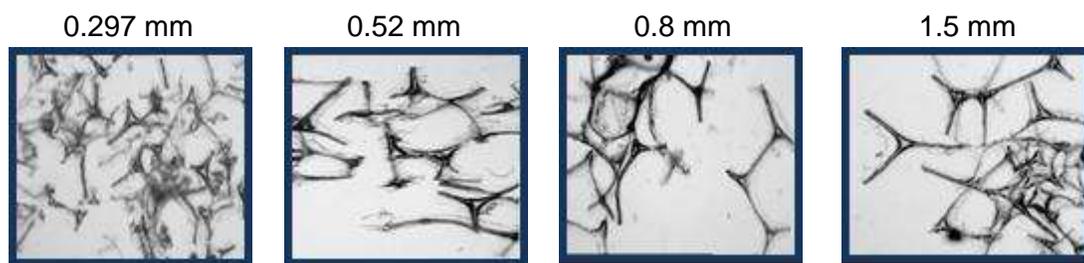


Se eligió trabajar con las partículas de 0.5 a 0.8 mm de diámetro, ya que tienen una porosidad (0.9712) que permitiría una buena oxigenación, la adecuada toma de los nutrientes que se encuentran dispuestos sobre las fibras del soporte, y en consecuencia el crecimiento.

El uso de soportes inertes permite la determinación directa de la biomasa, extracciones enzimáticas más limpias y aireación homogénea (Zhu y col., 1994). El PUF se ha utilizado como un soporte adecuado para el CMS, ya que presenta alta porosidad, baja densidad y relativamente alta absorción de agua que proporciona un medio ambiente satisfactorio para el crecimiento de los hongos (Viniegra-González y Favela, 2006).

El tamaño de la partícula a usar es un factor crítico en el proceso del CMS; las partículas pequeñas proporcionan mayor relación área-volumen, adecuada para la toma de nutrientes y el ataque por parte del hongo. Sin embargo, es ideal mantener un equilibrio, donde no se presente aglomeración de las partículas pequeñas que pudieran interferir en la aireación del proceso, y por tanto causar un pobre crecimiento y una remoción defectuosa del calor, lo cual se evidencia en la densidad de empaque de la columna, variable importante a controlar en el proceso (Pandey, 2003). Marín-Cervantes y col. (2008) reportaron una porosidad del PUF picado de 1 mm de diámetro de 0.912. Dalla Santa y col. (2005) encontraron los mejores rendimientos de producción de conidios utilizando partículas de sustratos de origen agroindustrial de 0.8 a 2 mm de diámetro.

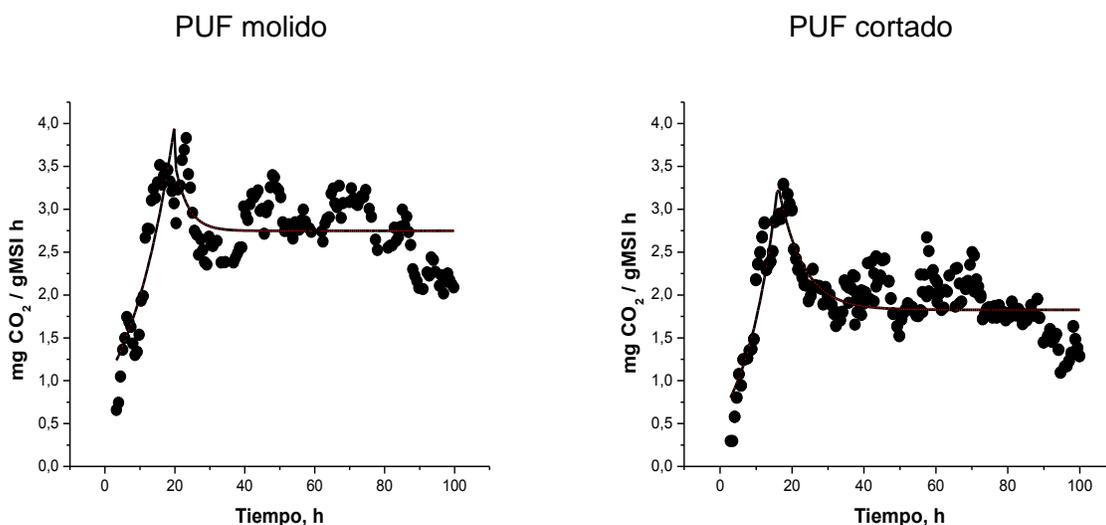
Las partículas del PUF molido observadas al microscopio óptico, se muestran en la Figura 5.11.



**Figura 5.11** Partículas de PUF molido, 100x

### 5.3.2.2 CMS para la elección del tipo de soporte sólido

Se realizó el CMS de la cepa 885.2, para saber si se utilizaría PUF molido ( $d= 0.8$  mm) o PUF cortado (cubos de 5 mm). Las Figuras 5.12a y 5.12b muestran la evolución de la tasa respiratoria específica ( $\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MSI}$ ) con PUF molido y PUF cortado, respectivamente, evaluadas en columnas de aireación forzada. Los datos se ajustaron al modelo de crecimiento doble exponencial propuesto en el presente trabajo.



**Figura 5.12** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en cultivo en medio sólido sobre PUF molido y sobre PUF cortado, de la cepa 885.2

Las curvas tuvieron dos fases bien marcadas: Una creciente, seguida de un cambio abrupto hacia otra decreciente. Cabe resaltarse que la forma en que se preparó el soporte inerte (PUF) molido o cortado, no se tradujo en diferencias importantes entre las curvas respiratorias. Los coeficientes respiratorios y las velocidades específicas de crecimiento no fueron estadísticamente diferentes. Sin embargo, la producción total de CO<sub>2</sub> y el consumo total de O<sub>2</sub> fueron estadísticamente mayores en el PUF molido que en el PUF cortado en cubos, lo cual es indicativo de un mayor crecimiento en este tipo de soporte (Tabla 5.6). Además, el parámetro decisivo fue la observación de las columnas, ya que el PUF molido permitió el crecimiento mucho más homogéneo del hongo mientras que en el PUF cortado se presentó abundante crecimiento en pequeños espacios de los cubos.

En la Tabla 5.6 se muestran además, las tasas específicas de producción de CO<sub>2</sub> obtenidas con los ajustes a los modelos Logístico ( $\mu_{log}$ ), Gompertz ( $\mu_{gomp}$ ), Ikasari y Mitchell ( $\mu_{I-M}$ ), doble exponencial ( $\mu_{DE}$ ), cuyas ecuaciones se detallan en el anexo I. El valor del coeficiente respiratorio (CR) es el promedio del cociente de la producción de mmoles de CO<sub>2</sub> y el consumo de mmoles de O<sub>2</sub> en cada punto de la medición durante el cultivo.

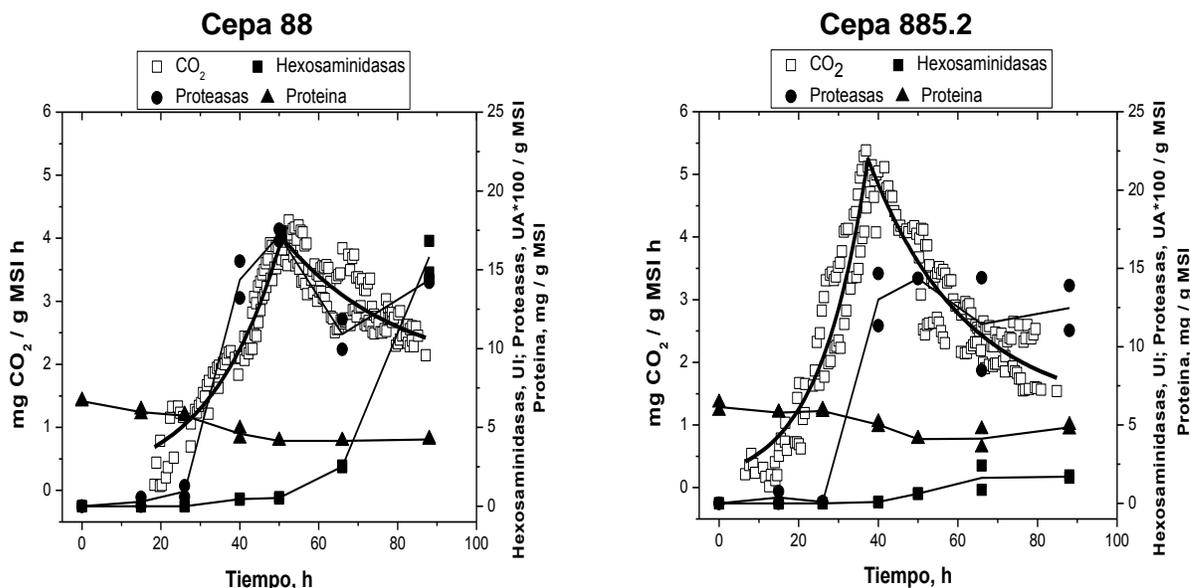
**Tabla 5.6** Parámetros de estimación del crecimiento sobre PUF molido y sobre PUF cortado en cultivo en medio sólido.

	CR	CO <sub>2</sub> Total	O <sub>2</sub> Total	CO <sub>2</sub> Máx t <sub>a</sub>	O <sub>2</sub> Máx t <sub>a</sub>
<b>Molido</b>	1.5±0.08 <sup>a</sup>	235±16 <sup>a</sup>	122±9 <sup>a</sup>	3.3±0.64 <sup>a</sup>	2.2±0.01 <sup>a</sup>
<b>Cortado</b>	1.5±0.02 <sup>a</sup>	187±1.2 <sup>b</sup>	84±2.7 <sup>b</sup>	3.1±0.01 <sup>a</sup>	2±0 <sup>b</sup>
	$\mu_{log}$	$\mu_{gomp}$	$\mu_{IM}$	$\mu_{DE}$	t
<b>Molido</b>	0.05±0.00001 <sup>a</sup>	0.03±0.0003 <sup>a</sup>	0.09±0.009 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>a</sup>	4.4±0.07 <sup>a</sup>
<b>Cortado</b>	0.05±0.0008 <sup>a</sup>	0.03±0.0008 <sup>a</sup>	0.10±2.3E-6 <sup>a</sup>	0.10±01.8E-7 <sup>a</sup>	6.5±0 <sup>b</sup>

**CR**, coeficiente respiratorio instantaneo (mmol CO<sub>2</sub> mmol<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>); **CO<sub>2</sub> Total** (mg CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MSI). **O<sub>2</sub> Total** (mg O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> MSI). **CO<sub>2</sub> Máximo en t<sub>a</sub>** (mg CO<sub>2</sub> h g<sup>-1</sup> MSI). **O<sub>2</sub> Máximo en t<sub>a</sub>** (mg O<sub>2</sub> h g<sup>-1</sup> MSI).  $\mu$ , obtenida por ajustes según: Modelo Logístico ( $\mu_{log}$ ), Gompertz ( $\mu_{gomp}$ ), Ikarasi-Mitchell ( $\mu_{I-M}$ ), doble exponencial ( $\mu_{DE}$ ). **t**, tiempo de inicio de la fase exponencial, (h).

### 5.3.3 CMS sobre cutícula de chapulín

Una vez determinadas las condiciones de operación de las columnas, se realizaron cinéticas de concentración de proteínas totales, producción de enzimas y de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín (Figura 5.13). Los datos de la respiración fueron ajustados al modelo doble exponencial, propuesto en este trabajo, cuyas ecuaciones se encuentran en el anexo I.



**Figura 5.13** Concentración de proteínas, producción de enzimas proteolíticas (\*100), hexosaminidasas y CO<sub>2</sub> en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín.

El inicio de la fase exponencial, de acuerdo a la producción de CO<sub>2</sub>, coincidió con el comienzo de la producción de proteasas. Aproximadamente a las 50 h de la fermentación se presentó la producción máxima de las mismas, 1719 ± 52 UA g<sup>-1</sup> MS, para el tipo silvestre y 1435 ± 32 UA g<sup>-1</sup> MS, para el tipo mutante. Después de los cual, la actividad disminuyó ligeramente y las cepas comenzaron a presentar diferencias en la producción de las enzimas hexosaminidasas. Las cuales se tornaron importantes hacia el día cuatro de evaluación, donde la actividad enzimática fue 7 veces superior en la cepa 88, en comparación con la cepa 885.2, que fue 15.8 ± 1.7 UI g<sup>-1</sup> MS, para el aislamiento silvestre, mientras que en la cepa mutante la producción fue de 1.4 ± 0.1 UI g<sup>-1</sup> MS (Tabla 5.7 y Figura 5.13).

Se encontró una mayor producción de enzimas hidrolíticas en la cepa silvestre, respecto a la mutante, la cual presentó alteraciones en la morfología y en la fisiología del crecimiento, probablemente asociadas a las enzimas quitinolíticas intracelulares involucradas en eventos de fisiología de crecimiento (Jennings y Lysek, 1999; St Leger y col., 1996a). Las enzimas quitinasas extracelulares han sido catalogadas importantes en la etapa de penetración de la cutícula del insecto, sin embargo en nuestros experimentos la actividad tardía (aumenta después de las 50 h de cultivo, según la Figura 5.13) podría estar relacionada con la salida del hongo del cadáver del insecto para la producción de esporas y permanencia del inóculo en el ambiente (Havukkala, 1993; Bidochka y Khachatourians, 1993).

Los valores obtenidos en las proteasas indican que la desregulación se da solo en las hidrolasas involucradas en el aprovechamiento de los carbohidratos (como se ha reportado en otros microorganismos 2-dog resistentes reportados) sin alterar otras enzimas.

**Tabla 5.7** Concentración de proteínas, producción de enzimas y de biomasa en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín a 88 h de cultivo

	Cepa 88	Cepa 885.2
<b>Hexosaminidasas</b>	15.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>Proteasas</b>	1436 ± 23 <sup>a</sup>	1247 ± 202 <sup>a</sup>
<b>Δ proteína</b>	4.2 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.2 <sup>a</sup>

**Hexosaminidasas** (UI g<sup>-1</sup> MS), **Proteasas** (UA g<sup>-1</sup> MS), **Δ Proteína**: Disminución de la concentración de proteína respecto al inicio del cultivo (mg g<sup>-1</sup> MS).

En el presente estudio la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> alcanzada alrededor de las 50 h de cultivo fue de 4.06 ± 0.32 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MSI para la cepa 88; y 5.25 ± 0.2 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MSI para la cepa 885.2, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos, según se muestra en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8** Parámetros de estimación del crecimiento de las cepas en cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín.

Variable	Cepa 88	Cepa 885.2
CO <sub>2</sub> Total (mg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> MSI)	165.4 ± 9 <sup>a</sup>	190.1 ± 2.6 <sup>a</sup>
O <sub>2</sub> Total (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> MSI)	105.6 ± 23 <sup>a</sup>	115 ± 5.3 <sup>a</sup>
CO <sub>2</sub> Máximo en t <sub>a</sub> (mg CO <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> MSI h)	4 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.3 <sup>a</sup>
O <sub>2</sub> Máximo en t <sub>a</sub> (mg O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> MSI h)	2.7 ± 0.45 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.25 <sup>a</sup>
t (h)	25 ± 3.3 <sup>a</sup>	14.05 ± 4.2 <sup>b</sup>
CR (mmol CO <sub>2</sub> mmol <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.05 <sup>a</sup>
μ <sub>(DE)</sub> (h <sup>-1</sup> )	0.05 ± 0.0	0.08 ± 0.00

t: tiempo que dura la fase de retardo o lag; CR: coeficiente respiratorio

Al comparar los parámetros obtenidos en este trabajo, respecto a otros HE reportados en la literatura, se observó que la máxima producción de CO<sub>2</sub> de *L. lecanii* crecido en medio de quitina de camarón (40 g l<sup>-1</sup>) en CMS, fue de 2.5 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MSI (Matsumoto y col., 2004). Por otra parte, para *L. lecanii* crecido en CMS sobre cutícula de *Sphenarium purpurascens*, la máxima producción de CO<sub>2</sub> fue de 2.3 mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> MSI (Barranco-Florido y col., 2002). Las comparaciones con otros estudios realizados sobre CMS son difíciles debido a los diferentes métodos de evaluación de biomasa y ensayos enzimáticos utilizados, sin embargo, los perfiles reportados por Barranco-Florido (2004) son similares a los presentados aquí, ya que la actividad principal utilizada en la degradación del sustrato fueron de las proteasas, no obstante, este autor observó, un importante aumento de la actividad quitinolítica a partir de las 30 h de cultivo.

En el estudio de Donatti y col. (2008), se produjo una gran cantidad de Pr1 y Pr2 de *Beauveria bassiana* CG425 crecida en medio de cultivo líquido que contenía cutícula molida de *Rhammatocerus schistocercoides*, por lo que podrían ser específicamente inducidas por los componentes cuticulares. Zhang y col. (2008) reportaron que la cepa CQMa102 de *M. anisopliae* en medio líquido con cutícula de saltamontes 1% (w/v) como única fuente de C y

N, produjo Pr1, la cual se observó después de 12 h de inoculación, y tuvo un incremento abrupto hacia las 24 a 48 h, manteniéndose prácticamente constante hasta las 150 h que duró el cultivo. El comportamiento del cultivo del presente estudio fue muy similar, excepto la tendencia a la baja debido al incremento en la producción de hexosaminidasas, probablemente por la liberación de NAG en el medio, que se sabe es una molécula represora de la actividad proteolítica.

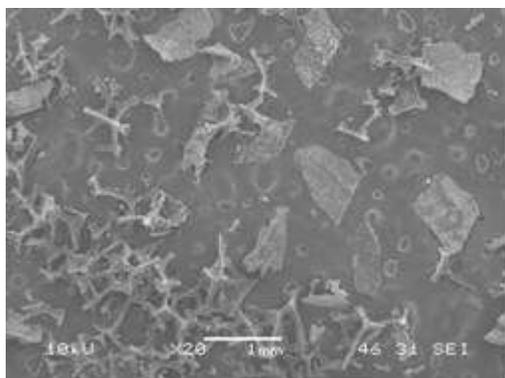
Es sabido por estudios *in vitro* que las proteasas descubren la quitina en la estructura de la cutícula, para la acción posterior de hexosaminidasas sobre ella (St Leger y col., 1986), acción secuencial enzimática estimulada por las características del sustrato, que pudo comprobarse en este experimento en CMS (Fig. 5.14). Además, la alteración del perfil del pH correspondió al perfil de producción de proteasas, tendientes a la alcalinidad (pasa de pH 7 a pH8) en los dos cepas y sin diferencias entre ellos, éste es un efecto bien conocido debido a la liberación de aminoácidos y a la producción de grupos  $\text{NH}_4^+$ , que son importantes en el curso de la infección por hongos, ya que alcalinizan la hemolinfa como un mecanismo complementario de la patogenicidad del HE (St Leger y col., 1998).

En cuanto a las comparaciones del efecto del pH en los medios que contienen cutícula de insectos, Dias y col. (2008) encontraron en cultivo líquido que contenía medio mínimo y cutícula de *Hypothenemus hampei* que la inducción de las enzimas Pr1 y Pr2, por parte de *Beauveria bassiana* en medio sin regulación del pH, se presentó luego de 120 h de cultivo y a pH superior a 5.5; mientras que en medio mínimo con pH superior a 6 la inducción de las proteasas estuvo presente desde las primeras 48 h de cultivo. En este estudio se pudo haber inducido la liberación de las proteasas en el inicio del cultivo en relación con el pH del medio, por ser alcalino.

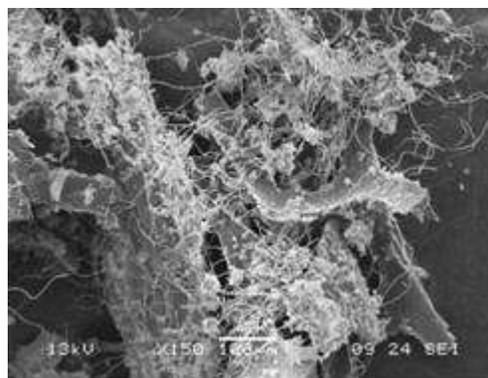
La observación al microscopio de luz, permitió detectar diferencias en cuanto a la manera como fue invadida la cutícula del insecto por los dos cepas. El aislamiento 885.2 mostró mayor ramificación alrededor de los fragmentos de cutícula, mientras que el aislamiento 88 formó hifas únicas que salían de la cutícula y alcanzaban mayor longitud sin ramificarse. Este resultado se corroboró mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 5.14).

El montaje realizado por microscopía electrónica (a), la disposición de las fibras de PUF en conjunto con las de la cutícula de chapulín molida y el micelio (b, c), así como la adhesión

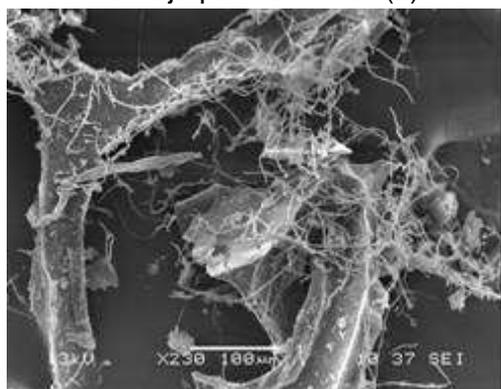
característica de una espora a la superficie de la cutícula (d) se muestran a continuación en la Figura 5.14.



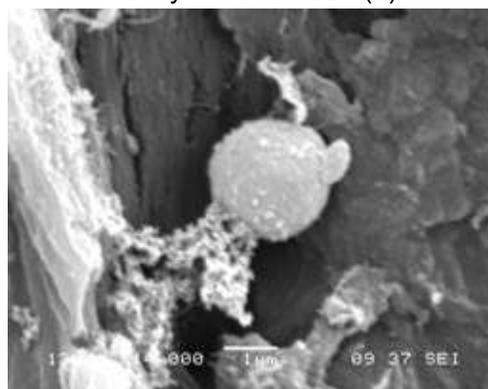
Montaje para SEM20x (a)



PUF y micelio 150x (b)



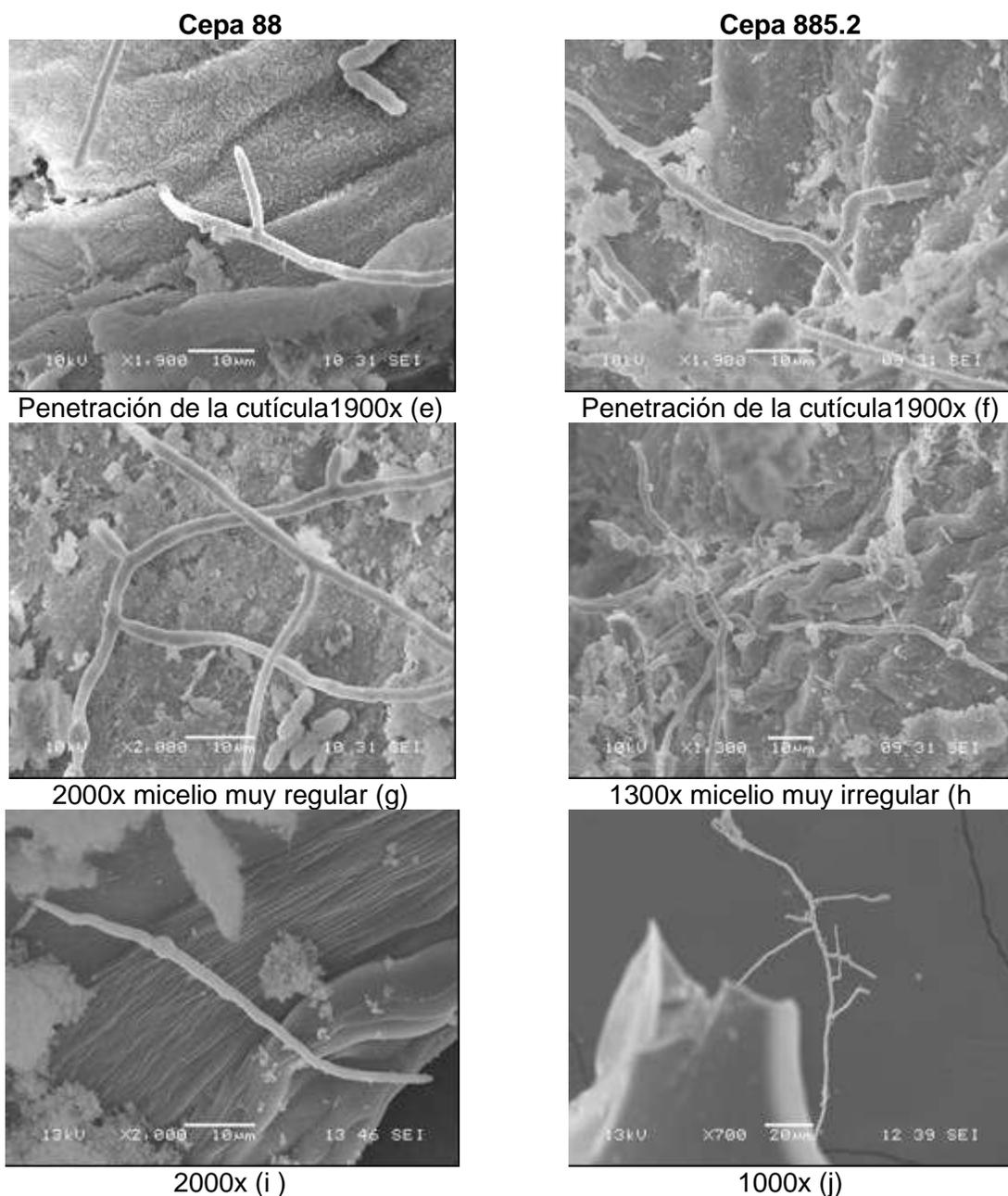
Micelio sobre PUF 230x (c)



Adhesión de espora de cepa 88 a cutícula  
14000x (d)

**Figura 5.14** Imágenes de microscopía electrónica de cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín y PUF molido

Se muestran además las micrografías de las cepas 88 (izquierda) y 885.2 (derecha) en el CMS a diferentes tiempos: ya que se observó a 24 h de crecimiento que en la cepa 88 la mayoría de los conidios se encontraban en fase de germinación, las hifas fueron regulares y formaban ramificaciones de manera ordenada (e), mientras que en el aislamiento 885.2 se presentaron hifas de morfología irregular y tortuosa (f), mayor densidad micelial (h) que en la cepa 88 (g) y la presencia de muy pocas esporas adheridas a la cutícula o en germinación (j) comparado con la cepa 88 (i).



**Figura 5.14** Imágenes de microscopía electrónica de cultivo en medio sólido sobre cutícula de chapulín y PUF molido

#### 5.4 Resumen de resultados

En resumen, La cepa 885.2 presento menos actividad hexosaminidasa que la cepa silvestre, tanto de manera constitutiva, como inducible por sustratos naturales y sintéticos. Sin embargo la cepa mutante mostró mayor rendimiento enzima: biomasa y actividad específica

en el medio **QC** que en **QGN**, contrario a lo observado en la cepa silvestre. La actividad proteolítica no se vio afectada por la mutación. También se observaron alteraciones en la morfología del crecimiento sobre la cutícula de chapulín, las cuales podrían estar ligadas a alteraciones en el consumo de los nutrientes, como la baja tasa de incorporación de la glucosa a la célula y la poca utilización de las fuentes de nitrógeno como la quitina coloidal.

Debido a lo encontrado en este capítulo, respecto a la acción diferencial de las cepas sobre los sustratos estudiados, se decidió profundizar el estudio, mediante el análisis de los mismos sustratos (**GNS**, **QCS**, **QGNS**, **CHA**) bajo las mismas condiciones de cultivo, CMS en columnas de aireación forzada, además se incluyó en el estudio el uso del salvado de trigo (**ST** y **STS**) el cual es un sustrato de fácil asimilación para el crecimiento y es utilizado para la producción de esporas a nivel industrial, en este medio se analizó su disponibilidad para promover un crecimiento óptimo, sin necesidad de agregar oligoelementos al medio de cultivo (**ST**).

## **PARTE II, RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **CRECIMIENTO EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO SOBRE DIVERSOS SUSTRATOS**

## 6 CRECIMIENTO EN CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO SOBRE DIVERSOS SUSTRATOS

Con base en los resultados presentados anteriormente, donde se evidenciaron las diferencias que presentaron las dos cepas en cuanto a la utilización de los diversos medios de cultivo utilizados, se realizaron CMS en columnas de aireación forzada, lo cual permitió estimar el crecimiento según el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub>, asumiendo que el CO<sub>2</sub> medido correspondió a la actividad metabólica del hongo, y que los parámetros cinéticos del crecimiento del hongo fueron obtenidos a partir del ajuste de la integración de los valores experimentales de dCO<sub>2</sub>/dt. Además se evaluó la producción de las enzimas hexosaminidasas y proteasas en el momento final del cultivo, el cual dependió de la evolución de la respiración en el tiempo. Los medios de cultivo evaluados contenían como fuente de carbono y nitrógeno: glucosa y sulfato de amonio (**GNS**), quitina coloidal (**QCS**), quitina coloidal, glucosa y sulfato de amonio (**QGNS**), partículas de cutícula de chapulín (**CHA**), salvado de trigo (**ST**) y salvado de trigo con sales (**STS**), según se indicó en la sección de Materiales y Métodos.

### 6.1 Ajuste a un modelo de crecimiento de dos fases en medio sólido

Las curvas de respirometría obtenidas sobre los diferentes sustratos se ajustaron a cuatro modelos de crecimiento: Logístico, Gompertz, Ikasari-Mitchell modificado y el modelo doble exponencial, planteado en esta tesis, denominado DE. Los modelos utilizados se detallan en el anexo I. Las ecuaciones del modelo doble exponencial (DE) son: La ecuación 19 para describir la zona de aumento de la respiración (antes de  $t_a$ ), mientras que después de  $t_a$  corresponde a la ecuación 24, las cuales se muestran a continuación:

$$\frac{dCO_2}{dt} = r \left[ X_0 e^{\mu t} \right] \quad \text{(Ecuación 19)}$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = r \left[ X_e + (X_a - X_e) e^{-b(t-t_a)} \right] \quad \text{(Ecuación 24)}$$

Ya que no se obtuvieron datos directos de la producción de biomasa, se supuso que el rendimiento respiratorio,  $r$ , (mg CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> X) es constante durante la fase de crecimiento

exponencial y el rendimiento respiratorio,  $r'$ , ( $\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} X$ ) es constante durante la fase de desaceleración.

## 6.2 Comparación de la producción de $\text{CO}_2$ sobre diferentes sustratos

En las Figuras 6.1 se presentan los perfiles de producción de  $\text{CO}_2$  en cada medio para las dos cepas evaluadas y los ajustes a los 4 modelos.

En los 12 casos estudiados, el valor promedio del cociente  $X_d/X_e$  fue de  $2.08 \pm 0.2$ , excepto en el medio **QGNS** para la cepa 88, ya que este valor fue de 1.02, y en la cepa 885.2 en el medio **GNS**, fue de 6.7. Lo deseable en cultivos con el propósito de producir metabolitos secundarios y esporas, es que el valor de  $rX_e$  sea cercano a  $rX_a$  para mantener una menor tasa de desaceleración del metabolismo y una biomasa constante.

En el medio **GNS** el crecimiento de la cepa mutante tuvo un retardo del inicio de la fase exponencial que fue de casi 40 h respecto al fenotipo silvestre, lo cual podría estar relacionado con el bajo consumo y utilización de glucosa que se encontró en los experimentos en matraz en los medios **QGN** y **GN**. El otro medio de cultivo donde se observó diferencia entre las cepas en la duración de la fase *lag*, fue en **CHA**, que fue menor en la cepa mutante por una hora.

Por otra parte, en el otro medio que contenía glucosa (**QGNS**),  $t_a$  y  $\mu$  fueron similares, sin embargo el valor de  $rX_a$  fue del doble en la cepa silvestre que en la mutante. El medio **QCS** ofreció mayores dificultades para ser consumido por las dos cepas, ya que en la cepa 88 el  $t_a$  fue a las 90 h de cultivo y en la cepa 885.2, después de las 130 h de seguimiento del crecimiento aún no se había alcanzado. En este mismo medio, los valores de producción de  $\text{CO}_2$ , consumo de  $\text{O}_2$  y las tasas específicas de crecimiento obtenidas por los 4 modelos, fueron del doble para la cepa 88, respecto a la cepa 885.2. En los medios **CHA**, **ST** y **STS** las diferencias en los parámetros obtenidos por medio de los modelos fueron menores entre las cepas. Por lo que se observaron diferencias entre las cepas en el uso de fuentes de N y C simples, ya que la cepa mutante presentó dificultad para crecer en los medios **GNS**, **QCS** y **QGNS**, pero tuvo la capacidad de crecer bastante bien sobre el sustrato complejo de los medios **CHA**, **ST** y **STS**.

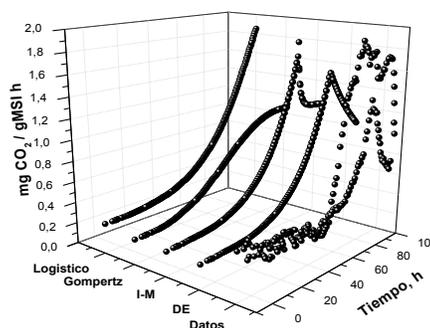
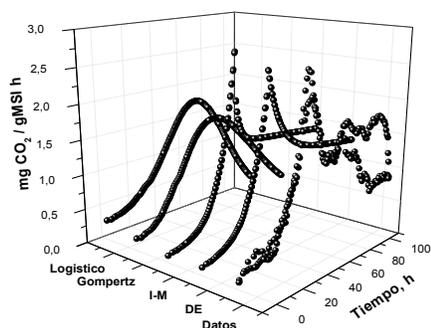
El cultivo sobre salvado de trigo mostró una facilidad de crecimiento en este sustrato por parte de las dos cepas. Las tasas de crecimiento fueron superiores y estadísticamente diferentes que en otros medios para ambas cepas, así como la máxima producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$ . La diferencia en los parámetros evaluados entre los aislamientos no fue estadísticamente diferente en los medios **ST** y **STS**, por lo que tampoco se evidenció diferencias debido al efecto de las sales en el medio, asumiéndose que el salvado de trigo como sustrato provee los nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de este hongo en particular.

**Medio**

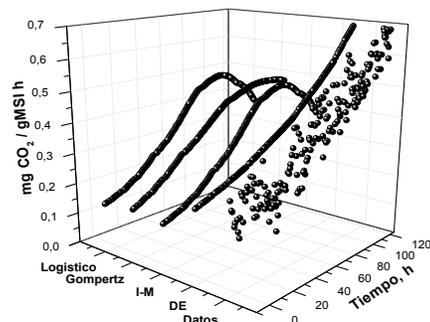
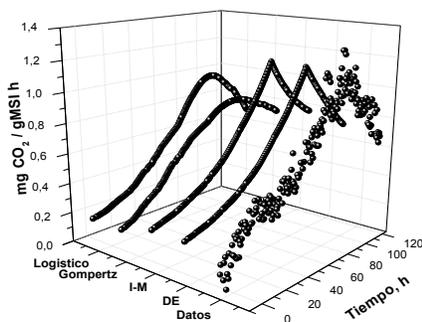
**Cepa 88**

**Cepa 885.2**

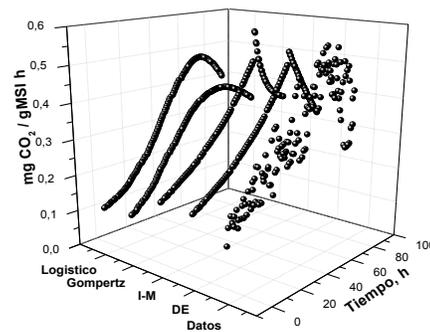
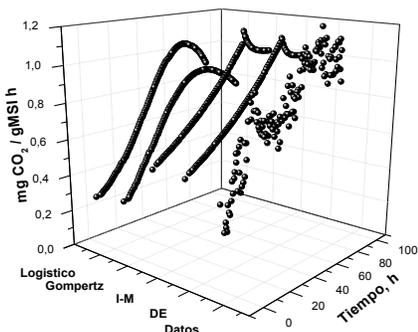
**GNS**

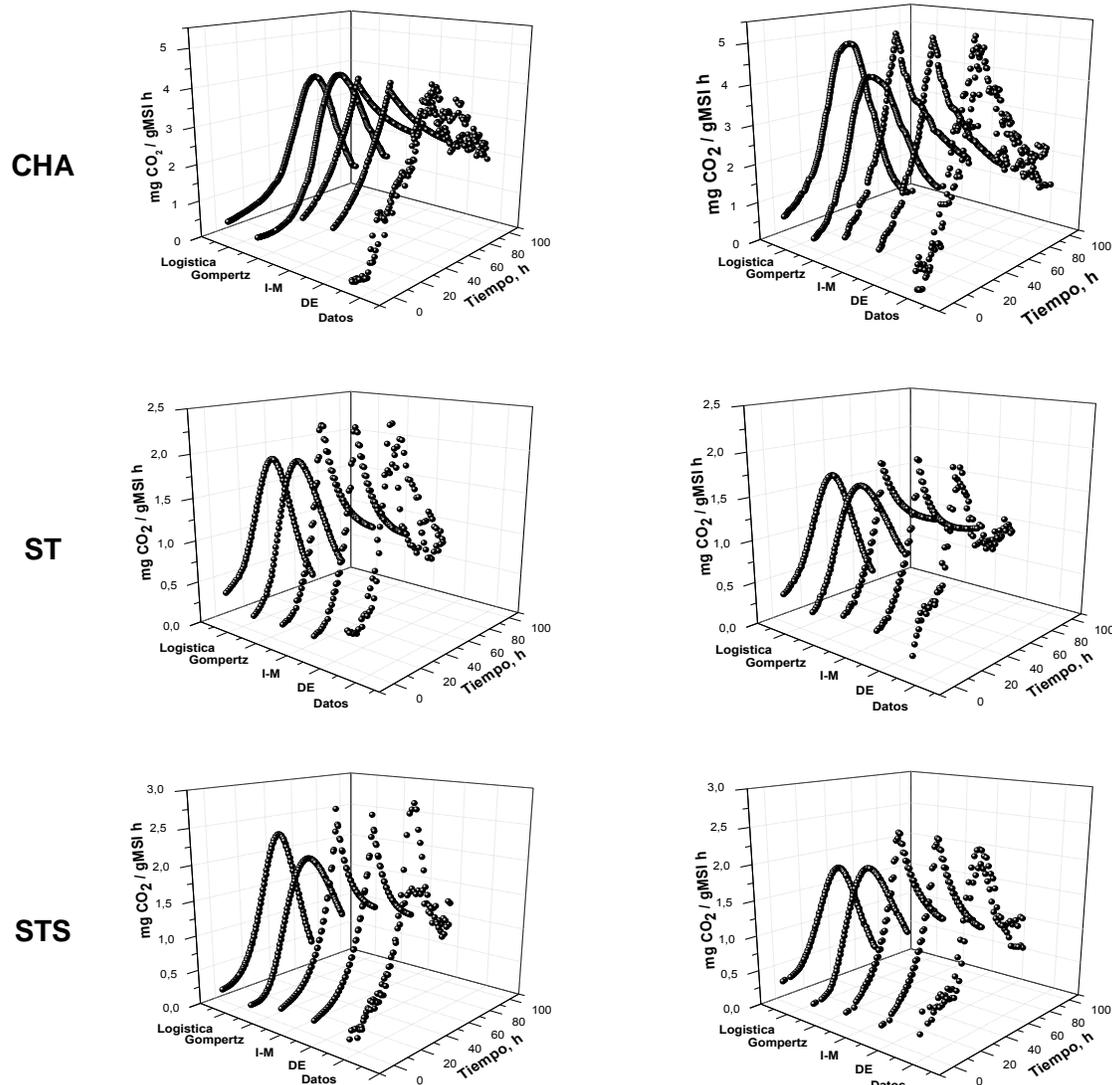


**QCS**



**QGNS**





**Figura 6.1** Ajuste a los modelos de crecimiento en cultivo en medio sólido de los datos de producción de CO<sub>2</sub> en los medios **GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS**.

La tabla que resume los parámetros obtenidos por medio de los ajustes a los cuatro modelos de crecimiento evaluados se presenta en el anexo J. A continuación, en la Tabla 6.1 se presenta el resumen de las tasas específicas de crecimiento y desaceleración de las cepas en los distintos medios de cultivo evaluados.

No se realizó análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros obtenidos para cada cepa, ya que para cada medio y cepa se utilizaron los datos de las dos curvas para realizar el ajuste a cada modelo.

**Tabla 6.1** Tasas específicas según el ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, I-M y DE en CMS sobre los medios **GNS, QCS, QGNS, CHA, ST** y **STS**

		Cepa silvestre (88)				Cepa mutante (885.2)			
		Logística	Gompertz	I-M	DE	Logística	Gompertz	I-M	DE
<b>GNS</b>	$\mu$	0.07	0.04	0.09	0.1	0.04	0.02	0.05	0.06
	$k, b$			0.17	0.14			0.06	0.03
<b>QCS</b>	$\mu$	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01
	$k, b$			0.02	0.09			NA	NA
<b>QGNS</b>	$\mu$	0.05	0.03	0.02	0.02	0.06	0.03	0.03	0.03
	$k, b$			0.004	0.02			0.03	0.06
<b>CHA</b>	$\mu$	0.09	0.05	0.06	0.05	0.1	0.06	0.08	0.08
	$k, b$			0.01	0.03			0.01	0.04
<b>ST</b>	$\mu$	0.14	0.08	0.11	0.12	0.13	0.07	0.16	0.17
	$k, b$			0.04	0.17			0.08	0.09
<b>STS</b>	$\mu$	0.2	0.08	0.12	0.11	0.12	0.07	0.11	0.11
	$k, b$			0.07	0.13			0.11	0.16

$\mu$ = Tasa específica de crecimiento basada en la concentración de biomasa activa ( $h^{-1}$ );  $k$ ,  $b$ = Tasa específica de decaimiento (desaceleración) de los modelos I-M y DE ( $h^{-1}$ ), respectivamente. NA: No alcanzado.

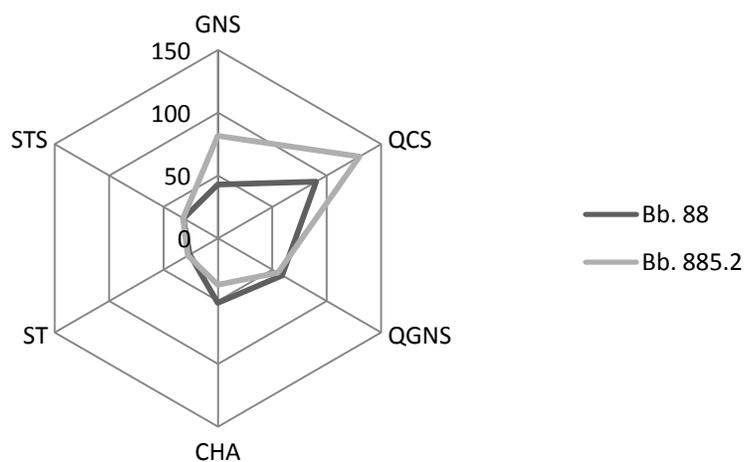
Los valores de  $\mu$  obtenidos son menores que los presentados en la sección anterior para los medios **GN, QC, QGN** evaluados en matraz, debido a la diferencias en el sistema, la técnica de evaluación del crecimiento, el medio de cultivo, principalmente.

Aunque los modelos Logístico y Gompertz ajustaron bien los datos integrados de  $CO_2$ , la forma derivada de la ecuación no predijo la biomasa activa después que la fuente de carbono se consumió. Los modelos de dos fases sí toman en cuenta esta parte de la curva de respiración, y las diferencias entre las cepas son sobresalientes. Las causas de la desaceleración del crecimiento no son explicadas en este estudio, sin embargo la integración de este modelo a estudios de CMS más completos pudiera contribuir al entendimiento de lo que está sucediendo en la etapa después de  $t_a$ , en términos de respuesta al estrés ocasionado por la falta de nutrientes, acumulación de biomasa, disminución de la respiración, o la presencia de rutas alternativas para contrarrestar dichos efectos, entre otros. En cuanto a la diferenciación celular, posiblemente, la célula se encontraría en la etapa A3 y A4 del crecimiento hifal que corresponden a la zona inactiva y la de autólisis, respectivamente, según el modelo de crecimiento hifal reportado por Paul y Thomas (1996),

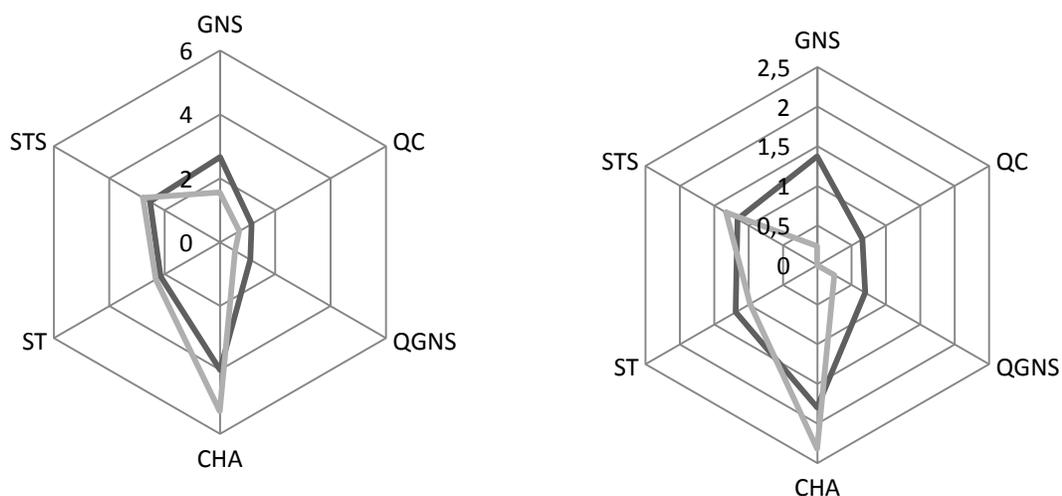
presentado anteriormente en la Figura 2.5 del capítulo de antecedentes bibliográficos, por lo que se disminuye la tasa respiratoria, aún cuando la biomasa total sea constante, es decir, la biomasa activa disminuye.

Los diagramas de redes de los parámetros obtenidos mediante este modelo desarrollado para los seis medios de cultivo evaluados en las dos cepas (Figura 6.2) permite presentar los datos de la Tabla del anexo J de una manera gráfica, y encontrar diferencias entre las cepas y entre los medios de cultivo.

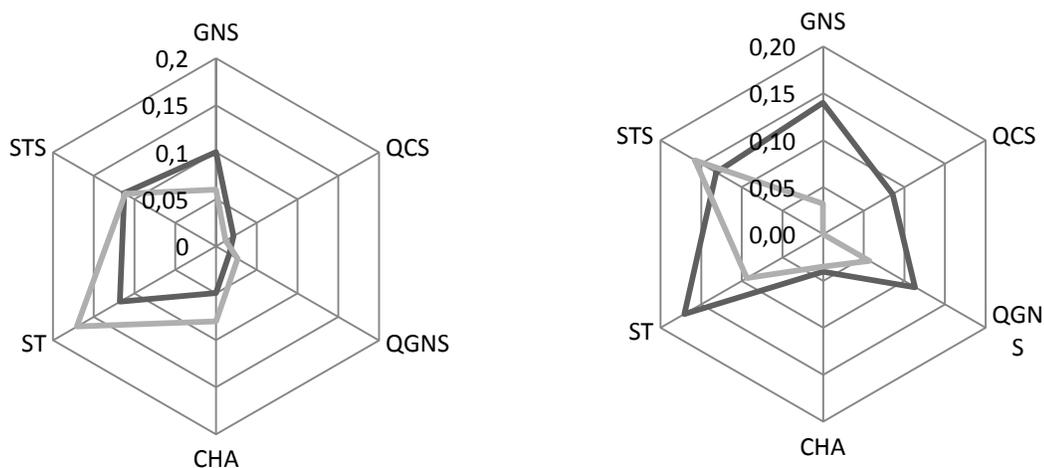
En los medios que contienen glucosa (**GNS** y **QGNS**), se encuentran las principales diferencias entre las cepas, confirmando lo visto anteriormente, en cuanto a la dificultad de consumo de la glucosa que presenta la cepa mutante en el inicio del cultivo, y el de metabolizar fuentes de N no complejas, especialmente evidenciado en el medio **QCS** en el parámetros  $t_a$ . Sin embargo, es precisamente en los parámetros  $k$  y  $rX_e$  donde las diferencias son mayores, estas variables de los modelos están evaluando lo ocurrido después de  $t_a$ . Por otra parte, las principales diferencias ofrecidas por la presencia de las sales según la evaluación de los medios **ST** y **STS**, fue en las tasas de crecimiento y de desaceleración. Lo anterior confirma la necesidad de un estudio más amplio de este tipo de microorganismos, por medio de modelos de evaluación que contemplen todas las etapas del cultivo, y que pudieran estar influyendo en procesos de esporulación y de producción de metabolitos secundarios.



**Figura 6.2a** Diagrama de redes del parámetro  $t_a$  (h) obtenido mediante el ajuste con el modelo DE en los medios **GNS**, **QCS**, **QGNS**, **CHA**, **ST** y **STS** en cultivo en medio sólido



**Figura 6.2b** Diagrama de redes de los parámetros  $rX_a$  ( $g\ l^{-1}$ ) (izquierda) y  $rX_e$  ( $g\ l^{-1}$ ) (derecha) obtenidos mediante el ajuste con el modelo DE en los medios **GNS**, **QCS**, **QGNS**, **CHA**, **ST** y **STS** en cultivo en medio sólido



**Figura 6.2c** Diagrama de redes de los parámetros  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) (izquierda) y  $b$  ( $h^{-1}$ ) (derecha) obtenidos mediante el ajuste con el modelo DE en los medios **GNS**, **QCS**, **QGNS**, **CHA**, **ST** y **STS** en cultivo en medio sólido

Como se puede observar en la Figura 6.1, los modelos I-M y DE representan mejor los datos experimentales en todos los casos, lo cual fue comprobado por el grado de ajuste presentado en la Tabla 6.2. Se muestra el grado de ajuste evaluado por ji cuadrada ( $\chi^2$ ), coeficiente de regresión ( $R^2$ ) y suma de los cuadrados del error.

Los valores de  $\chi^2$  fueron semejantes entre los modelos I-M y doble exponencial, y a su vez, mucho menores (hasta 20 veces) que los otros dos modelos, tendencia que se repitió al analizar los datos por medio de los valores de la suma de los cuadrados del error, mientras que los valores de  $R^2$  obtenidos, no presentaron tendencia definida alguna. Entre los modelos evaluados, que tienen ecuaciones que representan las dos fases, el modelo más simple fue el doble exponencial. Por lo que se recomienda para seguir las cinéticas respiratorias de este tipo de cultivos. Queda por entenderse lo que ocurre en las células durante la transición abrupta donde disminuyen en forma exponencial su tasa respiratoria después de un valor crítico  $rX_a$  (Tasa de producción de  $CO_2$  en el tiempo  $t_a$ ).

**Tabla 6.2** Grado de ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, I-M y DE en los medios **GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS** en cultivo en medio sólido

		Cepa silvestre (88)				Cepa mutante (885.2)			
		Logístico	Gompertz	I-M	DE	Logístico	Gompertz	I-M	DE
<b>G N S</b>	$\chi^2$	60.5	42.5	9.6	11.1	34.8	43.7	32.8	35.4
	$R^2$	0.7	0.87	0.8	0.85	0.74	0.79	0.7	0.7
	$\Sigma$ error	52.4	22.5	13.3	12.8	29.7	1.1	18.1	18.03
<b>Q C S</b>	$\chi^2$	4.8	5.85	3.15	3.6	6.4	4.3	1.86	1.86
	$R^2$	0.95	0.93	0.9	0.9	0.82	0.88	0.86	0.86
	$\Sigma$ error	2.01	3.7	1.3	1.77	2.03	1.42	0.6	0.6
<b>Q G N S</b>	$\chi^2$	10.4	5.92	2.2	2.2	2.62	1.9	1.03	1.05
	$R^2$	0.88	0.85	0.8	0.8	0.89	0.87	0.83	0.82
	$\Sigma$ error	4.55	3.72	1.5	1.5	0.64	0.61	0.36	0.36
<b>C H A</b>	$\chi^2$	133.5	95.48	16.2	16.1	174.5	64	8.7	8.54
	$R^2$	0.81	0.91	0.9	0.88	0.81	0.91	0.9	0.9
	$\Sigma$ error	163.11	82.74	37.3	37.2	168.44	96.21	18.4	17.70
<b>S T</b>	$\chi^2$	20.7	8.09	1.8	1.5	17.80	5.59	3.65	4.15
	$R^2$	0.77	0.86	0.9	0.9	0.73	0.85	0.88	0.88
	$\Sigma$ error	15.6	8.16	1.65	1.3	11.8	5.41	3.7	3.6
<b>S T S</b>	$\chi^2$	8.22	9.65	3.04	2.7	10.3	11.23	2.4	2.4
	$R^2$	0.92	0.92	0.9	0.9	0.91	0.92	0.9	0.9
	$\Sigma$ error	8.89	7.51	2.45	2.5	4.05	4.03	4.06	4.03

### 6.3 Producción de enzimas hidrolíticas

Después de realizar el análisis de respirometría de los cultivos de las dos cepas en los diferentes medios, se tomaron las muestras para el análisis enzimático. Los cultivos fueron detenidos después de establecerse la fase estacionaria, de acuerdo al seguimiento de la producción de CO<sub>2</sub>, lo cual dependió principalmente de la naturaleza del sustrato evaluado. Las comparaciones dentro de las cepas se tomaron en cuenta con precaución y solo se hicieron pruebas de *t* de Student entre las cepas para cada medio, debido a que las mediciones de las actividades enzimáticas corresponden a tiempos diferentes dentro del experimento (Tabla 6.3).

La producción de las hexosaminidasas fue mayor en todos los medios en la cepa 88 que en la 885.2, con diferencias que van entre 2 a 19.7 veces, aunque estadísticamente no hubo diferencias en el medio **ST**. Confirmando lo observado hacia el final del cultivo en el sistema de medio sólido en matraces en los medios **GN** y **QGN**, respecto a los medios **GNS** y **QGNS**, donde se usaron diferentes sales de nitrógeno.

Al hacer las comparaciones entre los medios de cultivo dentro de la cepa 885.2, fue mayor la producción en el medio **CHA** que en los otros medios, mientras que en la cepa 88 la producción en los medios **QCS**, **QGNS** y **CHA** fue mayor que en los otros medios de cultivo. La producción de hexosaminidasas en los medios **ST** y **STS** fue muy pobre en las dos cepas, por lo que el buen crecimiento pudo haber estado respaldado por la producción de proteasas. Además, las sales utilizadas en la formulación del medio de cultivo, tendrían importancia en este sistema evaluado, ya que en el medio **STS** fue 6.3 y 6.7 veces mayor en la cepa 88 y 885.2 respectivamente que la producción en el medio **ST**.

En cuanto a la comparación en la producción de proteasas, las diferencias entre las cepas se observaron en los medios **GNS**, **QCS** y **ST**, medios en los cuales la cepa 885.2 presentó las mayores dificultades para su crecimiento. Para la cepa 885.2, las mayores inducciones se presentaron en los medios **CHA** y **STS**, por lo que se vio la necesidad de las sales del medio mínimo y de sustratos complejos como fuente de nitrógeno para su inducción para esta cepa pero no así para la cepa 88, ya que presentó la mayor producción en el medio **STS** que en los otros medios.

En cuanto a la comparación de la producción de las enzimas en los dos sistemas de cultivo, es complicado, no solo debido a las variables que están jugando un papel importante en cada uno como son la aireación, la actividad de agua y el tipo de soporte (molido y cortado), sino también por la fuente de nitrógeno, ya que en los matraces se usó la formulación con nitrato de sodio y en las columnas con sulfato de amonio, lo cual redundó en cambios de pH, que a su vez modifica la actividad enzimática.

Sin embargo en los medios que contenían quitina coloidal como única fuente de C y N; se observó favorecida la producción de hexosaminidasas en **QCS** (columnas) en las dos cepas, respecto a **QC** (matraces).

**Tabla 6.3** Concentración de proteína, producción de proteasas y hexosaminidasas sobre los medios **GN, QC, QGN, CHA, ST** y **STS** en cultivo en medio sólido

Medio	Proteína		Hexosaminidasas		Proteasas	
	Bb.88	Bb.885.2	Bb.88	Bb.885.2	Bb.88	Bb885.2
<b>GNS</b>	1.2±0.2 <sup>abc</sup> ϕ	0.5±0.2 <sup>AB</sup>	6.3±1.3 <sup>ab</sup>	0.6±0.2 <sup>A</sup>	543±42 <sup>abcd</sup> ϕ	132±54 <sup>AB</sup>
<b>QCS</b>	1.8±0.5 <sup>c</sup> ϕ	0.8±0.1 <sup>ABC</sup>	11.8±3.6 <sup>b</sup> ϕ	0.6±0.3 <sup>A</sup>	626±214 <sup>abcd</sup> ϕ	135±15 <sup>AB</sup>
<b>QGNS</b>	1±0.2 <sup>abc</sup> ϕ	0.3±0.05 <sup>A</sup>	12±0.6 <sup>b</sup> ϕ	0.77±0.07 <sup>A</sup>	533±108 <sup>abcd</sup>	207±24 <sup>ABC</sup>
<b>CHA</b>	3.6±0.1 <sup>d</sup>	3.4±0.8 <sup>D</sup>	12.8±1.2 <sup>b</sup> ϕ	6.2±0.7 <sup>AB</sup>	764.5±19 <sup>cd</sup>	698±89 <sup>BCD</sup>
<b>ST</b>	0.7±0.2 <sup>ab</sup>	0.4±0.13 <sup>AB</sup>	0.6±0.3 <sup>a</sup>	0.23±0.03 <sup>A</sup>	331±57 <sup>abc</sup> ϕ	78±42 <sup>A</sup>
<b>STS</b>	1.1±0.3 <sup>abc</sup>	1.3±0.1 <sup>BC</sup>	3.8±0.3 <sup>a</sup> ϕ	1.6±0.5 <sup>A</sup>	1242±404 <sup>e</sup>	908±97 <sup>DE</sup>

**Proteína** (mg g<sup>-1</sup> MS), **Hexosaminidasas** (UI g<sup>-1</sup> MS), **Proteasas** (UA g<sup>-1</sup> MS). Las diferencias dentro de las cepas se evaluaron por medio de ANOVA y se representan por letras, (cepa 88 en minúscula y cepa 885.2 en mayúscula), el símbolo (ϕ) representa diferencias entre las cepas en cada medio evaluadas por medio de *t* de Student.

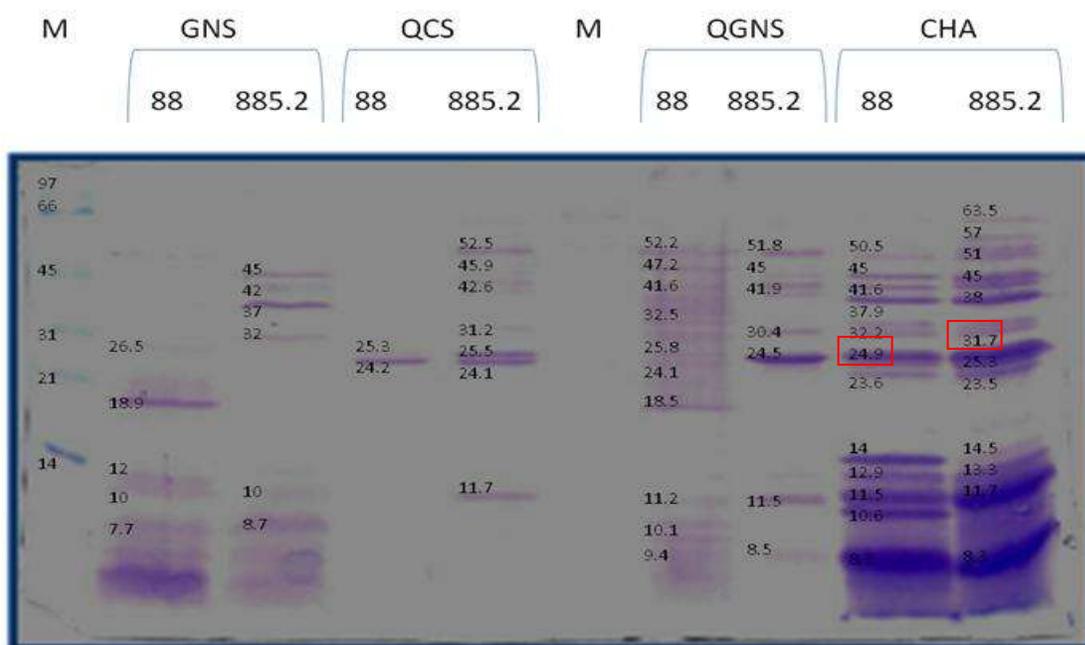
Se sabe que el pH básico puede inducir la producción de este tipo de enzimas, aún en ausencia de sustratos inductores (Dias y col., 2008). En la tabla VI del anexo C, se presenta los valores de pH promedio de los medios de cultivo para las dos cepas. Al comparar las actividades proteolíticas y valores de pH de los medios **ST** y **STS**, se observó una disminución de las proteasas en el medio de 11 veces en la cepa mutante en el medio **ST** respecto al medio **STS**, donde el pH al final del cultivo fue de 4.4, con una diferencia entre los medios de 1.7 unidades de pH. El efecto de la presencia de las sales en el medio de

cultivo presentó implicaciones en todo el cultivo, como la disminución en las enzimas proteolíticas, y menores valores de los parámetros  $b$  y  $rXe$  en **ST**.

Es de notar la concentración de proteasas en la cepa silvestre, en los medios **GN**, **QCS**, **QGNS** similar a la de **CHA**. Bye y col. (2008) reportaron que en los medios líquidos que contenían quitina cruda con KOH, encontraron la misma inducción de proteasas que en el medio con cutícula en cepas de *Lecanicillium* sp. El proceso de agregar KOH a la quitina es para retirar la proteína que está asociada a ésta, proveniente de la estructura de la cutícula de camarón y se libera también NAG, que actuaría como inductor de la actividad Pr1 (Geremia y col., 1993).

#### 6.4 Caracterización de las proteínas

En la Figura 6.3 se muestra la electroforesis monodimensional realizada a los extractos extracelulares enzimáticos obtenidos de los CMS a 56 h de cultivo, sobre los medios **GNS**, **QCS**, **QGNS** y **CHA** (se realizaron electroforesis confirmatorias, bajo las mismas condiciones). La concentración del gel de acrilamida fue del 13%, y se señalan los pesos moleculares de las proteínas de cada carril.



**Figura 6.3** Electroforesis monodimensional de las proteínas obtenidas de CMS en los medios **GNS**, **QCS**, **QGNS** y **CHA**.

Se observó diferencias en el patrón de proteínas de acuerdo al medio de cultivo y entre las cepas, sin embargo las diferencias entre los medios **QCS** y **QGNS** fueron menores en la cepa mutante. Se encontró un mayor número de bandas en los carriles del medio **CHA** en las dos cepas que en los carriles de los otros medios. En la cepa mutante se observó un menor número de bandas en el carril del medio **GNS** y en la cepa silvestre en el medio **QCS**. Además, algunas proteínas de PM similares a los reportados previamente en la literatura: 27, 30 y 32 y 38 KDa para las proteasas y 30, 33, 45, 50, 64 y 66 KDa para las quitinasas.

Posteriormente se realizó la identificación por secuenciamiento de las proteínas presentes en el carril de la electroforesis del medio **CHA**, los resultados se muestran en la Tabla 6.4. Usando la base de datos de The National Center for Biotechnology Information (NCBI) y la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se evidenció la presencia de 3 proteasas ya descritas para *Cordyceps bassiana*, el cual corresponde taxonómicamente a *Beauveria bassiana*, y una proteína tirosina fosfatasa, ya descrita en *M. anisopliae*, pero no en *Beauveria bassiana* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El análisis de la región N-terminal de las secuencias de proteínas encontradas sugirió la existencia de péptidos señal en todas las secuencias (Bendtsen y col., 2004; [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)). El valor de “score” se refiere a la fiabilidad de la técnica utilizada, el cual fue mayor a 20 en todos los casos.

**Tabla 6.4** Proteínas encontradas en el extracto extracelular del cultivo en medio sólido del medio **CHA**

Número de identificación	Enzima	Organismo	Cepa	Score	Conteo espectral	Número de Péptidos
<b>ABM91764.1</b>	Proteinasa degradadora de cutícula	<i>Cordyceps bassiana</i>	88	0	0	0
			885.2	70.18	2	2
<b>AAN41259.1</b>	Quitinasa	<i>Cordyceps bassiana</i>	88	149.01	5	4
			885.2	170.89	4	4
<b>AAK70804.1</b>	Proteinasa degradadora de cutícula CDEP-1	<i>Beauveria bassiana</i>	88	0	0	0
			885.2	31.82	1	1
<b>2108296<sup>a</sup></b>	Proteasa degradadora de cutícula	<i>Beauveria bassiana</i>	88	37.94	1	1
			885.2	37.28	1	1
<b>ABC01064.1</b>	Proteína tirosina fosfatasa	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	88	29.67	1	1
			885.2	0	0	0

Las proteínas obtenidas en los extractos fueron identificadas como: proteinasas degradadoras de cutícula, CDEP1, y CDEP2 de *Cordyceps bassiana*. Las dos son endoproteasas subtilisina-serina que pertenecen a la familia peptidasa S8. Según las bases de datos analizadas, CDEP1 posee un peso molecular de 38.6 KDa, y un pI de 8.3, la secuencia de aminoácidos del gen muestra 57.9% y 83.3% de identidad con la Pr1 de *Metarhizium anisopliae* y la Pr1 de *Beauveria bassiana*, respectivamente. La proteína CDEP2 posee un PM de 38.86 KDa, y tiene un 50% de identidad con la Pr1A de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Swissprot, 2009). La endoproteasa subtilisina-serina (Pr1) extracelular de *B. bassiana*, es sintetizada como un gran precursor (PM 37.47 KDa) y la proteína madura tiene un PM de 26.8 KDa. Joshi y col. (1995) reportaron que la Pr1 es un determinante clave de la virulencia de los HE, y se cree está regulada durante la formación del apesorio y durante la conidiogénesis (Small y Bidochka, 2005).

Una quitinasa (EC 3.2.1.14), codificada por el gen *chit1*, también se indujo bajo estas condiciones de cultivo. Esta enzima ya fue descrita en *Cordyceps bassiana*, posee un peso molecular de 36.7 KDa. Pertenece a la familia 8 glicosil hidrolasa, y su función molecular es hidrolizar compuestos O-glicosil y N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida al azar de uniones 1,4- $\beta$  en quitina y quitodextrinas (Fang y col., 2005).

Otra de las proteínas secuenciadas resultó ser 100% similar a una tirosina fosfatasa (PTPasa) (EC 3.40.720.10) de *M. anisopliae* var. *acidum*. Según las bases de datos consultadas, presenta un PM de 71.7 KDa, y el valor de pH óptimo es de 5.5. Posee actividad de fosfatasa y está involucrada en la hidrólisis de ésteres de fosfato. Esta PTPasa podría funcionar en la utilización de las fosfoproteínas presentes en la materia orgánica en descomposición durante la etapa saprobia; si es secretada dentro del hospedero, también podría desempeñar un papel en la patogénesis por desfosforilación de las fosfoproteínas del hospedero (Li y col., 2006).

## 6.5 Resumen de resultados

En resumen, el estudio de las cinéticas de producción de CO<sub>2</sub> mostró patrones similares en las dos cepas de *B. bassiana* en todos los medios estudiados y comparados en función de cuatro parámetros fisiológicos:

- i. La tasa específica de crecimiento exponencial ( $\mu$ )

- ii. La tasa respiratoria crítica que marca el final de la fase de crecimiento exponencial ( $rX_a$ ).
- iii. La tasa específica de decaimiento de la actividad respiratoria ( $b$ )
- iv. La tasa de biomasa activa en la asíntota o tasa residual de la respiración ( $rX_e$ )

Lo anterior, permitió sugerir el modelo doble exponencial para el ajuste de la producción de  $\text{CO}_2$  de este hongo en CMS, evaluado en seis medios de cultivo y para las dos cepas. Con el modelo propuesto se encontraron  $\chi^2$  menores, comparadas con las obtenidas con otros modelos estudiados, como Gompertz y Logístico, modelos ampliamente usados pero que tienen limitaciones hacia el final de la producción de la biomasa en la fase estacionaria, cuando se presenta la muerte celular, al considerar que la curva de crecimiento vuelve a cero después de la fase de desaceleración. Además que el modelo doble exponencial ajusta a los datos con igual precisión que el modelo de I-M (2000) y permite una interpretación fisiológica de los parámetros involucrados, mientras que en I-M queda el parámetro  $L$  sin asignación precisa.

Las tasas respiratorias ( $rX_a$ ) mayores que presentó la cepa mutante en los medios con sustratos complejos como **CHA**, **ST** y **STS**, permite suponer una alteración en la ruta de la utilización de las fuentes de N inorgánico, además de confirmarse la alteración en la ruta de la incorporación de la glucosa, que ya se estableció en la sección de cultivo en matraz.

La explicación de estas dos fases podría estar relacionada con varios factores como son: la presencia de niveles críticos de acumulación de ROS (reactive oxygen species) en términos de respuesta al estrés ocasionado por la falta de nutrientes, acumulación de biomasa, autólisis de la biomasa, diferenciación celular hacia el inicio del metabolismo secundario y la esporulación, entre otros. Sin embargo la integración de este modelo a estudios de CMS más completos pudiera contribuir al entendimiento de lo que está sucediendo en la etapa después de  $t_a$ , en el que se alcanza el valor  $rX_a$ . Los cuales son parámetros de gran utilidad para el ajuste de los procesos industriales de aireación y de enfriamiento de reactores para la producción de cultivos de hongos filamentosos.

Se confirmó la disminución de la enzima hexosaminidasa excretada al medio de cultivo en condiciones de CMS en la cepa mutante, respecto a la cepa silvestre, en todos los medios evaluados.

Por otra parte, hasta donde sabemos éste es el primer informe de la presencia de una tirosina fosfatasa en *Beauveria bassiana*, la cual podría tener un papel durante la etapa saprobia o durante el proceso de infección, así como la presencia de las enzimas CDEP1, CDEP2, Pr1 y Chit1 expresadas en CMS sobre un medio con cutícula triturada de *Sphenarium purpurascens* como sustrato inductor.

Una vez caracterizadas las dos cepas en cuanto al crecimiento y la expresión diferencial de las enzimas hidrolíticas en CMS, se pasó a observar el efecto de los medios de cultivo utilizados en factores de virulencia de los HE como son: La germinación, la hidrofobicidad, la morfometría de crecimiento y la esporulación.

## **PARTE II, RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **FISIOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO EN CAJAS DE PETRI**

## 7 FISIOLÓGÍA Y MORFOMETRÍA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO EN CAJAS DE PETRI.

Se realizó una comparación de los fenotipos presentados por las dos cepas en cultivo en cajas de Petri, además de la evaluación del parámetro hidrofobicidad de las esporas crecidas en medio **ADS**, el cual es importante en el proceso de infección por parte de este HE.

### 7.1 Medios de cultivo

Las cajas de Petri contenían los medios que se presentan en la Tabla 7.1, donde se muestran las abreviaturas utilizadas a lo largo de los siguientes capítulos.

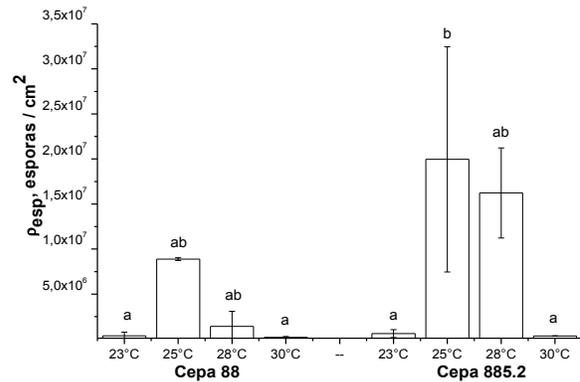
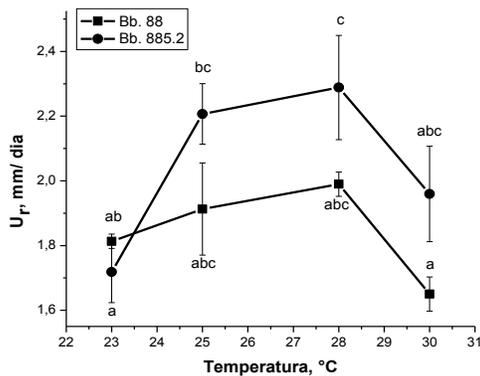
**Tabla 7.1** Abreviaturas de los medios de cultivo usados en cultivo en caja de Petri

<b>ADS</b>	Agar dextrosa Sabouraud
<b>GNS</b>	Glucosa y sulfato de amonio
<b>QCS</b>	Quitina coloidal
<b>QGNS</b>	Quitina con glucosa y nitrato
<b>CHA</b>	Cutícula de chapulín
<b>ST</b>	Salvado de trigo sin sales
<b>STS</b>	Salvado de trigo con sales

### 7.2 Crecimiento y esporulación en función de la temperatura

Las dos cepas conservaron un perfil muy similar en respuesta a las diferentes temperaturas durante los 5 días del cultivo. La mejor temperatura de crecimiento fue 28°C, sin embargo, no hubo diferencia estadística entre el crecimiento obtenido a la temperatura de 25°C y de 28°C para los dos cepas, la cepa mutante se afectó más a 23°C que la cepa silvestre. La mayor producción de esporas fue a 25°C, para las dos cepas, sin diferencia para la cepa mutante en las temperaturas de 25 y 28°C, según se muestra en las Figuras 7.1 y 7.2.

Se utilizó la temperatura de 28°C para todos los experimentos comparativos entre las cepas por ser la mejor temperatura de crecimiento y así excluir la temperatura como variable adicional de diferencias encontradas en las pruebas realizadas en las diferentes secciones de la tesis.



**Figura 7.1** Velocidad de crecimiento radial ( $U_r$ ) a distintas temperaturas en medio **ADS** **Figura 7.2** Densidad de esporulación ( $\rho_{esp}$ ) a distintas temperaturas en medio **ADS**

*Beauveria bassiana* tiene un amplio intervalo de temperatura de crecimiento (8 a 35°C), con una frontera térmica máxima de 37°C según lo indicado por Fargues y Luz (2000). El estudio de la temperatura óptima es práctico en el uso de cepas apropiados en ciertas ubicaciones geográficas con variada temperatura, además que es uno de los principales factores limitantes del uso de HE en sistemas agrícolas con alta radiación solar. Fernandes y col. (2008) encontraron que las cepas mas termotolerantes fueron cepas provenientes de lugares tropicales. La tolerancia a altas temperaturas permite evadir también la respuesta inmune de algunos insectos, tales como los saltamontes que poseen un mecanismo de termorregulación como defensa a los patógenos (Heinrich, 1974).

### 7.3 Estimación del crecimiento sobre diferentes sustratos

El resumen de los parámetros evaluados en las cajas de Petri en los siete medios de cultivo durante 10 días se muestra en la Tabla 7.2. La velocidad de crecimiento radial ( $U_r$ ) solo presentó diferencias entre las cepas en el medio **STS**, donde se favoreció el crecimiento de la cepa 885.2 debido a la presencia de las sales. En la cepa 88, las  $U_r$  obtenidas en los medios **QCS**, **QGNS**, **ST** y **STS** fueron estadísticamente menores que las de los medios **ADS**, **GNS** y **CHA**. Mientras que en la cepa 885.2, solo fueron inferiores los medios **QCS** y **QGNS**, diferencia que no guardó relación alguna con las relaciones C: N de los medios, sino con la naturaleza de los sustratos. Los valores de  $U_r$  en los medios estuvieron entre 1.4 y 2.5 mm d<sup>-1</sup>, en el medio de **ADS** fue de 2.2 mm día<sup>-1</sup>. Varela y Morales (1996) observaron valores

de  $U_r$  entre 2.1 y 2.7  $\text{mm d}^{-1}$  y Safavi y col. (2007) encontraron valores de  $U_r$  de 2.9 hasta 4.1  $\text{mm d}^{-1}$ , en ambos casos creciendo *Beauveria bassiana* en medio **ADS**.

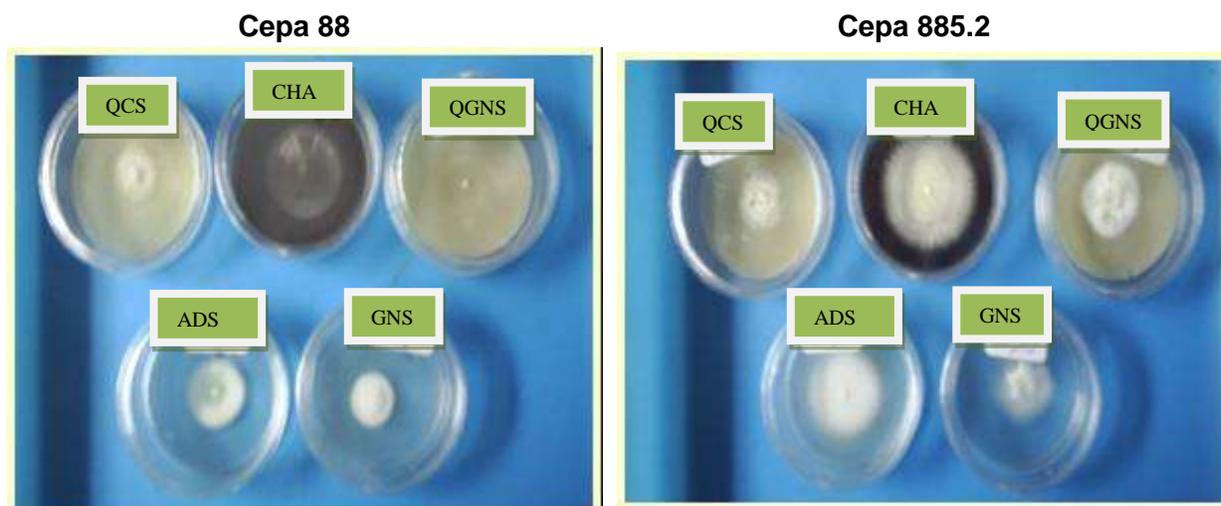
La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los medios ni entre las cepas. Metodológicamente, la tasa específica de crecimiento es un parámetro fisiológico útil para comparar los patrones de crecimiento de los hongos, ya que este valor toma en consideración la frecuencia de ramificación del micelio, a fin de estimar la biomasa de formación (Loera y Viniegra-González, 1998); por lo tanto, debe ser considerada como alternativa confiable a la velocidad de crecimiento radial, la cual es ampliamente reportada en estudios de HE (Liu y col., 2003; Ouedraogo y col., 1997).

**Tabla 7.2** Parámetros de crecimiento obtenidos en los siete medios evaluados en caja de Petri

$U_r$ , $\text{mm d}^{-1}$	<b>ADS</b>	<b>GNS</b>	<b>QCS</b>	<b>QGNS</b>	<b>CHA</b>	<b>ST</b>	<b>STS</b>
<b>88</b>	2.2±0.01 <sup>efg</sup>	2.1±0.05 <sup>defg</sup>	1.4±0.01 <sup>a</sup>	1.5±0.2 <sup>ab</sup>	2.2±0.04 <sup>fg</sup>	1.6±0.2 <sup>abc</sup>	1.9±0.2 <sup>abcde</sup>
<b>885.2</b>	2.2±0.01 <sup>efg</sup>	2±0.1 <sup>cdef</sup>	1.5±0.001 <sup>a</sup>	1.6±0.2 <sup>abcd</sup>	2.4±0.07 <sup>g</sup>	1.9±0.1 <sup>bcdef</sup>	2.2±0.05 <sup>fg</sup>
$\mu$ , $10^{-2}$ ( $\text{h}^{-1}$ )							
<b>88</b>	6.02±1 <sup>a</sup>	3.7±0.007 <sup>a</sup>	3.7±0.55 <sup>a</sup>	4.9±0.9 <sup>a</sup>	3.35±0.3 <sup>a</sup>	5.45±1.1 <sup>a</sup>	3.4±0.6 <sup>a</sup>
<b>885.2</b>	5.5±0.6 <sup>a</sup>	3.25±0.2 <sup>a</sup>	4.4±0 <sup>a</sup>	5.4±1.6 <sup>a</sup>	5.5±1.2 <sup>a</sup>	4±1.2 <sup>a</sup>	4±0.6 <sup>a</sup>
$L_{av}$ , $\mu\text{m}$							
<b>88</b>	233.5±62 <sup>abc</sup>	233±83 <sup>abc</sup>	392±123 <sup>g</sup>	331±74 <sup>def</sup>	345±67 <sup>efg</sup>	195.5±68 <sup>a</sup>	205±83 <sup>a</sup>
<b>885.2</b>	254±55 <sup>abc</sup>	200.5±38 <sup>a</sup>	296±66 <sup>cde</sup>	282±66 <sup>bcd</sup>	369±90 <sup>fg</sup>	202±60 <sup>a</sup>	251±73 <sup>abc</sup>
$D_h$ , $\mu\text{m}$							
<b>88</b>	2.4±0.5 <sup>cd</sup>	2.9±0.5 <sup>ab</sup>	2.6±0.6 <sup>cd</sup>	2.7±0.6 <sup>cde</sup>	3.2±0.6 <sup>e</sup>	1.9±0.35 <sup>ab</sup>	3±0.8 <sup>de</sup>
<b>885.2</b>	2.9±0.8 <sup>de</sup>	1.5±0.3 <sup>a</sup>	3.1±0.7 <sup>e</sup>	2.8±0.6 <sup>de</sup>	3±0.5 <sup>de</sup>	1.9±0.4 <sup>ab</sup>	2.4±0.8 <sup>bc</sup>

La longitud hifal obtenida sobre medios tales como **QCS**, **QGNS** y **CHA** fue alrededor de los 354  $\mu\text{m}$  en la cepa silvestre y de los 316  $\mu\text{m}$  para la cepa mutante, mientras que en los medios **GNS**, **ST**, **STS** y **ADS**, este valor fue 39% y 20% menor, para las cepas 88 y 885.2 respectivamente. Las diferencias en este parámetro no fueron estadísticamente significativas entre las cepas, excepto en el medio **QCS**, en donde los resultados indicaron un mayor grado de ramificación en la cepa mutante que en la silvestre. La observación microscópica del micelio de *Beauveria bassiana* mostró que los diámetros hifales en todos los medios fue

cercano a 3  $\mu\text{m}$ , con la excepción de los medios **ST** y **GNS** en la cepa mutante (1.8  $\mu\text{m}$ ). La ausencia de las sales comprometió el parámetro morfométrica del diámetro hifal, ya que fue menor en el medio **ST** que en el medio **STS**. La morfología de las colonias sobre la caja de Petri se observa en la Figura 7.3.

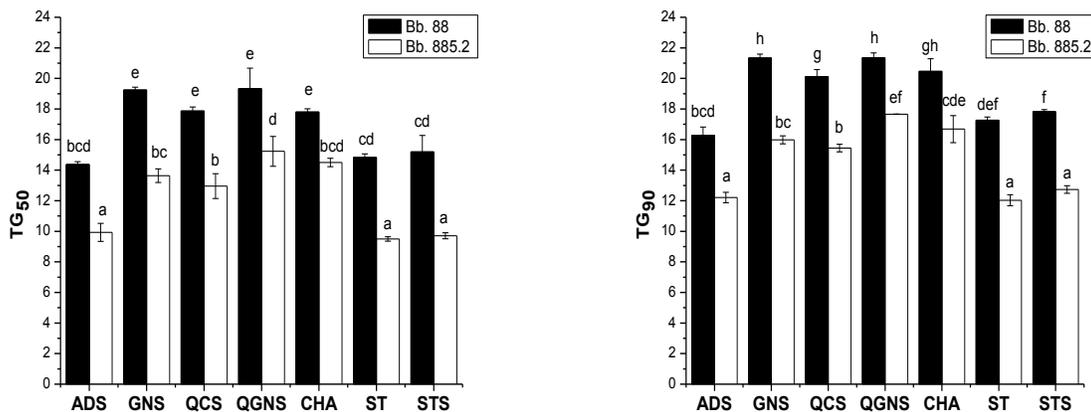


**Figura 7.3** Morfología de crecimiento en caja de Petri de *B. bassiana*

## 7.4 Características fenotípicas sobre diferentes sustratos

### 7.4.1 Cinética de germinación

En cuanto a la cinética de germinación, se observó claramente que la cepa 885.2 germinó más rápido (entre el 24 y el 58%) que la cepa 88 en todos los medios, según se observa en la Tabla 7.4 y en la Figura 7.4. El tiempo que tardó el 50% de las esporas para germinar ( $TG_{50}$ ), fue de 10 h en la cepa 885.2 en los medios **ADS**, **ST** y **STS**, y de 13 a 15 h para los medios **GNS**, **QCS**, **QGNS** y **CHA**; estos son dos grupos estadísticamente diferentes. Se observaron los mismos grupos de medios en la cepa 88, pero los valores de  $TG_{50}$  son de 14 h en el primer grupo y de 18.5 h en el segundo grupo. Además, el  $TG_{90}$  fue de 17 a 42% menor en la cepa mutante y la tendencia en las diferencias en los grupos de germinación se mantuvo al evaluar este parámetro.



**Figura 7.4** TG<sub>50</sub> (izquierda) y TG<sub>90</sub> (derecha) de las cepas en caja de Petri sobre los diferentes medios de cultivo

Respecto a los datos bibliográficos analizados, se encontró que el TG<sub>50</sub> reportado para el HE *B. bassiana* en el medio **ADS** fue entre 14 a 19 h, según Varela y Morales (1996), y estos valores fueron similares a los obtenidos para la cepa silvestre de este estudio. Talaei-Hassanolui y col. (2006) obtuvieron TG<sub>50</sub> de 10.8 h en la población más virulenta y de 21.3 h para la menos virulenta, éste probado sobre el medio **ADS** adicionado con extracto de levadura.

Es de notar que los medios con los menores valores de TG<sub>50</sub> y TG<sub>90</sub> fueron los medios **ADS**, **ST** y **STS** que tienen relaciones C: N de 15.6: 1 y 17.2: 1, mientras que los otros medios evaluados tienen relación C: N entre 4: 1 y 7: 1. Además que la peptona del medio **ADS** y los microelementos que aporta el salvado de trigo pudieran estar influyendo en la velocidad de las cepas en estos medios, según lo reportado por James (2001) e Ibrahim y col. (2002), quienes encontraron que para *B. bassiana* y *M. anisopliae*, el extracto de levadura y la peptona repercutieron positivamente en la tasa de germinación conidial.

La velocidad de germinación por ajuste a la ecuación Logística, fue de 20 a 67% mayor en la cepa mutante que en la silvestre, excepto en los medios **QCS** y **QGNS** (Tabla 7.3).

**Tabla 7.3** Resumen de los parámetros de germinación de las dos cepas evaluadas en los 7 medios de cultivo

<b>Bb.88</b>	<b>ADS</b>	<b>GNS</b>	<b>QCS</b>	<b>QGNS</b>	<b>CHA</b>	<b>ST</b>	<b>STS</b>
$\mu_g, h^{-1}$	0.6±0.1 <sup>abc</sup>	0.5±0.08 <sup>ab</sup>	0.6±0.07 <sup>abc</sup>	0.6±0.03 <sup>ab</sup>	0.6±0.1 <sup>abc</sup>	0.5±0.06 <sup>ab</sup>	0.5±0.06 <sup>ab</sup>
<b>TG<sub>50</sub></b>	14±0.2 <sup>bcd</sup>	19±0.2 <sup>e</sup>	17.9±0.3 <sup>e</sup>	19±1.3 <sup>e</sup>	18±0.2 <sup>e</sup>	15±0.2 <sup>cd</sup>	15±1 <sup>cd</sup>
<b>TG<sub>90</sub></b>	16±0.5 <sup>bcd</sup>	21±0.2 <sup>h</sup>	20±0.5 <sup>g</sup>	21±0.3 <sup>h</sup>	20.5±0.8 <sup>gh</sup>	17±0.2 <sup>def</sup>	18±0.1 <sup>f</sup>
<b>Bb. 885.2</b>							
$\mu_g, h^{-1}$	1.9±0.9 <sup>d</sup>	0.8±0.2 <sup>abc</sup>	0.5±0.1 <sup>a</sup>	0.6±0.02 <sup>abc</sup>	0.8±0.5 <sup>abc</sup>	1.4±0.45 <sup>cd</sup>	1.3±0.5 <sup>bcd</sup>
<b>TG<sub>50</sub></b>	9.9±0.6 <sup>a</sup>	13.6±0.4 <sup>bc</sup>	13±0.8 <sup>b</sup>	15±1 <sup>d</sup>	14.5±0.3 <sup>bcd</sup>	9.5±0.14 <sup>a</sup>	10±0.2 <sup>a</sup>
<b>TG<sub>90</sub></b>	12±0.3 <sup>a</sup>	16±0.3 <sup>bc</sup>	15±0.2 <sup>b</sup>	18±0 <sup>ef</sup>	17±0.9 <sup>cde</sup>	12±0.4 <sup>a</sup>	13±0.2 <sup>a</sup>

Algunas imágenes de los tubos germinales obtenidas con el microscopio óptico se muestran en la Figura 7.5 donde se pueden confirmar diferencias en la morfología del micelio entre los dos cepas, siendo rectos los de la cepa 88 y tortuoso el de la cepa 885.2, además que en las dos cepas se observó germinación bipolar en todos los medios (flechas).



**Figura 7.5** Imágenes microscópicas de la germinación de las cepas en caja de Petri en medio **ADS**

#### 7.4.2 Cinética de esporulación

Según se muestra en la Tabla 7.4 hubo diferencias significativas en la densidad de las esporas obtenidas el día 6 (140 h) en los medios **ADS** y **GNS**. En el medio **ADS**, la densidad fue 86% mayor en la cepa mutante, mientras que fue mayor en la cepa silvestre en los otros medios, en porcentajes entre 5 y 73%. Los medios donde se obtuvieron las mayores densidades de esporulación fueron **QGNS**, **CHA**, **ST** y **STS** en la cepa silvestre, y en los medios **ADS**, **QGNS**, **ST** y **STS** para la cepa mutante. La tasa específica de esporulación a 140 h, fue aproximadamente cuatro veces menor en la cepa mutante en medios con glucosa, aún cuando la diferencia en la densidad de esporulación en el medio **GNS** no fue significativa. En los medios **ST** y **STS** no se observaron diferencias estadísticamente significativas por lo que no hubo efecto de la adición de las sales.

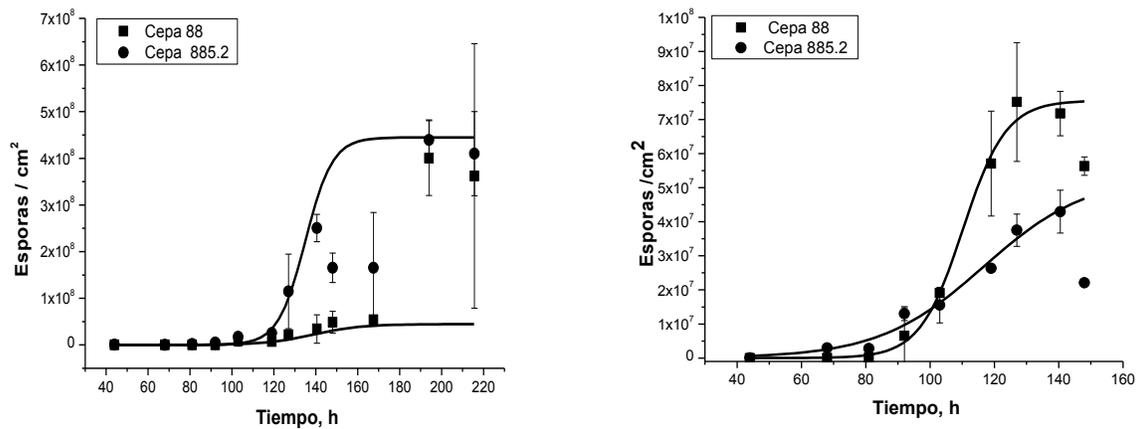
**Tabla 7.4** Parámetros de esporulación de las cepas, evaluados en caja de Petri sobre los diferentes medios de cultivo.

	Cepa	ADS	GNS	QCS	QGNS	CHA	ST	STS
$\rho_{esp}$	88	3.4±3 a	7.2±0.6 a	7.2±1.3 a	44±23 b	25±5.6 ab	22±1.3 ab	21±4.4 ab
	885.2	25±3 ab	4.4±0.6 a	2±0.4 a	19±6.01 a	6.6±4.4 a	20±4.4 a	20±2.7 ab
$\mu_{esp}$	88	0.2±0.02 c	0.2±0.08 bc	0.07±0.03 ab	0.16±0.01 abc	0.13±0.02 abc	0.08±0.008 ab	0.09±0.02 ab
	885.2	0.3±0.08 d	0.04±0.004 a	0.2±0.04 bc	0.05±0.01 a	0.16±0.001 abc	0.1±0.004 abc	0.07±0.02 ab

$\rho_{esp}$ = Densidad de esporas ,\*10<sup>7</sup> esporas cm<sup>-2</sup>;  $\mu_{esp}$ , h<sup>-1</sup>

La producción conidial en el medio **ADS** (Figura 7.6), obtenida después de 6 d de inoculación, para la cepa mutante fue casi diez veces mayor que el valor alcanzado por la cepa silvestre. En el mismo medio, Kamp y Bidochka (2002) obtuvieron una producción de 0.97 x 10<sup>7</sup> con cm<sup>-2</sup> después de 14 d de cultivo, lo cual es 3 veces y 28 veces inferior a los valores alcanzados por la cepa silvestre y mutante, respectivamente. Por otra parte, Safavi y col. (2007) obtuvieron un valor (3 x 10<sup>7</sup> con cm<sup>-2</sup>), muy similar al alcanzado por la cepa silvestre en el medio **ADS**. Sin embargo, en un medio con composición similar al medio **QCS**, las cepas utilizadas en ese estudio produjeron siete y dos veces más esporas, respectivamente, que las cepas utilizadas por Safavi y col. (2007).

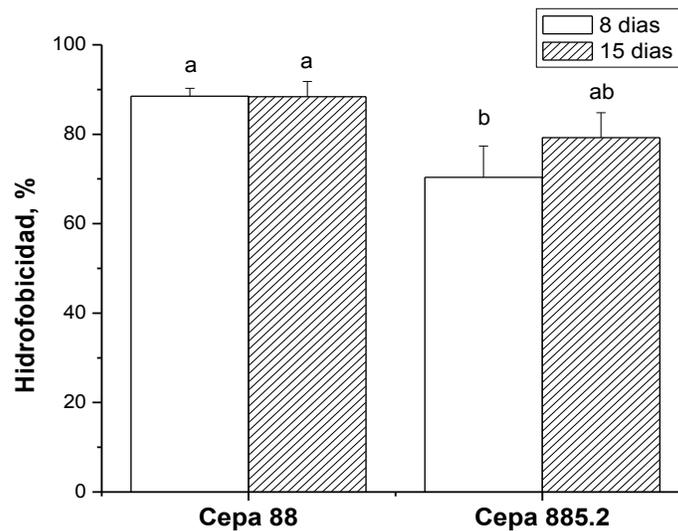
Al comparar los medios **ADS** y **GNS** se observaron diferencias en las cinéticas de esporulación para las dos cepas, el efecto pudiera ser por la naturaleza de la fuente de nitrógeno de los medios, por lo que la cepa mutante respondió mejor a la peptona y se le dificultó esporular en el medio que contenía sal de amonio. En este caso no se encontró relación directa alguna entre las densidades obtenidas en cada medio con sus relaciones C: N.



**Figura 7.6** Cinética de esporulación en caja de Petri sobre el medio **ADS** y **GNS**

### 7.5 Hidrofobicidad de las esporas cosechadas de ADS

La hidrofobicidad de las esporas de las dos cepas obtenidas en medio **ADS** varió entre 70 y 88%. A 8 d del cultivo se observaron diferencias entre las dos cepas; la hidrofobicidad fue mayor en la cepa 88, mientras que a 15 d de cultivo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 7.7).



**Figura 7.7** Hidrofobicidad de las esporas crecidas en medio **ADS**

Estos resultados fueron similares a los reportados por Montesinos (2008), quien encontró 88% de hidrofobicidad en la cepa 88 y 82% en la cepa 885.2, las esporas que se utilizaron en ese estudio provenían de un medio de agar Sabouraud con maltosa al 2% adicionado con avena 3%, y no se encontró relación entre este parámetro y la virulencia sobre *Tenebrio molitor*. Además, el porcentaje de hidrofobicidad permaneció constante en el tiempo entre 8 y 15 d, para los dos cepas, contrario a lo observado por Romano (1996), donde hubo la tendencia a la disminución de 95 a 85% en este lapso de tiempo.

## 7.6 Resumen de resultados

En resumen de los experimentos realizados en caja de Petri, no se encontró relación con las tasas específicas de crecimiento encontradas en los CMS. Por otra parte, la cepa 885.2 alteró su morfometría en comparación con la cepa silvestre, la tasa específica de crecimiento, diferencias que se magnifican en algunos medios de cultivo (como son **CHA** y **STS**).

La cepa 885.2 germinó más rápido que la cepa 88 en todos los medios. En cuanto a los menores  $TG_{50}$  obtenidos en los medios **ADS**, **ST** y **STS** respecto a los medios **GN**, **QC**, **QGN** y **CHA**; pudiera deberse a las diferentes relaciones C: N de los medios, más que a las diferencias en las naturalezas de los sustratos.

Además, La producción conidial en el medio **ADS** para la cepa mutante fue casi diez veces mayor que el valor alcanzado por la cepa silvestre, por lo que la cepa mutante responde mejor a la peptona y se le dificultó esporular en el medio que contenía sal de amonio. No se presentaron diferencias en cuanto a la hidrofobicidad de las esporas producidas en medio **ADS**.

Por último, con el fin de observar el posible efecto que las diferencias fisiológicas encontradas en CMS y cultivo en caja de Petri pudieran tener en la virulencia de las cepas sobre los insectos, se decidió realizar pruebas de efectividad biológica como bioensayos sobre el insecto modelo *Tenebrio molitor* en sus estadios larval y adulto.

## **PARTE II, RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

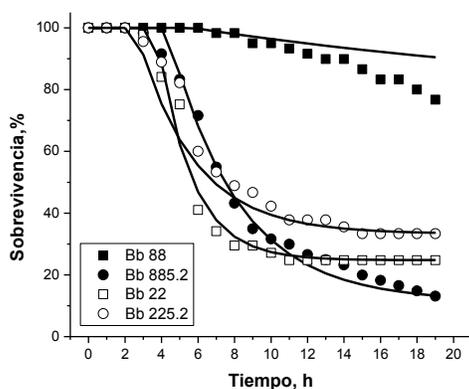
### **VIRULENCIA DE LAS CEPAS SOBRE LARVAS Y ADULTOS DE *Tenebrio molitor***

## 8 VIRULENCIA DE LAS CEPAS SOBRE LARVAS Y ADULTOS DE *Tenebrio molitor*

### 8.1 Modificación de la virulencia

Para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la virulencia de estas cepas, respecto a los resultados obtenidos por Robledo-Monterrubio y col. (2004), quienes realizaron el bioensayo de virulencia de estas mismas cepas sobre larvas de *Tenebrio molitor* al poco tiempo de haber obtenido la cepa mutante. Se hizo un bioensayo bajo las mismas condiciones reportadas por estos autores. Para este caso, las cepas evaluadas por Robledo y Monterrubio y col. (2004) son llamadas 22 y 225.2, pero correspondería a las cepas 88 y 885.2 respectivamente, empleadas en el presente trabajo.

La cepa 22 presentó dificultades para crecer y esporular, por lo que se alargaba el tiempo de obtención del inóculo. Por esta razón, hubo la necesidad de reaislarla a partir de un chapulín (*Sphenarium purpurascens*) muerto, proveniente de un lote de insectos infectados por esta cepa, de un bioensayo previo.



Cepa	22	225.2	88	885.2
$S, \%$	75	11.4	24.8	33.3
$t, d$	5.7	4.3	3.7	2.6
$k, d^{-1}$	0.04	0.3	0.5	0.3
$R^2$	0.98	1	0.9	0.9
$TS_{50}, d$	<50% M	7.2	5.7	7.5

**Figura 8.1** Variación de la virulencia de las cepas sobre las larvas de *T. molitor*. Los datos se ajustaron al modelo de virulencia propuesto en este trabajo.

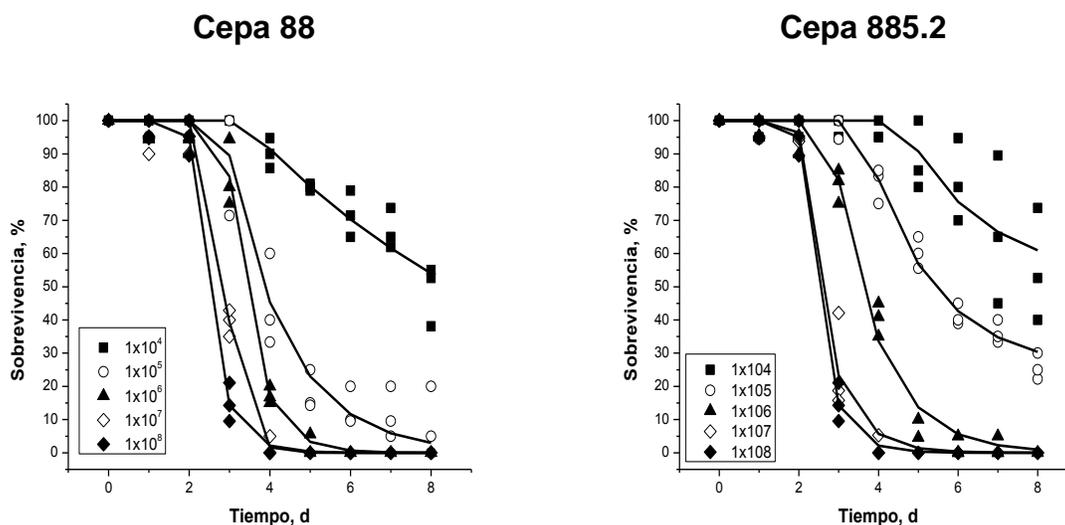
**Tabla 8.1** Parámetros de la variación de la virulencia sobre las larvas de *T. molitor* Sobrevivencia ( $S$ ); tiempo de inicio de la mortalidad ( $t_0$ ); tasa específica de muerte ( $k$ ); tiempo medio de supervivencia, ( $TS_{50}$ )

Al ser reaislada del insecto, la cepa 22 paso a llamarse cepa 88, la cual adquirió mayor virulencia, respecto a la cepa usada en la tesis de referencia, se modificaron los parámetros del porcentaje de supervivencia ( $S$ ), el tiempo de inicio de la mortalidad ( $t_0$ ), la tasa específica

de muerte ( $k$ ), y el tiempo medio de sobrevivencia ( $TS_{50}$ ), según se muestra en la Tabla 8.1 y en la Figura 8.1. Los controles (insectos sin infectar) no excedieron el 5% de la mortalidad.

## 8.2 Determinación del $CL_{50}$ y $CL_{90}$

El bioensayo sobre adultos de *T. molitor* usando cinco concentraciones de suspensiones de esporas permitió obtener la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ . No se halló diferencia estadísticamente significativa entre las dos cepas, (Tabla 8.2.a), a pesar que se observaron curvas tipo dosis-respuesta. Un resultado importante fue que en la cepa 88 la sobrevivencia inferior al 10% se logró con todas las concentraciones de esporas, excepto con  $1 \times 10^4$  esporas  $ml^{-1}$  mientras que en la cepa 885.2 no se alcanzó este porcentaje con las concentraciones de  $1 \times 10^4$  ni  $1 \times 10^5$  esporas  $ml^{-1}$  (Fig. 8.2).



**Figura 8.2** Bioensayo de virulencia de diferentes concentraciones de las suspensiones de esporas sobre los adultos de *T. molitor*  
Los datos se ajustaron con el modelo de virulencia propuesto.

En cuanto al efecto de las concentraciones en la sobrevivencia de los adultos, al evaluarse los resultados con el modelo de virulencia propuesto en el presente estudio, solo se encontraron diferencias estadísticas en el tiempo de inicio de la muerte ( $t$ ) entre las cepas, en la concentración de  $1 \times 10^4$  esporas  $ml^{-1}$ . De acuerdo al resultado mostrado en la Tabla 8.2.b se observó una mayor sensibilidad por parte de la cepa 88 cuando hubo una disminución en las concentraciones de las esporas usadas en el bioensayo, como se

evidenció por las diferencias en los parámetros  $TS_{50}$  y  $TS_{10}$  de los insectos expuestos a la concentración de  $1 \times 10^5$  esporas  $ml^{-1}$ . Los controles no excedieron el 10% de mortalidad.

**Tabla 8.2** Parámetros obtenidos en el bioensayo de virulencia de las dos cepas sobre adultos de *T. molitor* a diferentes concentraciones, determinación de CL

N° esporas $\pm$ IC, ( $\times 10^7$ )	
<b>Bb. 88</b>	CL <sub>50</sub> 1.13 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
	CL <sub>90</sub> 46.3 $\pm$ 57 <sup>b</sup>
<b>Bb. 885.2</b>	CL <sub>50</sub> 5.3 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>
	CL <sub>90</sub> 474 $\pm$ 920 <sup>b</sup>
Evaluados a tercer día de bioensayo. Intervalos de confianza o límites fiduciales del 90%	

**Tabla 8.3** Parámetros obtenidos en el bioensayo de virulencia de las dos cepas sobre adultos de *T. molitor* a diferentes concentraciones, modelo de decaimiento (b)

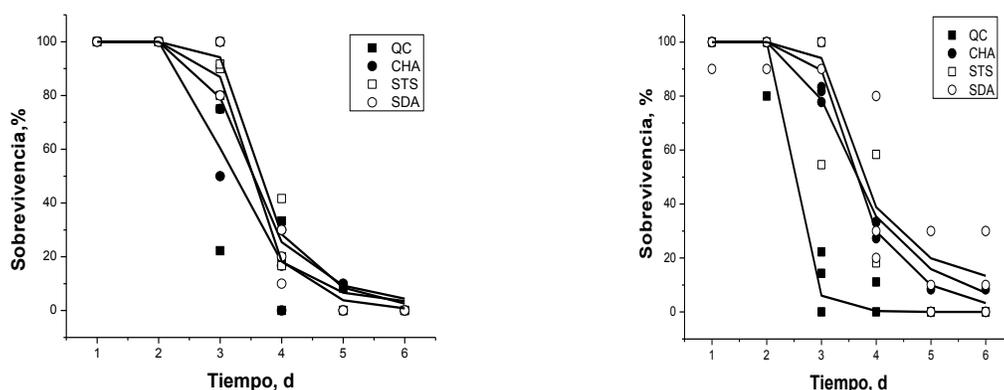
Cepa	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^8$
<b><math>TS_{50}</math>, d</b>					
88	8 $\pm$ 0.5 <sup>e</sup>	3.9 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	3.5 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>	2.8 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	2.5 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
885.2	7.7 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>	5.5 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	3.7 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	3.5 $\pm$ 0.28 <sup>bc</sup>	2.6 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
<b><math>TS_{10}</math>, d</b>					
88	< 60% M	6 $\pm$ 0 <sup>e</sup>	4.5 $\pm$ 0.15 <sup>cd</sup>	3.8 $\pm$ 0.06 <sup>abc</sup>	3.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
885.2	< 60% M	< 75% M	5 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	4.2 $\pm$ 0.6 <sup>bcd</sup>	3.6 $\pm$ 0.2 <sup>ab</sup>
<b>S, %</b>					
88	48.6 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	8.3 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
885.2	44.6 $\pm$ 17 <sup>a</sup>	22.4 $\pm$ 0 <sup>c</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
<b>k, d<sup>-1</sup></b>					
88	0.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.4 <sup>abcd</sup>	1.6 $\pm$ 0.1 <sup>abcd</sup>	2 $\pm$ 0.1 <sup>bcd</sup>	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>bcd</sup>
885.2	0.2 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>abc</sup>	2.4 $\pm$ 1.2 <sup>d</sup>	2.1 $\pm$ 0.7 <sup>cd</sup>
<b>t, d</b>					
88	3.6 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	3.1 $\pm$ 0.5 <sup>bc</sup>	2.8 $\pm$ 0.1 <sup>abc</sup>	2.5 $\pm$ 0.05 <sup>ab</sup>	2 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
885.2	5.3 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	3.5 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>	2.8 $\pm$ 0.1 <sup>abc</sup>	2.9 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	2.2 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>

### 8.3 Efecto del medio de cultivo en la virulencia

Se realizó un bioensayo de virulencia a partir de esporas obtenidas en los medios **ADS**, **QC**, **CHA** y **STS** contra larvas y adultos de *Tenebrio molitor*. La distribución de la mortalidad observada en el bioensayo sobre adultos de *Tenebrio molitor* permitió concluir que los insectos iniciaron la mortalidad (representado por el parámetro  $t$  del modelo de ajuste) alrededor del día 3 post-infección; mientras que la tasa de mortalidad fue tan alta que se

verificó sobrevivencia inferior al 10% para los insectos infectados con las dos cepas para el día 4.6 en promedio (Tabla 8.4). Mientras que en las larvas, el parámetro  $t$  fue de 4, y no se alcanzó el 90% de la mortalidad para ninguna de las dos cepas, lo cual se asoció a una disminución (50%) en la tasa de la mortalidad específica respecto a lo observado en los bioensayos contra los adultos en el medio **ADS** (Tabla 8.4). Para las esporas cosechadas de los medios de cultivo **QC**, **CHA** y **STS**, la mortalidad de las larvas fue inferior al 40% después de 11 días de análisis; el 50% de la mortalidad sólo fue alcanzado después de 6 días con las esporas obtenidas en el medio **ADS**. En el caso de los ensayos con adultos, el 50% de la mortalidad se obtuvo en menos de 3 días. Este análisis preliminar indicó una vulnerabilidad mucho mayor de los adultos en comparación con la etapa larval. Un análisis más refinado se hizo utilizando el modelo antes indicado. El valor asintótico de supervivencia ( $S$ ) fue cercano a cero en todos los casos de la prueba sobre adultos (100% de mortalidad final) y fue mucho mayor para las larvas (mortalidad inferior al 86%), según se observa en la Tabla 8.4.

Las cepas de *B. bassiana* evaluadas fueron más eficientes contra la forma adulta de *T. molitor* que contra las larvas, ya que la sobrevivencia larval varió entre 22 y 42% y la mortalidad de los adultos fue de 100% en los dos casos (Fig. 8.3 y 8.4). Las diferencias entre las cepas no fueron significativas para las larvas ni para los adultos, mientras que las diferencias entre las susceptibilidades de los estados del insecto a las cepas de *Beauveria bassiana* sí lo fueron. Los controles no excedieron el 10% de la mortalidad.



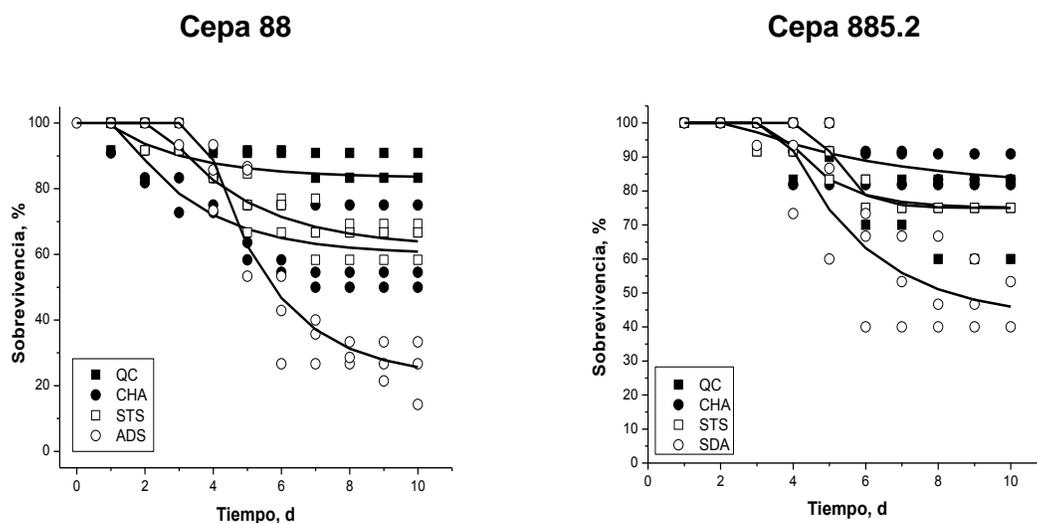
**Figura 8.3** Virulencia de las esporas de la cepa 88 (izquierda) y de la cepa 885.2 (derecha) obtenidas en los medios **ADS**, **QC**, **CHA** y **STS** contra los adultos de *T. molitor*

En cuanto a la susceptibilidad de los adultos a las esporas de las cepas crecidas bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, solamente se encontraron diferencias en la cepa 885.2 en el parámetro  $t$ , ya que el inicio de la muerte fue más rápido en las esporas provenientes del medio **QC** que de las provenientes del medio **STS**, lo que también afectó el  $TS_{50}$  y el  $TS_{90}$  (Fig. 8.4).

**Tabla 8.4** Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios **ADS**, **QC**, **CHA** y **STS** contra los adultos de *T. molitor*

Cepa	QC	CHA	STS	ADS
<b><math>TS_{50}</math>, d</b>				
88	$2.7 \pm 0.01^{abc}$	$2.6 \pm 0.09^{ab}$	$2.3 \pm 0.5^a$	$3.5 \pm 0.2^{abcd}$
885.2	$2.5 \pm 0.14^{ab}$	$3.6 \pm 0.07^{bcd}$	$4.1 \pm 1^d$	$3.9 \pm 0.6^{cd}$
<b><math>TS_{10}</math>, d</b>				
88	$3.8 \pm 0.14^{ab}$	$3.5 \pm 0.6^{ab}$	$3.4 \pm 0.8^a$	$4.4 \pm 0.35^{ab}$
885.2	$3.4 \pm 0.6^a$	$4.7 \pm 0.15^{ab}$	$5 \pm 0.7^b$	$4.7 \pm 0.4^{ab}$
<b><math>S</math>, %</b>				
88	$3 \pm 5^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$	$0 \pm 0^a$
885.2	$0 \pm 0^a$	$3 \pm 5^a$	$0 \pm 0^a$	$13.4 \pm 15^a$
<b><math>k</math>, <math>d^{-1}</math></b>				
88	$1.8 \pm 1^a$	$1.8 \pm 1^a$	$1.7 \pm 0.7^a$	$1.7 \pm 0.3^a$
885.2	$2.1 \pm 0.8^a$	$1.2 \pm 0.1^a$	$2.3 \pm 0.9^a$	$2.0 \pm 0.8^a$
<b><math>t</math>, d</b>				
88	$2.5 \pm 0.5^{ab}$	$2.8 \pm 0.3^{ab}$	$3.0 \pm 0.2^{ab}$	$3.0 \pm 0.2^{ab}$
885.2	$2 \pm 0.05^a$	$2.8 \pm 0.04^{ab}$	$3.7 \pm 1.1^b$	$3.2 \pm 0.6^{ab}$

Por otra parte, las esporas obtenidas a partir de los medios de cultivo **QC**, **CHA** y **STS**, alcanzaron un valor promedio de  $S$ , significativamente diferente, el cual fue cuatro veces mayor que el valor obtenido con el medio **ADS** ( $S \approx 17,5\%$ ). La curva de caída se inició, aproximadamente, después de 3 días de la infección, para la mayoría de los casos. Esto indica que los adultos mueren a una tasa mayor que las larvas y también que las esporas provenientes del medio **ADS** mataron más rápido a los organismos adultos. Al parecer, el medio de cultivo **ADS** es una mejor opción para inducir una mayor virulencia de *B. bassiana* contra *T. molitor*, en comparación con medios de cultivo más complejos (**QC**, **CHA** o **STS**). Cabe señalar que la infección por hongos de los insectos muertos fue confirmada al colocar los cadáveres en cámaras húmedas, la mortalidad final de los controles fue menor al 1%.



**Figura 8.4** Virulencia de las esporas de las cepas 88 y 885.2 obtenidas en los medios **ADS, QC, CHA** y **STS** contra las larvas de *T. molitor*

**Tabla 8.5** Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios **ADS, QC, CHA** y **STS** contra las larvas de *T. molitor*.

Cepa	QC	CHA	STS	ADS	QC	CHA	STS	ADS
<b>LT<sub>50</sub></b>				<b>S, %</b>				
<b>88</b>	< 40%	< 40%	< 40%	5.8±0.6 <sup>a</sup>	19.7±12 <sup>b</sup>	40±13 <sup>b</sup>	35±6 <sup>b</sup>	77.6±13.6 <sup>b</sup>
<b>885.2</b>	< 40%	< 40%	< 40%	7.8±2.5 <sup>a</sup>	27±12 <sup>a</sup>	15±5 <sup>a</sup>	50±0 <sup>a</sup>	58±3.8 <sup>ab</sup>
<b>K, d<sup>-1</sup></b>				<b>t, d</b>				
<b>88</b>	0.6±0.6 <sup>a</sup>	0.6±0.2 <sup>a</sup>	0.4±0.1 <sup>a</sup>	0.8±0.4 <sup>a</sup>	1.4±1.2 <sup>a</sup>	1.4±1.2 <sup>a</sup>	2.2±0.6 <sup>a</sup>	4±0.6 <sup>a</sup>
<b>885.2</b>	0.7±0.1 <sup>a</sup>	1.5±0.7 <sup>a</sup>	0.8±0.3 <sup>a</sup>	0.6±0.2 <sup>a</sup>	3.4±1.2 <sup>a</sup>	3±2 <sup>a</sup>	3.5±1.5 <sup>a</sup>	3.9±1 <sup>a</sup>

< 40% = la mortalidad alcanzada al final del bioensayo fue inferior al 40%

La influencia del medio de cultivo sobre la virulencia ha sido reportada por algunos autores (Shah y col., 2005; Rangel y col., 2004; Ibrahim y col., 2002). En el caso de *Beauveria bassiana*, Arcas y col. (1999) informaron de una mayor mortalidad de larvas de *Diatraea saccharalis* con esporas cosechadas de medio **ADS** añadido con extracto de levadura, en comparación con los valores alcanzados por esporas cosechadas de medio similar a **STS**. Sin embargo, para otro aislado en el mismo estudio, la mortalidad fue similar en esporas cosechadas de estos dos medios de cultivo. Las observaciones del presente estudio indican que es posible seleccionar un medio de cultivo (**ADS**), para inducir una forma más virulenta

de *B. bassiana* contra las larvas, que a su vez podría en el futuro ayudar a encontrar las causas principales de esa virulencia.

Los medios para la producción de las esporas de HE influyen en la virulencia de las mismas, por ejemplo, Ibrahim y col. (2002) describieron que los conidios de *Metarhizium anisopliae* producidos en el medio mínimo adicionado con cutícula de *Myzus persicae* produjeron  $LT_{50}$  significativamente más bajos que los valores de los producidos en **ADS** para todas las cepas utilizadas. Liu y col. (2003) reportaron que las cepas de *B. bassiana* donde hubo mayor producción de esporas, más rápida germinación de esporas y tasa de crecimiento hifal, fueron en general las más virulentas contra insectos de segundo instar de *Lygus lineolaris* Palisot (Homoptera: Miridae).

Por lo que sabemos, éste es el primer trabajo que describe la mayor susceptibilidad de los insectos adultos, en comparación con las larvas de *T. molitor* cuando son infectadas por esporas de *B. bassiana*. Los presentes resultados difieren de ensayos de virulencia realizados en insectos de la familia Tenebrionidae. Rohde y col. (2006) y Alexandre y col. (2006) indicaron que las cepas de *B. bassiana* fueron más eficaces contra las larvas de *Alphitobius diaperinus* que contra los adultos. Por su parte, Rohde y col. (2006) informaron mortalidades variables después de 10 d de bioensayo: 7% a 100% para larvas y de 0 a 86% para los adultos; mientras que Alexandre y col. (2006) obtuvieron mortalidades de entre el 57% a 89% en contra de los adultos después de 10 d, los cuales son inferiores a los obtenidos en nuestro estudio, que el 100% de mortalidad de adultos utilizando *T. molitor* fue alcanzado entre 4 a 6 d de ensayo.

Las diferencias de infección relacionada a la etapa de desarrollo podrían estar asociadas a la naturaleza de la superficie de la cutícula de los adultos de la familia Coleóptera y a la presencia de algunas sustancias externas, como el mucílago, que puede mejorar la adhesión de los conidios (Hajek y St Leger, 1994). Además, la presencia de las membranas bajo los elitros, y la abundancia de los espiráculos, los canales de poros y los espacios Intersegmentales podrían hacer más fácil la penetración del micelio en los adultos, en comparación con las larvas. Otro factor importante puede estar relacionado con la ecdisis, Vestergaard y col., (1999) describieron la adhesión de las esporas a la exuvia de larvas y pupas, después de la muda, y detectaron pocas esporas restantes sobre las nuevas cutículas. Otra razón para una mayor susceptibilidad a la infección en adultos podría ser una

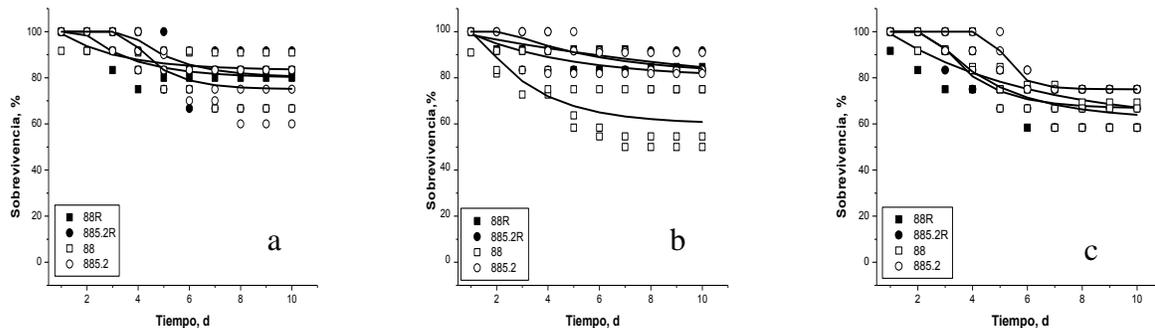
disminución en la respuesta inmune relacionada con la edad, a su vez vinculada a una mayor inversión en energía en la reproducción que en la defensa. Esto se ha relacionado también a la actividad fenoloxidasa (PO) y a la velocidad de encapsulamiento (Schmid-Hempel, 2005).

La virulencia está determinada, además de la biología del aislado entomopatógeno, también por la fisiología del hospedero y la metodología de bioensayo (Jaramillo y Borgemeister, 2006). Se pudo comprobar en este trabajo que la composición del medio de cultivo influyó no solo en el rendimiento de las esporas, sino también en su calidad. De la misma manera, Shah y col. (2005) obtuvieron conidios más virulentos de *M. anisopliae* a partir de un medio modificado osmóticamente y de otro que contenía 1% de extracto de levadura, mientras que los conidios menos virulentos se produjeron en medio PDA (agar papa dextrosa) y en medios con relación C: N de 35:1, que los autores suponen similares al medio **ADS**. Sin embargo, en este estudio el medio **ADS** tuvo relación C: N de 15: 1. Por otra parte, St Leger y col. (1991) reportaron que los conidios producidos en la superficie de los cadáveres de los insectos tenían mayores concentraciones de enzimas hidrolíticas, relacionadas con la virulencia, en comparación con los conidios producidos en un medio artificial. Magan y col. (2001) reportaron que el aumento de la virulencia y la tolerancia al estrés pueden ser manipulados por las reservas endógenas en conidios dependientes del medio de producción.

#### **8.4 Efecto del repase por larvas de *T. molitor* en la virulencia**

Las cepas 88R y 885.2R fueron obtenidas a partir del pase por larvas de *T. molitor*, y posterior reaislamiento sobre medio Agar maltosa Sabouraud de las cepas 88 y 885.2, respectivamente. Por tanto, se usaron 4 lotes por separado de esporas que se procesaron independientemente, según se indica en la sección de Materiales y Métodos.

En las larvas no se alcanzó el 50% de la mortalidad en ninguno de los casos, según se muestra en la Figura 8.5 y la Tabla 8.6. Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en  $S$ ,  $k$  o  $t$  entre los medios y entre las cepas, es notable la diferencia en el medio **CHA** en la cepa 88, ya que después del repase por el insecto, la virulencia se redujo en un 25%.



**Figura 8.5** Virulencia de esporas obtenidas en los medios **QC** (a), **CHA** (b) y **STS** (c) contra las larvas de *T. molitor*, antes y después del repase por larvas de *T. molitor*.

Los datos se ajustaron al modelo propuesto en este estudio.

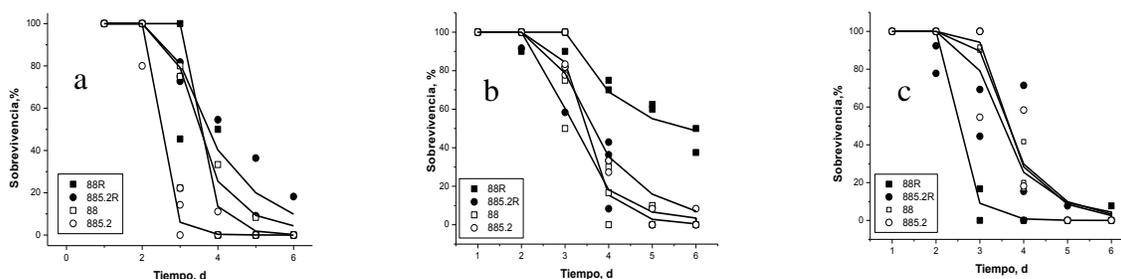
Según se presenta en la Tabla 8.7 y la Figura 8.6, el  $TS_{50}$  en los adultos de la cepa 88R fue superior estadísticamente que en la cepa original en todos los medios, lo que se traduce en una disminución de la virulencia entre 38 y 63% hacia *T. molitor*. Mientras que la cepa 885.2R solamente se afectó en este parámetro en el medio **QC**. En cuanto a los parámetros indicativos de virulencia según el modelo exponencial de decaimiento, solo se observó diferencia en la sobrevivencia ( $S$ ) de los adultos cuando fueron infectados con esporas de la cepa 88R provenientes del medio **CHA**, la cual pasó de cero a 44% y la tasa de mortalidad ( $k$ ) disminuyó en 94%. Los controles no excedieron el 10% de mortalidad.

**Tabla 8.6** Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios **QC**, **CHA** y **STS** contra las larvas de *T. molitor*, antes y después del repase por larvas de *T. molitor*

Cepa	QC	CHA	STS	QC	CHA	STS	QC	CHA	STS	QC	CHA	STS
	$LT_{50}, d$			$S, \%$			$K, d^{-1}$			$t, d$		
<b>88</b>	<40 %	<40 %	<40 %	20± 12 <sup>a</sup>	40± 13 <sup>a</sup>	35± 6 <sup>a</sup>	0.6± 0.6 <sup>a</sup>	0.6± 0.2 <sup>a</sup>	0.4± 0.1 <sup>a</sup>	1.4± 1.2 <sup>a</sup>	1.4± 1.2 <sup>a</sup>	2.2± 0.6 <sup>a</sup>
<b>885.2</b>	<40 %	<40 %	<40 %	27± 12 <sup>a</sup>	15± 5 <sup>a</sup>	25± 0 <sup>a</sup>	0.7± 0.1 <sup>a</sup>	1.5± 0.7 <sup>a</sup>	0.8± 0.3 <sup>a</sup>	3.4± 1.2 <sup>a</sup>	3± 2 <sup>a</sup>	3.5± 1.5 <sup>a</sup>
<b>88 R</b>	<40 %	<40 %	<40 %	35± 28 <sup>a</sup>	19± 5 <sup>a</sup>	31± 9.6 <sup>a</sup>	1.7± 1 <sup>a</sup>	0.3± 0.1 <sup>a</sup>	0.7± 0.7 <sup>a</sup>	3.2± 0.7 <sup>a</sup>	0.8± 0.4 <sup>a</sup>	1.9± 2 <sup>a</sup>
<b>885.2 R</b>	<40 %	<40 %	<40 %	17± 14 <sup>a</sup>	22± 17 <sup>a</sup>	33± 8 <sup>a</sup>	1.4± 0.7 <sup>a</sup>	1.4± 0.3 <sup>a</sup>	0.8± 0.3 <sup>a</sup>	3.9± 1 <sup>a</sup>	2.8± 1.3 <sup>a</sup>	2.7± 0.6 <sup>a</sup>

< 40% = la mortalidad alcanzada al final del bioensayo fue inferior al 40%

En las cepas de *Beauveria bassiana* analizadas, la virulencia hacia los adultos de *Tenebrio molitor* fue mayor, comparada con la obtenida sobre larvas, como ya se había evidenciado anteriormente. Sin embargo, hubo un efecto en la virulencia contra los adultos de *T. molitor*, la cual disminuyó al ser previamente pasados por el insecto en estado de larva. Mientras que los parámetros de virulencia evaluados en larvas no se vieron afectados por este repase por insecto, similar a lo reportado por Shah y col. (2005), quienes no encontraron diferencias en la virulencia después de haber sido pasados una vez por el insecto blanco.



**Figura 8.6** Virulencia de esporas obtenidas en los medios **QC** (a), **CHA** (b) y **STS** (c) contra los adultos de *T. molitor*, antes y después del repase por larvas de *T. molitor*.

Los datos se ajustaron al modelo propuesto en este estudio.

**Tabla 8.7** Parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en los medios **QC**, **CHA** y **STS** contra los adultos de *T. molitor*, antes y después del repase por larvas de *T. molitor*

Cepa	QC	CHA	STS	QC	CHA	STS	QC	CHA	STS
	LT <sub>50</sub> , d			K, d <sup>-1</sup>			S, %		
<b>88</b>	2.7±0.01 ab	2.6±0.1 a	2.3±0.5 a	1.8±1 ab	1.8±1 ab	1.7±0.7 ab	97±5 b	100±0 b	100±0 b
<b>885.2</b>	2.5±0.1 a	3.6±0.1 ab	4.1±1 b	2.1±0.8 ab	1.2±0.1 ab	2.3±0.9 ab	100±0 b	97±5 b	100±0 b
<b>88R</b>	3.2±0.7 ab	5.7±0.4 c	2.5±0.1 a	1.9±0.4 ab	0.6±0.2 a	2.8±0.7 b	100±0 b	56±9 a	100±0 b
<b>885.2R</b>	3.7±0.4 ab	3.6±0.1 ab	3.5±0.75 ab	1.2±0.45 ab	1.6±0.5 ab	1.8±0.8 ab	94±1 b	100±0 b	97±5 b
	LT <sub>90</sub> , d			t, d			R <sup>2</sup>		
<b>88</b>	3.8±0.1 ab	3.5±0.6 ab	3.4±0.8 ab	2.5±0.5 a	2.8±0.3 a	3.0±0.2 a	97±5 b	100±0 b	100±0 b
<b>885.2</b>	3.4±0.6 ab	4.7±0.1 b	5±0.7 b	2±0.1 a	2.8±0.04 a	3.7±1.1 a	100±0 b	97±5 b	100±0 b
<b>88R</b>	4.05±0.6 ab	3.4±0.0 ab	3.0±0.3 a	2.7±0.9 a	2.6±1.1 a	2.1±0 a	100±0 b	56±9 a	100±0 b
<b>885.2R</b>	4.6±0.3a b	4.5±0.5 ab	4.4±0.6 ab	2.7±0.1 a	3±0.4 a	2.8±1.1 a	94±11 b	100±0 b	97±5 b

Shah y col. (2005) encontraron también, que los conidios producidos en insectos y en medio con extracto de levadura fueron más agresivos que los producidos en medio con relaciones C: N intermedias, lo cual no fue observado en este estudio, ya que para las cepas 88 y 885.2, los mejores  $TS_{50}$  se obtuvieron con las esporas crecidas en el medio **QC**, que fue el medio donde se desfavoreció el crecimiento y la esporulación comparado con los medios **ST** y **CHA**. Lo cual es similar a lo encontrado por Ibrahim y col. (2002), quienes reportaron que esporas de *M. anisopliae* producidas en los medios de nutrientes pobres aumentó la virulencia a los insectos.

Todo lo anterior, es indicativo de que el repase por insecto no es un método infalible para el incremento de la virulencia en los HE, por lo cual debe ser interpretado con precaución. Además, que el pase por un estadio del insecto (larva) afectó la virulencia en otro estadio (adulto) es de tomarse en cuenta para estudios posteriores. Así como el efecto ejercido en el medio **CHA** sobre la cepa 88, donde se disminuyó la virulencia sobre los adultos de *T. molitor*.

Algunos estudios recientes de genómica sobre la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*, (Freimoser y col., 2005; Wang y col., 2005b; Wang y St Leger, 2005) mostraron cómo los genes relacionados con la patogenicidad son regulados de manera diferente cuando el hongo se cultiva en hemolinfa, medios de cultivo nutricionalmente ricos, o pobres, con o sin administración de suplementos de cutícula del insecto. Además indicaron que la plasticidad fenotípica de la virulencia, al menos en algunas circunstancias, puede atribuirse a respuestas precisas del agente patógeno específico para el medio ambiente y/o a las condiciones nutricionales. Además que las alteraciones genéticas y estructurales que conllevan a un cambio en la fisiología y la virulencia debido a repases por insectos son dependientes de las cepas, no siguen un patrón determinado, aún sometidos a diferentes condiciones de estrés nutricional.

La patogenicidad es el conjunto de interacciones del hospedero, el entomopatógeno y el método de inoculación. La metodología de inoculación de los insectos fue la misma para todos los ensayos, aun cuando ésta no reproduce la infección de manera natural, si es útil para propósitos de investigación de factores asociados a la virulencia, como fue en este caso: Comparación de la modificación de la virulencia por almacenamiento, repase por insecto, y medio de cultivo donde se obtuvo el inóculo, además de la comparación con la

bibliografía. Los porcentajes de germinación evaluados al lote de esporas usado en los bioensayos mostraron adecuada germinación, esto es 100% a las 24 h de evaluación.

El sistema de CMS sobre la cutícula de chapulín estaría simulando un ambiente más cercano al sistema natural de infección que utiliza el hongo y sería un modelo experimental adecuado para el estudio de la fisiología de crecimiento de hongos entomopatógenos (Barranco-Flórido, 2004), pero para estudiar la virulencia, el bioensayo sobre hospederos específicos y el uso de conidios obtenidos a partir del medio de producción es obligatorio, ya que a pesar de existir diferencias muy importantes en la fisiología de estas cepas, la virulencia sobre *T. molitor* en la etapa larval y adulta se mantuvo similar.

## 8.5 Resumen de resultados

Por medio de un modelo de primer orden con un tiempo de retardo en la supervivencia de larvas y adultos de *T. molitor* se encontró que:

- i. Las esporas de ambas cepas tuvieron una virulencia similar contra larvas o adultos de *T. molitor*, sugiriendo que las diferencias en la producción global de hexosaminidasas no explicaban su actividad biológica con este ensayo.
- ii. En ambas cepas se mostró que las larvas de *Tenebrio molitor* fueron mucho menos susceptibles que los organismos adultos, frente a la acción de *Beauveria bassiana*, sugiriendo que el mecanismo de acción letal sobre estos coleópteros es diferente en función del estadio.
- iii. Se mostró que las esporas cosechadas de *B. bassiana* en el medio agar dextrosa Sabouraud fueron más virulentas sobre las larvas de *T. molitor* que las obtenidas en medios complejos como los exoesqueletos de *S. purpurascens*, salvado de trigo y quitina coloidal.
- iv. Además, no hubo un efecto claro en el repase por larvas de *Tenebrio molitor* como método para la reactivación de la virulencia en el laboratorio.

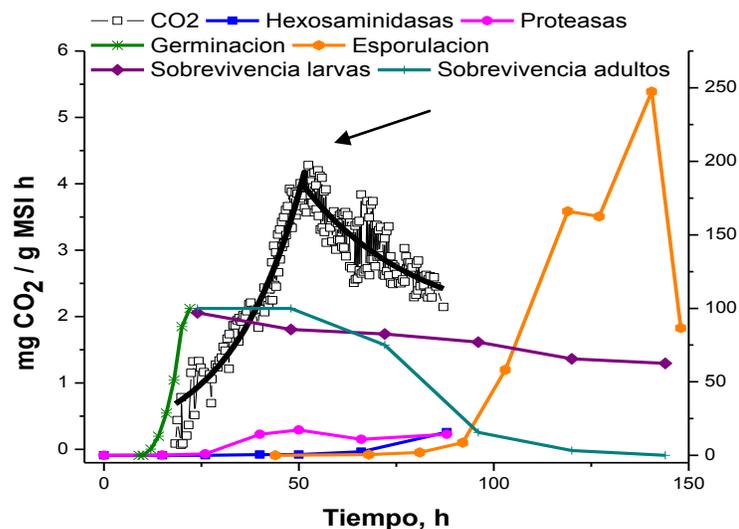
## **PARTE III, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

### **RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

## 9 RESUMEN DE RESULTADOS, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

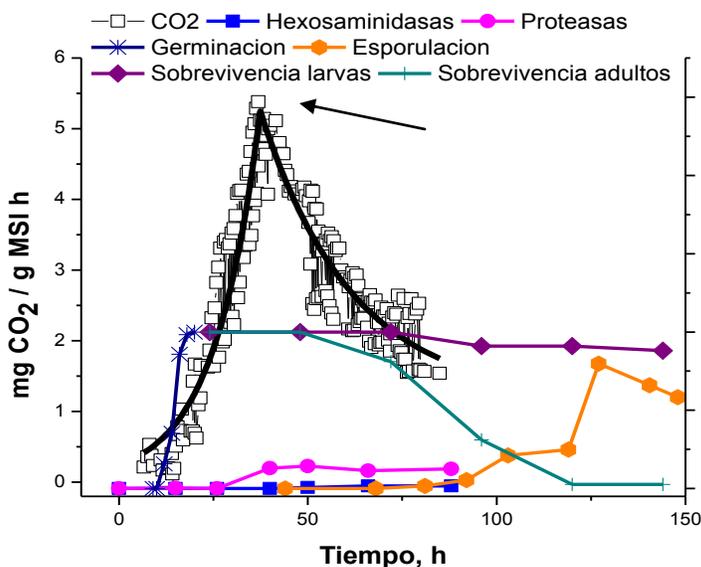
### 9.1 Resumen de resultados

- i. El estudio del crecimiento y la producción de enzimas hexosaminidasas y proteasas de las dos cepas en CMS mostró que se tenían fenotipos distintos. La cepa 885.2 en comparación con la cepa silvestre redujo su capacidad de producir y/o excretar las enzimas hexosaminidasas, pero no las enzimas proteasas.
- ii. La resistencia a 2-dog de la cepa mutante le confirió mayor rendimiento de enzima: biomasa y mayor actividad específica en el medio con quitina coloidal con glucosa y nitrato de sodio, que en el medio que contenía solo quitina coloidal, contrario a lo presentado por la cepa silvestre.
- iii. La cepa 885.2 en comparación con la cepa silvestre alteró su frecuencia de ramificación hifal, tasa específica de crecimiento, densidad de esporulación y el tiempo de germinación medio, siendo en este último parámetro donde se presentó la diferencia más notable entre las cepas.
- iv. Las dos cepas presentaron diferencias importantes en los estudios de fisiología, tanto en CMS como en cultivo en caja de Petri, sin embargo, no se encontraron diferencias en la virulencia frente a larvas y a adultos de *Tenebrio molitor*.
- v. Fue mayor la susceptibilidad de los adultos que de las larvas de *Tenebrio molitor* a la infección por las dos cepas de *Beauveria bassiana*.
- vi. Las esporas obtenidas en **ADS** fueron más virulentas contra larvas que las cosechadas en medio de quitina coloidal, cutícula de chapulín y salvado de trigo.
- vii. Al reunir gráficamente los resultados de la mortalidad, de la fisiología de crecimiento tanto en CMS y en caja de Petri obtenidos en el medio **CHA**, los tiempos en que se presentaron concuerdan con lo reportado en la literatura para los procesos del ciclo de vida de este hongo (Figuras 9.1 y 9.2). Además, se incluyó la respirometría en la evaluación de la fisiología de crecimiento de las cepas, donde se evidenció la correspondencia en la transición en el momento  $t_a$  (flecha) dada por alteraciones en la producción de las enzimas y en  $r'X_e$  respecto a la esporulación.



**Figura 9.1** Resumen de los parámetros evaluados en la cepa 88 en medio **CHA**

Tasa de producción de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> h g<sup>-1</sup> MSI). Hexosaminidasas (UE g<sup>-1</sup> MS). Proteasas (\*100 UA g<sup>-1</sup> MS). Proteína (mg g<sup>-1</sup> MS). Germinación (%). Esporulación (Esporas \*10<sup>6</sup> cm<sup>-2</sup>). Sobrevivencia de larvas (%). Sobrevivencia de adultos (%).



**Figura 9.2** Resumen de los parámetros evaluados en la cepa 885.2 en medio **CHA**

Tasa de producción de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub> h g<sup>-1</sup> MSI). Hexosaminidasas (UE g<sup>-1</sup> MS). Proteasas (\*100 UA g<sup>-1</sup> MS). Proteína (mg g<sup>-1</sup> MS). Germinación (%). Esporulación (Esporas \*10<sup>6</sup> cm<sup>-2</sup>). Sobrevivencia de larvas (%). Sobrevivencia de adultos (%).

## 9.2 Conclusiones específicas

1. La cepa mutante presentó menor actividad hexosaminidasa en el extracto extracelular obtenido de CMS en todos los medios analizados, en comparación con la producción de la cepa silvestre. Sin embargo, en un análisis más detallado, se encontró que la mutación le confirió a esta cepa mayor rendimiento de enzima: biomasa y mayor actividad específica en el medio con quitina coloidal en presencia de glucosa y nitrato de sodio, que en el medio de solo quitina coloidal, contrario a lo presentado por la cepa silvestre.
2. El crecimiento de las cepas de *B. bassiana* en cultivo en medio sólido sobre diferentes sustratos fue descrito por el modelo de la cinética de respiración doble exponencial, excepto la cepa mutante en el medio **QC**. Este modelo presentó dos etapas exponenciales sucesivas, una de crecimiento y una de decrecimiento, que contiene el parámetro  $r X_e$  de la biomasa después del tiempo  $t_a$ .
3. No hubo correlaciones importantes en el estudio morfométrico de las dos cepas de *Beauveria bassiana* en cultivo en cajas de Petri sobre diferentes sustratos. sin embargo, la cepa mutante germinó más rápido en todos los medios de cultivo y presentó mayor densidad de esporulación en el medio **ADS** que la cepa silvestre.
4. Las diferencias en la virulencia de *Beauveria bassiana* sobre el insecto *T. molitor*, se establecieron en la etapa del desarrollo de los insectos y la composición del medio de cultivo para la producción de las esporas, pero no entre las cepas en estudio.
5. Las actividades globales de las hexosaminidasas, la germinación y la morfometría de crecimiento no tuvieron relación directa con la virulencia de las cepas contra insectos de *T. molitor*.

## 9.3 Conclusión general

La resistencia a 2-dog de la cepa mutante de *Beauveria bassiana* en comparación con su cepa silvestre, no alteró la virulencia frente a larvas y adultos de *Tenebrio molitor*, a pesar de que disminuyó la producción de enzimas hexosaminidasas y el tiempo medio de

germinación; por lo que no hubo correlaciones importantes entre estos parámetros evaluados *in vitro* y la virulencia de las cepas de *B. bassiana* ensayadas sobre los insectos.

#### **9.4 Perspectivas**

Este trabajo contribuye al entendimiento de la fisiología de los hongos entomopatógenos, así como de los mecanismos involucrados en la virulencia, a través de herramientas de estudio de laboratorio que pueden correlacionarse con el comportamiento natural de estos microorganismos durante su proceso infectivo. Las cuales pueden ser útiles en la selección de aislamientos virulentos aplicables en campo, además como criterio de selección basado en los parámetros de calidad de las esporas producidas en diferentes medios de cultivo.

Cabe aclarar que en esta tesis solo se abordaron los fenómenos fisiológicos que se presentan durante la fase micelial del HE, falta entender lo que está ocurriendo en la fase de levadura (blastosporas), por lo que se sugieren más estudios al respecto, por ejemplo la comparación entre cepas con alguna mutación en la transición entre la fase de levadura y la micelial.

Así como el estudio cronológico del proceso infeccioso, seguido por técnicas de PCR con muestras de insectos, y de la producción de enzimas hidrolíticas obtenidas de los extractos de los insectos infectados, seguramente permitirá demostrar la secuencia *in vivo* de este proceso y aclarará muchos aspectos sobre la virulencia de *B. bassiana* que hasta ahora han permanecido confusos.

Se sugiere continuar los estudios en estas cepas de *Beauveria bassiana*, hacia la caracterización de otras características ventajosas en la comercialización, como es la resistencia a bajas y altas temperaturas, a los rayos UV y a la longevidad en almacén, que pudieran deberse a la mutación por la radiación ultravioleta y la resistencia a 2-dog.

Asimismo, es necesario un estudio más profundo en cuanto a la caracterización genética de estas cepas, mediante la identificación de los genes mutados y el grado de alteración, lo cual permitirá la correlación con los avances presentados en esta tesis.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adachi K, Hamer JE. (1998) Divergent cAMP signaling. Pathways regulate growth and pathogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 10: 1361–1373.
- Adams TH, Wieser JK, Yu J. (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (1): 35–54.
- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. (2005) Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*, 13 (3): 111-118.
- Alatorre-Rosas R. (2004) Hongos entomopatógenos. En: *Memorias del XV Curso Nacional de Control Biológico*, Los Mochis (México).
- Alatorre-Rosas R. (2007) Cap. 9. Hongos entomopatógenos. En: Rodríguez del Bosque LA y Arredondo-Bernal HC (Eds.). *Teoría y aplicación del control biológico*. Sociedad mexicana de control biológico, México. 303 p.
- Alexandre TM, Alves LFA, Neves PMOJ, Alves SB. (2006) Efeito da temperatura e cama do aviário na virulência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para o controle do Cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotropical Entomology*, 35(1):75–82.
- Allen KE, McNally MT, Lowendorf HS, Slayman CW, Free SJ. (1989) Deoxyglucose resistant mutants of *Neurospora crassa*: isolation, mapping, and biochemical characterization. *Journal of Bacteriology*, 171 (1): 53-58.
- Altre JA, Vandenberg JD, Cantone FA. (1998) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 332-338.
- Alvares-Campos R, Walquiria-Arruda J, Tomazzoni-Boldo MVS, Neiva-Monteiro de Barros JLA, Schrank A, Henning Vainstein M. (2005) *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*, 50: 257–261.
- Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniegra-González G. (1993) Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 254-260.
- Arakane Y, Muthukrishnan S, Beeman RW, Kanost MR, Kramer KJ. (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (32):11337–11342.
- Arcas JA, Díaz BM, Lecuona RE. (1999) Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Journal of Biotechnology*, 67: 151–158.
- Arredondo-Bernal HC. (2006) Aportaciones del control biológico en México, pp.218-232. En: Ángel-Sahagún CA. (Ed.) *XVII Curso Nacional de Control Biológico*. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-Sociedad Mexicana de Control Biológico. México, 250 p.
- Arruda-Walquiria IL, Schrank A, Henning Vainstein M. (2005) Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 37: 231–244.
- Asaff A, Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, 2006.
- Baaga S, Hu G, Screen SE, St Leger RJ. (2004) Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Gene*, 324: 159–169.
- Barranco-Florido JE, Alatorre-Rosas R, Gutierrez Rojas M, Viniegra-González G, Saucedo-Castañeda G. (2002) Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 910-916.
- Barranco-Florido JE. Contribución al estudio de las actividades enzimáticas involucradas en el mecanismo de patogenicidad de *Verticillium lecanii* cultivado por fermentación en medio sólido. Tesis de Doctorado Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2004.
- Barrera JF. (2007) Cap. 1. Introducción, filosofía y alcance del Control Biológico. En: Rodríguez del Bosque LA y Arredondo-Bernal HC. (Eds.). *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México.

- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340: 783-795.
- Bhargav S, Panda BP, Ali M, Javed S. (2008) Solid-state fermentation: An overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 22 (1): 49–70.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG, Tong KI. (1993) Partial purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39: 40-45.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1987) Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53 (7): 1679-1684.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1988) N-acetyl-D-Glucosamine-mediated regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (11): 2699-2704.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1990) Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56 (3): 362-370.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1991) Microbial and protozoan pathogens of grasshoppers and locusts as potential biocontrol agents. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 243–259.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1993) Regulation of extracellular N-Acetyl-D-glucosaminidase production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Canadian Journal of Microbiology*, 39 (1): 6-12.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1994a) Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64: 26-32.
- Bidochka MJ, Khachatourians GG. (1994b) Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63 (1): 7-13.
- Bidochka MJ, St Leger RJ, Stuart A, Gowanlock K. (1999) Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. *Microbiology*, 145: 955–963.
- BlastP, The National Center for Biotechnology information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Diciembre de 2009.
- Boucias DG, Pende land JC, Latgé JP. (1988) Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (7): 1795-1805.
- Boucias DG, Pende land JC. (1998) *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers. Pag. 1-14.
- Bozzola JJ, Russell LD. (1992) *Electron microscopy. Principles and techniques for biologists*. USA: Jones and Bartlett Publishers, Cap.1-3.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Bustillo AE, Bernal MG, Benavides P, Chavez B. (1999) Dynamics of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* infecting *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) populations emerging from fallen coffee berries. *The Florida Entomologist*, 82: 491–498.
- Butt TM, Jackson C, Magan N. (2001) Cap 1. Fungal biological control agents: Progress, problems and potential. En: *Fungi as Biocontrol Agents*. TM Butt, C Jackson and N Magan (Eds.). CAB International.
- Bye NJ, Charnley AK. (2008) Regulation of cuticle-degrading subtilisin proteases from the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium* spp.: implications for host specificity. *Archives of Microbiology*, 189:81–92.
- Camargo LMF. Efectividad biológica de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. y *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) para el control del gorgojo del frijol, *Acanthoscelides obtectilis* (Say). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México, 2000.

- Camargo Prado F, Porto de Souza Vandenberghe L, Socol CR. (2005) Relation between citric acid production by solid-state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (Sp n): 29-36.
- Candas M, Bulla LA. (2002) Microbial Insecticides. En: *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright © by John Wiley & Sons, Inc.
- Cervantes MJ, Lomeli FJ, Terrón SR, Rodríguez NS. (2003) Fundamentos de Control biológico en México. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
- Charnley AK, Collins SA. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. En: *Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Edition. The Mycota IV. CP Kubicek and IS Druzhinina (Eds.). © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, pp159-187.
- Charnley AK. (2003) Fungal pathogens of insects: Cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40: 241-321.
- Chaves C, Staats CC, Schrank A, Henning Vainstein M. (2004) Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of *N*-acetylglucosamine in protein secretion. *Current microbiology*, 48: 102-107.
- Chavira R, Burnett TJ, Hageman JH. (1984) Assaying proteinases with Azocoll. *Analytical Biochemistry*, 136: 446-450.
- Chen CC, Kumar HGA, Kumar S, Tzean SS, Yeh KW. (2007) Molecular cloning, characterization, and expression of a chitinase from the entomopathogenic fungus *Paecilomyces javanicus*. *Current Microbiology*, 55: 8–13.
- Chernaki-Leffer AM, Sosa-Gómez DR, Almeida LM. (2007) Selection for entomopathogenic fungi and LD<sub>50</sub> of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. for the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Brazilian Journal of Poultry Science, Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 9 (3): 187–191.
- Cherry AJ, Abalo P, Hell K. (2005) A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (f) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*, 41 (3): 295-309.
- Chet I, Chernin L. (2002) Biocontrol, microbial agents in soil. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright © by John Wiley & Sons, Inc.
- Coates BS, Hellmich RL, Lewis LC. (2002) Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome*, 45: 125–132.
- Coudron TA, Kroha MJ, Ignoffo CM. (1984) Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Compendium of Biochemistry and Physiology*, 79B: 339-348.
- Cuthbertson AGS, Walters KFA, Northing P. (2005) The susceptibility of immature stages of *Bemisia tabaci* to the entomopathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* on tomato and verbena foliage. *Mycopathologia*, 159: 23–29.
- da Silva MV, Santi L, Staats CC, da Costa AM, Colodel EM, Driemeir D, Henning Vainstein M, Schrank A. (2005) Cuticle induced endo/exoacting chitinase chit30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. *Research in Microbiology*, 156 (3): 382-392.
- Dalla Santa HS, Dalla Santa OR, Brand D, Vandenberghe LPS, Socol CR. (2005) Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (Sp n): 51-60.
- de la Rosa W, Alatorre R, Barrera F, Toriello C. (2000) Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. *Journal of Economic Entomology*, 93(5): 1409-1414.
- Delgado BF. Mecanismo de infección y cuantificación de la actividad de la fenoloxidasas, *N*-acetilglucosaminidasa, quitinasa y de la toxina Beauvericina de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patogénicos a *Hypothenemus hampei*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Colombia, 2000.
- Deshpande MV. (1986) Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 45: 273-281.

- Devi KU, Sridevi V, Mohan CM, Padmavathi J. (2005) Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88 (3): 181-189.
- Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. (2008) Cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 301-306.
- Diderich JA, Raamsdonk LM, Kruckeberg AL, Berden A, Van Dam K. (2001) Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (4): 1587–1593.
- Dillon AJ, Zotgi C, Camassola M, Henriques JAP. (2006) Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulose and  $\beta$ -glucosidase activities. *Applied Microbial and Cell Physiology, Applied Microbiology and Biotechnology*, 70: 740–746.
- Dixon KP, Xu JR, Smirnov N, Talbot NJ. (1999) Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 11: 2045–2058.
- Donatti AC, Furlaneto-Maia L, Fungaro MHP, Furlaneto MC. (2008) Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle. *Current Microbiology*, 56: 256–260.
- Dubos RJ. (1945) *The Bacterial Cell*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Ekesi S, Maniania NK, Ampong-Nyarko K. (1999) Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology*, 9 (2): 177-185.
- Ekesi S, Maniania NK. (2000) Susceptibility of *Megalurothrips sjostedti* developmental stages to *Metarhizium anisopliae* and the effects of infection on feeding, adult fecundity, egg fertility and longevity. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 94: 229–236.
- El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. (1997) Antifungal activity of 2-Deoxy-D-Glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, and *Rhizopus stolonifer*. *Ultrastructural and cytochemical aspects. Biochemistry and Cell Biology, Phytopathology*, 87 (7): 772-779.
- Emri T, Molnar Z, Veres T, Pusztahelyi T, Duda G, Pócsi I. (2006) Glucose-mediated repression of autolysis and conidiogenesis in *Emericella nidulans*. *Mycological Research*, 110: 1172-1178.
- EPA, Environmental Protection Agency, ([www.epa.gov/opppbpd1/biopesticides/](http://www.epa.gov/opppbpd1/biopesticides/)). Revisado en 2009.
- Erlacher A, Sousa F, Schroeder M, Jus S, Kokol V, Cavaco-Paulo Guebitz GM. (2006) A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. *Biotechnology Letters*, 28:703–710.
- Estrada ME, Piñón DR, Capote MC. (1997) Variabilidad de las esterases de *Metarhizium anisopliae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 14: 29-30.
- Fan Y, Fang W, Guo S, Pei X, Zhang Y, Xiao Y, Li D, Jin K, Bidochka MJ, Pei Y. (2007) Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (1): 295–302.
- Fang W, Leng B., Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X, Zhang Y, Pei Y. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied Environmental Microbiology*, 71 (1): 363-370.
- Fang W, Pei Y, Bidochka MJ. (2007) A regulator of a G protein signaling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153: 1017–1025.
- Fargues J, Luz C. (2000) Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75: 202-211.
- Fernandes EKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREP, Roberts DW. (2008) Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 69–78.
- Foust AS. (1987) *Principios de operaciones unitarias*. 1° edición, p 637.
- Fransen JJ, Winkelman K, van Lenteren JC. (1987) The differential mortality at various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by infection with

- the fungus *Aschersonia aleyrodis* (Deuteromycotina: Coelomomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology*, 50: 158–165.
- Freimoser FM, Hu G, St Leger RJ. (2005) Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* adapts to different host cuticles or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology*, 151: 361–371.
- Freimoser FM, Screen S, Bagga S, Hu G, St Leger RJ. (2003) Expressed sequence tag (EST) analysis of two subspecies of *Metarhizium anisopliae* reveals a plethora of secreted proteins with potential activity in insect hosts. *Microbiology*, 149: 239–247.
- Fuguet R, Vey A. (2004) Comparative analysis of the production of insecticidal and melanizing macromolecules by strains of *Beauveria* spp. *In vivo* studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85 (3): 152-167.
- Gallegos G, Cepeda M, Olayo R. *Entomopatógenos*. Ed. Trillas. 2004.
- García HM. Identificación de fenotipos de desrepresión catabólica en cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de exopectinasas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, 2003.
- García-Gutiérrez C, Tamez-Guerra P, Medrano-Roldan H, González MB. Cap. 1. Mercado de Bioinsecticidas en México. En: *Biología y tecnología aplicada a los bioplaguicidas*. C García-Gutiérrez, H Medrano-Roldan (Eds.). México, 2006.
- Garfin E. (1990) One dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*. Academic press, NY. 182: 425-440.
- Geremia RA, Goldman GH, Jacobs D, Ardiles W, Vila SB, Van Montagu M, Herrera-Estrella A. (1993) Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, *prb1*, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology*, 8: 603-613.
- Gillespie AT, Claydon NC. (1989) The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticides Science*, 27, 203-215.
- Gillespie JP, Bateman R, Charnley AK. (1998) Role of cuticle-degrading proteases in the virulence of *Metarhizium* spp. for the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71 (2): 128-137.
- Goettel MS, St Leger RJ, Rizzo NW, Staples RC, Roberts DW. (1989) Ultrastructural localization of a cuticle degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology*, 135 (8): 2233-2239.
- Greathead DJ, Waage JK. (1983) Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11, 44 pp.
- Green AT, Healy MG, Healy A. (2005) Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens* QMB1466 using various Chitinous substrates *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80:28–34.
- Grimm LH, Kelly S, Krull R, Hempel DC. (2005) Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 375–384.
- Guarro J, Gené J, Stchigel AM. (1999) Developments in fungal Taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (3): 454-500.
- Gupta SC, Leathers TD, El-Sayed GN, Ignoffo CM. (1994) Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 64 (1): 13-17.
- Hajek AE, St Leger R. (1994) Interactions between fungal pathogens and insects. *Annual Review of Entomology*, 39, 293–322.
- Hamidi-Esfahani Z, Hejazi P, Shojaosadati SA, Hoogschagen M, Vasheghani-Farahani E, Rinzema A. (2007) A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. *Biochemical Engineering Journal*, 36: 100–107.
- Havukkala I, Mitamura C, Hara S, Hirayae K, Nishizawa Y, Hibi T. (1993) Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 97-102.
- Heinrich B. (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science*, 185: 747-756.
- Hohmann S, Mager WH. (2003) *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Berlin.

- Holder DJ, Keyhani NO. (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (9): 5260–5266.
- Howard RJ, Ferrari MA, Roacht DH, Money NP. (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, Microbiology*, 88: 11281-11284.
- Hsu SC, Lockwood JL. (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. *Applied Microbiology*, 29 (3): 422-426.
- Humber RA. Entomopathogenic Fungal Identification. APS/ESA Workshop, 1998. [http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect\\_mycology.html](http://www.ppru.cornell.edu/mycology/Insect_mycology.html) (Acceso, Agosto de 2003).
- Ibrahim L, Butt TM, Jenkinson P. (2002) Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106 (6): 705-715.
- Ikasari L, Mitchell DA. (2000) Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (6): 619-627.
- Inglis GD, Goettel MS, Butt TM. (2001). Fungal biological Control Agent: Progress, Problems and Potential. CABI International. *Fungi as Biocontrol Agents*. TM Butt, C Jackson and N Magan (Eds.). p 23-45.
- Iskandarov US, Guzalova AG, Davranov KD. (2006) Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42 (1): 72–76.
- Jackson MA. (1997) Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19: 180–187.
- James RR, Buckner JS, Freeman TP. (2003) Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84: 67–74.
- James RR. (2001) Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the Silverleaf whitefly for two hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 99-107.
- Jaramillo J, Borgemeister C. (2006) New bioassay method to assess the pathogenicity of Colombian strains of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin and *Paecilomyces* sp. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 91: 57–60.
- Jefferies LB, Khachatourians GG. (1997) Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, and *Tolypocladium* by salt mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 23-28.
- Jennings DH, Lysek G. (1999) Cap. 1. Fungal Biology: Understanding the fungal lifestyle. Bioscientific Publishers. Springer-verlag New York Inc.
- Joshi L, St Leger RJ, Bidochka MJ. (1995) Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters* 125: 211-218.
- Kamp AM, Bidochka MJ. (2002) Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 35:74–77.
- Kang SC, Park S, Lee DG. (1999) Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 276-281.
- Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Gouli V, Gouli S, Guo M, Lee F, Hata T. (2008) Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 112: 583-591.
- Khachatourians GG. (1991) Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. *Handbook of Applied Mycology*. Vol 2. Humans, animals and insects. M Dekker (Ed) New York/Basel/Hong Kong, 613-663.
- Khachatourians GG. (1996) Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. *The mycota VI. Human and animal relationships*. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 332-363.

- Kig C, Turkel S, Temizkan G. (2005) Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69 (12): 2475-2478.
- Kunimi Y. (2007) Current status and prospects on microbial control. *Japan Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 181–186.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lareo C, Sposito AF, Bossio AL, Volpe DC. (2006) Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 391–399.
- Larralde-Corona CP, López-Isunza F, Viniegra-González G. (1997) Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology and Bioengineering*, 56 (3): 287-294.
- Laverlam. [www.laverlam.net](http://www.laverlam.net), Acceso, Enero, 2006.
- Lawniczak MK, Barnes AI, Linklater JR, Boone JM, Wigby S, Chapman T. (2006) Mating and immunity in invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution*, 22 (1): 48-55.
- Li Z, Wang Z, Peng G, Yin Y, Zhao H, Cao Y, Xia Y. (2006) Purification and characterization of a novel thermostable extracellular protein tyrosine phosphatase from *Metarhizium anisopliae* strain CQMa102. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 70 (8): 1962-1968.
- Liu H, Skinner M, Brownbridge M, Parker B. (2003) Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 82:139–147.
- Loera O, Aguirre J, Viniegra-González G. (1999) Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* pectinase over producing mutants, *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 103–108.
- Loera O, Viniegra-González G. (1998) Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase over-producing mutants using image analysis procedures. *Biotechnology Techniques*, 12 (11): 801-804.
- Lord JC. (2005) From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 19–29.
- Lotter D. (2005) Sizing up organic farming in Mexico. [http://newfarm.rodaleinstitute.org/international/pan-am\\_don/feb05/mx\\_organic/index.shtml](http://newfarm.rodaleinstitute.org/international/pan-am_don/feb05/mx_organic/index.shtml)
- Magan N. (2001) Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. En: Butt TM, Jackson CW, Magan N. (Eds.) *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB Publishing, Oxon, pp. 239–250.
- Maniania NK, Ekesi S, Löhr B, Mwangi F. (2001) Prospects for biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, with the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, on chrysanthemum. *Mycopathologia*, 155: 229–235.
- Marannino P, Santiago-Álvarez C, de Lillo E, Quesada-Moraga E. (2006) A new bioassay method reveals pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against early stages of *Capnodis tenebrionis* (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 210–213.
- Marin-Cervantes MC, Matsumoto Y, Ramirez-Coutiño L, Rocha-Pino Z, Viniegra G, Shirai K. (2008) Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. *Process Biochemistry* 43: 24–32.
- Marti GA, Scorsetti AC, Siri A, López Lastra CC. (2005) Isolation of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes) from the Chagas disease vector, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Argentina. *Mycopathologia*, 159: 389–391.
- Matsumoto Y, Revah S, Saucedo G, Shirai K. (2004) Production of  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentation utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*, 39: 665–671.
- Matsumoto Y. Producción de quitinasas en fermentación en medio sólido (FMS) y líquido (FML) utilizando quitina de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, 2001.

- Microbiology Manual, Merck, Darmstadt.1996.
- Milner RJ. (2000) Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol*, 21 (2): 47-50.
- Minjares-Carranco A, Trejo-Aguilar BA, Aguilar G, Viniegra-González G. (1997) Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 25-31.
- Mitchell DA, Berovic M, Krieger N. (2000) Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering*. Managing Editor: Th. Scheper © Springer-Verlag Berlin Heidelberg; / *Biotechnology*, 68: 65-96.
- Mitchell DA, von Meien OF, Krieger N, Dalsenter FDH. (2004) A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17: 15-26.
- Montesinos R. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en cepas de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, 2008.
- Monzón A. (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de plagas*, 63: 95-103.
- Nambudripad R, Smith TF. (1996) Proteins. En: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. Copyright © by John Wiley & Sons, Inc.
- Oostra J, le Comte EP, van den Heuvel JC, Tramper J, Rinzema A. (2001) Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (1): 13-24.
- Osborne LS, Hoelmer K, Gerling D. (1990) Prospects for biological control of *Bemisia tabaci*. *IOBC/WPRS*, 13: 153–160.
- Ouedraogo A, Fargues J, Goettel MS, Lomer CJ. (1997) Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia* 137: 37–43.
- Ozcan SO, Jhonston M. (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (3): 554–569.
- Paccola-Meirelles LD, Azevedo JL. (1991) Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 57 (2): 172-176.
- Pandey A. (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81–84.
- Papagianni M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22: 189–259.
- Parvez S, Rajoka MI, Ahmed MN, Latif F, Shahid R, Malik KA. (1998) 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 43(1): 59-62.
- Paul GC, Thomas CR. (1996) A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51: 558-572.
- Pava-Ripoll M, Posada FJ, Momen B, Wang C, St Leger RJ. (2008) Increased pathogenicity against coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (*Aa1T*) gene. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 220-226.
- Pedigo LP. (1996) *Entomology and Pest Management*. Second Edition. Prentice Hall Inc.
- Pediolini PGA, Eng JK, Hubley R, Vogelzang M, Deutsch EW, Raught B, Pratt B, Nilsson E, Angeletti RH, Apweiler R. (2004) A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nature Biotechnology*, 22: 1459-1466.
- Pinto AS, Barreto CC, Schrank A, Ulhoa CJU, Vainstein MH. (1996) Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 322-327.
- Posada FJ, Vega FE. (2005) A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of Insect Science*, 5:37.
- Qazi SS, Khachatourians GG. (2007) Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 95: 48-59.
- Qazi SS, Khachatourians GG. (2008) Addition of exogenous carbon and nitrogen sources to aphid exuviae modulates synthesis of proteases and chitinase by germinating conidia of *Beauveria bassiana*. *Archives of Microbiology*, 189: 589–596.

- Quesada-Moraga E, Vey A. (2004) Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycological Research*, 108 (4): 441-452.
- Rahardjo YSP, Weber FJ, Le Comte EP, Tramper J, Rinzema A. (2002) contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid state fermentation system. *Biotechnology and bioengineering*, 78 (5): 539-544.
- Randez-Gil F, Sanz P, Entian KD, Prieto JA. (1998) Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 18 (5): 2940-2948.
- Rangel DEN, Anderson A, Roberts DW. (2008) Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological Research*, 112 (11): 1362-1372.
- Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW. (2006) Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 127–134.
- Rangel, DEN, Braga GUL, Flint SD. (2004) Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87 (2-3): 77-83.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): 597–635.
- Rehner SA, Buckley E. (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- $\alpha$  sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97 (1): 84–98.
- Roberts DW, St Leger RJ. (2004) *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 54. Copyright Elsevier Inc.
- Robledo y Monterrubio M, Loera O, Alatorre-Rosas R, Viniestra-González G. Obtención y caracterización de mutantes de *Beauveria bassiana* con luz UV y 2-deoxi-D-glucosa. V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Universidad de Chapingo. Chapingo, Edo. Mex. 2004.
- Rohde C, Alves LFA, Neves PMOJ, Alves SB, da Silva ERL, de Almeida JM. (2006) Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. isolates against *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biological Control*, 35 (2): 231-240.
- Romano J. Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, 1996.
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasouljan GR, Bandani AR, Butt TM. (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270: 116–123.
- Sallam MN. (2008) Insect damage: damage on post-harvest. En: *Compendium on post-harvest operations*. Edited by AGSI/FAO: INPhO. <http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/>
- Sanger F. (1952) The arrangement of amino acids in proteins. *Advances in Protein Chemistry*, 7:1-67.
- Santangelo GM. (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70 (1): 253–282.
- Santoro PH, Neves PMOJ, Alexandre TM, Alves LFA. (2007) Interference of bioassay methods on the results of entomopathogenic fungi selection for insect control. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (4): 483-489.
- Saucedo-Castañeda G, Trejo-Hernández MR, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S, Dufour D, Raimbault M. (1994) On line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process biochemistry*, 29: 13-24.
- Schmid-Hempel P. (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology*, 50: 529–551.
- Schomburg D., Schomburg I., Chang A., Bänisch C. BRENDA the Information System for Enzymes and metabolic Information. Universität zu Köln, Germany. (<http://www.brenda.uni-koeln.de/>). Revisado en enero de 2009.

- Scott RN, Cameron MD, Aust SD. Fungi for Biotechnology. Encyclopedia of Environmental Microbiology. Copyright © 2002 by John Wiley & Sons, Inc.
- Screen S, Bailey A, Charnley K, Cooper R, Clarkson J. (1997) Carbon regulation of the cuticle-degrading enzyme PR1 from *Metarhizium anisopliae* may involve a trans-acting DNA-binding protein CRR1, a functional equivalent of the *Aspergillus nidulans* CREA protein. *Current Genetics*, 31: 511–518.
- Screen SE, Hu G, St Leger RJ. (2001) Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78: 260-266.
- Shah FA, Wang CS, Butt TM. (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 251: 259-266.
- Shapiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstad DW, Kaya HK (2005) Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 1–7.
- Shea JF. Gender in factors influencing the infection of the beetle, *Tenebrio molitor* with the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. Ph. D. Thesis of The Ohio State University. 2003.
- SignalP. ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)). Revisado en enero de 2009.
- Silva RO, Silva HHG, Ulhoa CJ, Luz C. (2005) Is there a relationship between N-acetyl-β-D-glucosaminidase activity of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Hyphomycetes) isolates from peridomestic areas in Central Brazil and larvicidal effect on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 129 (3): 158-164.
- Small CL, Bidochka MJ. (2005) Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 109 (3): 307-313.
- Smith RJ, Pekrul S, Grula E. (1981) Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of entomopathogenic hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 335-344.
- Smits JP, Van Sousbeek HM, Tramper J, Knol W, Geelhoed W, Peeters M, Rinzema A. (1999) Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. *Bioprocess Engineering*, 20: 391-404.
- St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW. (1994a). Isoforms of the cuticle degrading Pr1 protease and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry, Biophysics*, 313 (1): 1-7.
- St Leger RJ, Bidochka MJ, Roberts DW. (1994b) Germination triggers of *Metarhizium anisopliae* conidia are related to host species. *Microbiology*, 140: 1651-1660.
- St Leger RJ, Charnley K, Cooper RM. (1986b) Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 85-95.
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. (1986a) Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 167-177.
- St Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK. (1987) Production of cuticle degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticles from *Calliphora vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of general Microbiology*, 133: 1371-1382.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW. (1996a) Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected cuticles. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1257-1264.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Rizzo NW, Roberts DW. (1996c) Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviridae* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (3): 907-912.
- St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. (1996b) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 93: 6349-6354.

- St Leger RJ, Joshi L, Roberts DW. (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2): 709-713.
- St Leger RJ, Roberts DW, Goettel M. (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate pathology*, 58: 168-179.
- St Leger RJ, Roberts DW, Staples RC. (1993) Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61: 81-84.
- St Leger RJ. (1995) The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogens of insects. *Canadian Journal of Botany*, 73 (1) s1119-s1125.
- St Leger RJ. (2007) *Metarhizium anisopliae* as a model for studying bioinsecticidal host pathogen interaction. En: M Vurro and J Gressel (Eds.) *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, 179–204. Springer, Cap. 9.
- St. Leger RJ, Durrands PK, Cooper RM, Charnley AK. (1988) Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Microbiology*, 150:413-416.
- Steenberg T, Jespersen JB. Entomopathogenic fungi for control of litter beetles. Lyngby, Denmark: Danish Pest Infestation Laboratory. Annual Report; 1996, 65p.
- Sun MH, Liu XZ. (2006) Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 161: 295–305.
- Suzuki A, Sarangbin S, Kirimura K, Usami S. (1996) Direct production of citric acid from starch by a 2-deoxyglucose-resistant mutant strain of *Aspergillus niger*. *Ferment Bioeng*, 81(4): 320-323.
- Talaei-Hassanlou R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M, Mozaffari J. (2006) Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*, 16 (5): 525-534.
- Talaei-Hassanlou R, Kharazi-pakdel A, Goettel MS, Little S, Mozaffari J. (2007) Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94 (2): 102-107.
- Tanada Y, Kaya HK. (1993) *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. USA. pp. 666.
- Tartar A, Boucias DG. (2004) A pilot-scale expressed sequence tag analysis of *Beauveria bassiana* gene expression reveals a tripeptidyl peptidase that is differentially expressed *in vivo*. *Mycopathologia* 158: 201–209.
- Tartar A, Shapiro AM, Scharf DW, Boucias DG. (2005) Differential expression of chitin synthase (CHS) and glucan synthase (FKS) genes correlates with the formation of a modified, thinner cell wall in *in vivo*-produced *Beauveria bassiana* cells. *Mycopathologia*, 160: 303–314.
- Tax Browser, The National Center for Biotechnology information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi)). Enero 2009.
- Tenjo FA, Hamer JE. (2002) Pathogenic Development in *Magnaporthe grisea* In *Molecular biology of fungal development*. H Osiewacz (Ed.) Frankfurt, Germany.
- The National Center for Biotechnology information (NCBI). ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Enero 2009.
- Thomas KC, Khachatourians GG, Ingledew W. (1987) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 33: 12-20.
- Thomas MB, Read AF. (2007) Bioinsecticide with a sting. *Nature Biotechnology* 25, 1367-1368.
- Tronsmo A, Harman G. (1993) Detection and quantification of N-acetyl-β-D-glucosaminidase, chitobiosidase, and endochitinase in solutions and in gels. *Analytical Biochemistry*, 208: 74-79.
- van Lenteren JC. (2006) IOBC Internet Book of Biological Control. Version 4. Editor: JC van Lenteren. 118 p.
- Varela A, Morales E. (1996) Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67: 147-152.
- Vega FE, Posada F, Aime C, Pava-Ripoll M, Infante F, Rehner SA. (2008) Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46: 72–82.
- Vergara R. Empleo de hongos entomopatógenos en programas de manejo de plagas en Colombia. Memorias de taller de hongos, UIS, Bucaramanga, Colombia. 2000.

- Vestergaard S, Butt TM, Bresciani J, Gillespie AT, Eilenberg J. (1999) Light and electron microscopy studies of the infection of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 25-33.
- Vestergaard S, Gillespie AT, Butt TM, Schreiter G, Eilenberg J. (1995) Pathogenicity of the Hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 185-192.
- Vey A, Hoagland RE, Butt TM. (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: *Fungi as Biocontrol agents*. CAB international; Cap 12, 311-342.
- Viaud M, Couteaudier Y, Riba G. (1998) Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (1): 88-93.
- Viniegra-González G, Favela-Torres E. (2006) *Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression?. Food Technology and Biotechnology*, 44 (3): 397-406.
- Wang C, Butt TM, St Leger RJ. (2005a) Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology*, 151: 3223-3236.
- Wang C, Duan Z, St Leger RJ (2008) MOS1 Osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect host hemolymph. *Eukaryotic Cell*, 7 (2): 302-309.
- Wang C, Hu G, St Leger RJ. (2005b) Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 704-718.
- Wang C, St Leger RJ. (2006) A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (17): 6647-6652.
- Wang C, St Leger RJ. (2007a) The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*, 6 (5): 808-816.
- Wang C, St Leger RJ. (2007b) The *Metarhizium anisopliae* perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (29): 21110-21115.
- Wang C, St Leger RJ. (2005) Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell*, 4 (5): 937-947.
- Watanabe T, Kimura K, Sumiya T, Nikaidou N, Suzuki N, Suzuki M, Taiyoji M, Ferrer S, Regue M. (1997) Genetic analysis of the chitinase system of *Serratia marcescens* 2170. *Journal of Bacteriology*, 179 (22): 7111-7117.
- Weatherly DB, Atwood JA, Minning TA, Covala C, Tarleton RL, Orlando R. (2005) A heuristic method for assigning a false-discovery rate for protein identifications from Mascot database search results. *Molecular & Cell Proteomics*, 4: 762-772.
- Westergaard SL, Oliveira AP, Bro C, Olsson L, Nielsen J. (2007). A systems biology approach to study glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 96 (1):134-145.
- Westwood GS, Huang SW, Keyhani NO. (2005). Allergens of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Clinical and Molecular Allergy*, 2005, 3:1.
- Willer H, Minou Y. (2007) *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends*. 9th edition, Willer, H and Minou Y (Eds.) International Federation of Organic Agriculture Movements IFOAM, Bonn, Germany & Research Institute of Organic.
- Wraight SP, Jackson MA, de Kock SL. (2001) Cap 10, Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: *Fungi as Biocontrol Agents*. CAB international 2001. TM Butt, C Jackson and N. Magan (Eds.).
- www.babylon.com/definicion/pleiotropic/Spanish, Revisado en abril de 2009
- Yeo H, Pell JK, Alderson PG. (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Management Science*, 59 (2): 156-165.

- Zhang W, Yueqing C, Yuxian X. (2008) Cloning of the subtilisin Pr1A gene from a strain of locust specific fungus, *Metarhizium anisopliae*, and functional expression of the protein in *Pichia pastoris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2481-2488.
- Zhu Y, Smits JP, Knol W, Bol J. (1994) A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters*, 16 (6): 643-648.
- Zimmerman G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, 17 (6): 553–596.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts IM, Van T Riet K. (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (6): 1875-1881.

## **ANEXOS**

**ANEXO A: *Publicación***

## **ANEXO B: *Definiciones***

**Agro ecosistema:** Ecosistema modificado por el hombre para satisfacer sus necesidades alimenticias. Este puede ser altamente inestable, disminuyendo la diversidad biológica local, puesto que la agricultura comercial tiende a ser genéticamente uniforme, predisponiendo así a la presencia de plagas.

**Epizootia:** Enfermedad infecciosa de un gran número de individuos de una o más especies de animales (insectos, en el presente estudio) que ocurre transitoriamente en una localidad, como consecuencia de la búsqueda del balance en el ecosistema que había antes de existir el agro ecosistema.

**Plaga:** Término antropocéntrico y circunstancial, se refiere a las especies que aumentan en número de población hasta causar pérdidas económicas.

**Nivel de daño económico:** Es la cantidad de daño que justifica el uso de control artificial de la plaga.

**Control natural:** Mantenimiento de la densidad de una población dentro de ciertos límites donde no se presenta daño económico, durante un período de tiempo, como consecuencia de la acción combinada de todos los factores (bióticos y abióticos) del ambiente.

**Control:** Supresión independiente de la densidad, debido a los factores de mortalidad abióticos.

**Regulación:** Supresión dependiente de la densidad, son los factores de mortalidad bióticos.

**Control biológico clásico:** Introducción de un ACB de nuevas especies para el control de plagas exóticas (Greathead y Waage, 1983).

**Control biológico por conservación:** Conservar y promover la actividad, sobrevivencia y reproducción de los enemigos naturales nativos o ya presentes en un cultivo.

**Control biológico por incremento:** Cuando los enemigos naturales son biológicamente efectivos, pero fallan en controlar a las plagas. Puede ser inoculativa o inundativa.

(Barrera, 2007; Pedigo, 1996; Greathead y Waage, 1983).

**Patología de insectos y control microbiano:** Estos términos no son sinónimos pues este último se refiere al estudio de las enfermedades para el control de poblaciones de insectos dañinos, mientras que el primero se trata de las enfermedades de los insectos en general.

**Hospedero:** Término empleado para designar al organismo que alberga a otro en su interior.

**Patógeno:** Concepto usado para designar al microorganismo capaz de producir enfermedad en el hospedero susceptible, bajo condiciones ambientales favorables.

**Enfermedad:** Condición en la que se pierde el equilibrio fisiológico del hospedero (insecto) con su ambiente. Los factores que alteran la salud de un insecto son abióticos y bióticos e infecciosos (Gallegos, 2004)

**Infectividad:** Capacidad de un hongo para vencer las defensas del hospedero y establecerse en él, se expresa como el número de hospederos infectados por número de hospederos expuestos.

**Patogenicidad:** Cualidad del agente de causar enfermedad en una población infectada, es un término cualitativo.

**Virulencia:** Grados de intensidad y rapidez con que un patógeno causa una enfermedad, se distribuye y mata a su hospedero (Gallegos, 2004). Cuantifica la patogenicidad en términos de  $TL_{50}$ ,  $DL_{50}$  o  $CL_{50}$ .

**$TL_{50}$ :** Tiempo requerido para causar el 50% de la muerte en la población experimental.

**$DL_{50}$ :** Dosis de microorganismos requeridos para causar el 50% de la muerte en la población experimental.

**$CL_{50}$ :** Concentración de microorganismos requeridos para causar el 50% de la muerte en la población experimental.

**Invasividad:** Capacidad del hongo para penetrar a diversos tejidos y órganos del hospedero.

**Toxigenicidad:** Capacidad del hongo para sintetizar y liberar sustancias genéricamente denominadas toxinas, las cuales dañan a las células del hospedero o neutralizan sus defensas (Dubos, 1945 en Shapiro-Ilan y col., 2005)

**Etapa (stage):** Estado de desarrollo del insecto. Huevo, larva, pupa, adulto.

**Estadio (Stadium):** Etapa de desarrollo de los insectos, delimitado por la muda o ecdisis.

**Instar:** Se refiere a la fase entre una muda y la siguiente (L1, L2,...)

**Resiliencia:** Propiedad de la cutícula, significa que la energía cinética puede ser almacenada como energía potencial y liberada posteriormente de nuevo como energía cinética.

**Cepa:** Variante genotípica de una especie, usualmente propagada.

**Mutación pleiotrópica** Es el fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados (Babylon dictionary).

### **ANEXO C: Aclaración sobre las cepas estudiadas**

Montesinos (Comunicación personal, 2009) realizó la secuenciación del segmento ITS1-5.8S-ITS2, incluyendo parcialmente el 28S de la cepa 88. El resultado del análisis de BLAST de The National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) permitió encontrar el 99% de similitud con *Cordyceps bassiana* (Accession number: EF411234)

Por lo anterior, las cepas empleadas en esta tesis se clasifican como *Beauveria (Cordyceps) bassiana*, y corresponden a los aislados 88 y 885.2 publicados en Rodríguez-Gómez y col., 2009.

Además debido a una confusión en el grupo de trabajo, la cepa mutante aquí llamada 885.2, fue mencionada por Robledo y Monterrubio y col. (2004) como la cepa (aislado) 882.5.

**ANEXO D: Balance de material sólido y líquido para cultivo en medio sólido en columna**

**Nomenclatura usada en las Tablas**

Medios de cultivo	
<b>GN</b>	Glucosa y sulfato de amonio
<b>QCS</b>	Quitina coloidal
<b>QGNS</b>	Quitina coloidal con glucosa y sulfato de amonio
<b>CHA</b>	Cutícula de chapulín
<b>ST</b>	Salvado de trigo sin sales
<b>STS</b>	Salvado de trigo con sales

<b>Mt</b>	Materia total
<b>Ms</b>	Materia seca
<b>Mh</b>	Materia húmeda
<b>H</b>	Humedad
<b>MM</b>	Medio mínimo
<b>SS</b>	Soporte sólido
<b>Inoc</b>	Inóculo
<b>D</b>	Densidad
<b>F</b>	Fracción
<b>i</b>	inicial

**Tabla I** Variables incluidas en el cálculo de los balances de materiales de CMS

Medio	Mt	H	1-%H	Ms (SS+MM)	Mh (MM+i)	MM	MM	SS	agua/SS	sustrato	F sólidos	F agua
	g	%	%	g	g	g	ml	g	ml / g	g	g / ml	g / ml
<b>GN</b>	30	80	0.2	6	24	1.25	24	4.75	5.05	0.68	0.05	0.95
<b>QCS</b>	30	80	0.2	6	24	0.89	24	5.11	4.70	0.48	0.04	0.96
<b>QGNS</b>	30	80	0.2	6	24	1.17	24	4.83	4.97	0.60	0.05	0.95
<b>CHA</b>	30	80	0.2	6	24	1.93	25	4.07	5.89	1.50	0.08	0.92
<b>ST</b>	30	80	0.2	6	24	1.47	24	4.53	5.30	1.14	0.06	0.94
<b>STS</b>	30	80	0.2	6	24	1.93	25	4.07	5.89	1.50	0.08	0.92

**Tabla II** Balance de materiales del CMS para la determinación del tipo de PUF a usar en las cinéticas de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares

Columna	Mt	H	Ms (SS +MM)	Mh (MM+inoc)	SS	MM	agua / PUF	cutícula
	g	%	g	g	g	ml	g / g	g
1	8.8	76.68	2.06	6.76	1.53	6.29	4.41	0.38
2	10	77.39	2.27	7.76	1.65	7.38	4.70	0.44
3	5	70.32	1.48	3.52	1.26	2.75	2.80	0.16
4	8.9	74.84	2.23	6.64	1.72	6.15	3.86	0.37

**Tabla III** Balance de materiales del CMS para los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre la cutícula de chapulín

Columna	Cepa	Mt g	H %	Ms G	Mh g	SS g	MM ml	agua / PUF g / g	cutícula g
1	88	15.96	80.11	3.17	12.79	2.10	12.86	26.64	0.77
2	88	15.97	80.47	3.12	12.85	2.04	12.93	26.78	0.78
3	885.2	15.97	79.77	3.23	12.74	2.16	12.81	26.55	0.77
4	885.2	15.96	79.25	3.31	12.65	2.25	12.71	26.36	0.76

**Tabla IV** Condiciones de operación de CMS de los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre la cutícula de chapulín

Columna	Cepa	Mt i g	D empaque g / ml	H i %	Flujo aire ml / min	a <sub>w</sub>
1	88	15.96	0.51	80.1	30	0.98
2	88	15.97	0.51	81.25	25	0.98
3	885.2	15.97	0.51	79.77	25	0.98
4	885.2	15.96	0.51	79.25	25	0.98

**Tabla V** Balance de materiales de CMS para los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre diversos sustratos

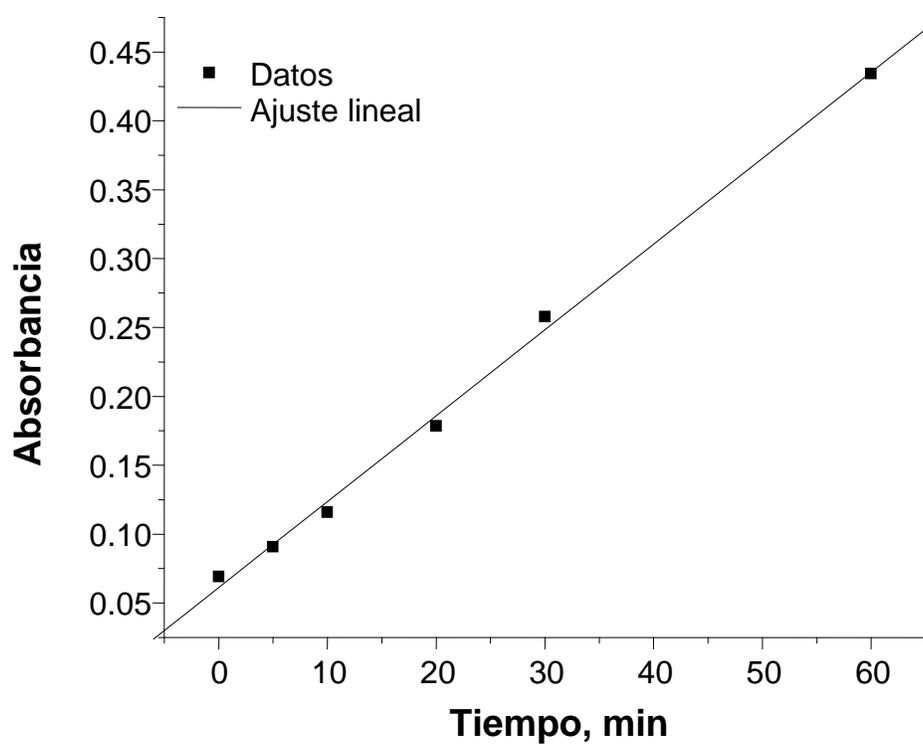
Cepa	Medio	Mt g	Ms g	Mh g	SS g	MM ml	agua/PUF g / g	Sustrato g
88	GN	32 ± 2.7	6.5 ± 0.6	25.5 ± 2.2	4.7 ± 0.4	23.3 ± 2.4	5.5 ± 0.03	1.4 ± 0.1
885.2	GN	32.3 ± 2.4	7.3 ± 0.5	25 ± 1.9	5.6 ± 0.4	22.7 ± 2	4.5 ± 0.02	1.4 ± 0.12
88	QCS	32.3 ± 2.4	6.2 ± 0.5	26.2 ± 1.9	5.3 ± 0.4	23 ± 2	4.9 ± 0.01	0.5 ± 0.04
885.2	QCS	32 ± 2.4	6.2 ± 0.5	25.8 ± 1.9	5.3 ± 0.4	22.7 ± 2	4.8 ± 0.01	0.45 ± 0.04
88	QGNS	30.2 ± 3.3	5.8 ± 0.6	24.4 ± 2.7	4.7 ± 0.5	21.4 ± 2.8	5.1 ± 0.03	0.5 ± 0.07
885.2	QGNS	31.1 ± 1.9	6.1 ± 0.4	25 ± 1.5	5.1 ± 0.3	22.1 ± 1.6	4.9 ± 0.01	0.5 ± 0.04
88	CHA	32.1 ± 2.4	6.7 ± 0.5	25.4 ± 1.9	4.9 ± 0.35	23.2 ± 2.1	5.1 ± 0.03	1.4 ± 0.13
885.2	CHA	32 ± 2.5	6.6 ± 0.5	25.4 ± 2.02	4.8 ± 0.35	23.2 ± 2.2	5.3 ± 0.03	1.4 ± 0.13
88	ST	19.8 ± 0.8	4.8 ± 0.2	15 ± 0.6	4 ± 0.2	14.8 ± 0.6	3.8 ± 0	0.9 ± 0.04
885.2	ST	19.4 ± 0.5	4.4 ± 0.1	15 ± 0.4	3.4 ± 0.08	15 ± 0.4	4.4 ± 0	0.9 ± 0.02
88	STS	19.9 ± 0.1	3.8 ± 0.02	16 ± 0.08	2.6 ± 0.01	16.3 ± 0.1	6.2 ± 0	1 ± 0.01
885.2	STS	20.1 ± 0.4	4.2 ± 0.08	16 ± 0.3	3 ± 0.05	16.1 ± 0.3	5.4 ± 0	1 ± 0.02

**Tabla VI** Condiciones de operación de CMS de los experimentos de cinética de producción de enzimas hidrolíticas extracelulares sobre diversos sustratos

Cepa	Medio	Mt g	H i %	D empaque g / ml	pH final	Flujos ml/min	Aire ml / min
88	GN	32 ± 2.7	81.12	0.6 ± 0.05	6.1 ± 0.05	13.6 ± 2.8	11.2 ± 0.3
885.2	GN	32.3 ± 2.4	77.6	0.6 ± 0.03	5.7 ± 0.9	15 ± 0.6	
88	QCS	32.3 ± 2.4	80.88	0.6 ± 0.03	7.1 ± 0.08	17.7 ± 1.63	20.3 ± 1.5
885.2	QCS	32 ± 2.4	80.65	0.6 ± 0.05	7.1 ± 0.01	16.7 ± 1.5	
88	QGNS	30.2 ± 3.3	80.8	0.6 ± 0.05	6.5 ± 0.06	14.5 ± 3.2	17 ± 1.3
885.2	QGNS	31 ± 2	80.3	0.6 ± 0.03	6.8 ± 0.02	11.5 ± 7.6	
88	CHA	32 ± 2.4	80.3	0.6 ± 0.05	7.2 ± 0.4	13.1 ± 0.14	11.2 ± 0.3
885.2	CHA	32 ± 2.5	79.7	0.6 ± 0.04	7.24 ± 0.3	15.3 ± 2.4	
88	ST	19.8 ± 0.8	75.54	0.5 ± 0	6.2 ± 0.02	11.2 ± 1	14.6 ± 0.9
885.2	ST	19.4 ± 0.5	77.60	0.45 ± 0.02	4.4 ± 0.01	13.5 ± 2.1	
88	STS	19.9 ± 0.1	80.68	0.5 ± 0.04	6.6 ± 0.05	12.1 ± 1.3	
885.2	STS	20.1 ± 0.4	79.05	0.6 ± 0.01	6.1 ± 0.12	12.2 ± 1.7	

**ANEXO E: Evaluación de la linealidad del p-nitrofenol en el tiempo de análisis**

Tiempo, min	Absorbancia
0	0.0691
5	0.0909
10	0.1158
20	0.1784
30	0.2579
60	0.4342



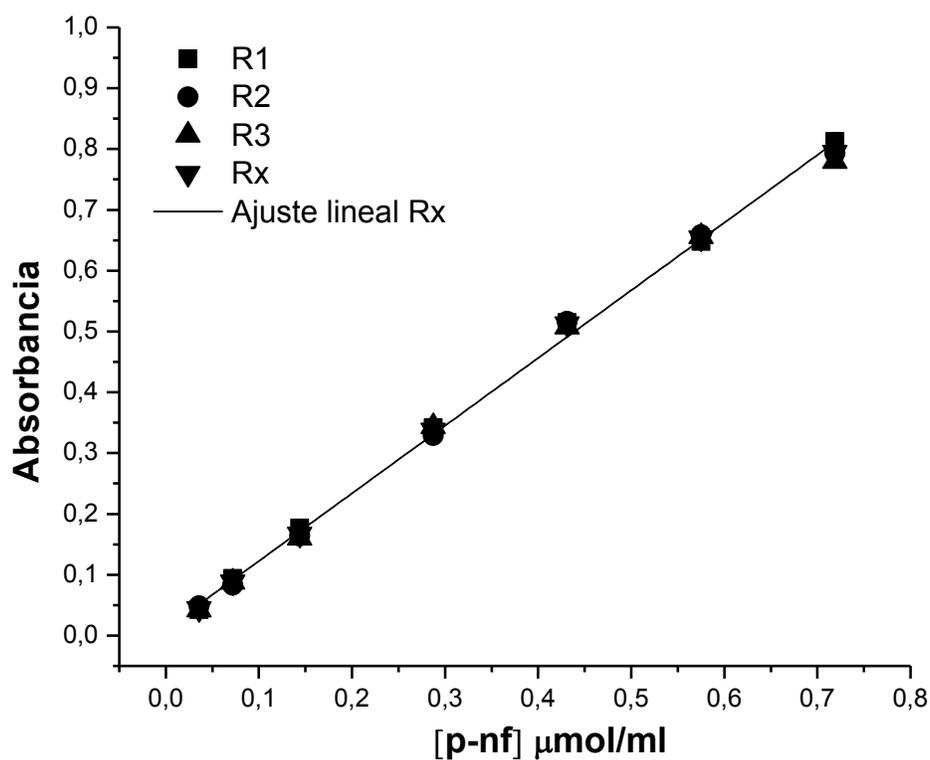
$$Y = 0.0062x + 0.061$$

$$R^2 = 0.99854$$

$$P < 0.0001$$

**ANEXO F: Curva estándar de p-nitrofenol para la determinación de hexosaminidasas**

[p-nf] µg/ml	[p-nf] µmol/ml	Abs R1	Abs R2	Abs R3	Abs promedio, Rx
5	0.0359	0.0427	0.0484	0.0421	0.0421
10	0.0719	0.0939	0.0825	0.0877	0.0877
20	0.1438	0.1765	0.1635	0.1604	0.1604
40	0.2876	0.3418	0.3287	0.3434	0.3434
60	0.4313	0.5143	0.5163	0.507	0.507
80	0.5751	0.6479	0.6592	0.6558	0.6558
100	0.7189	0.8127	0.7927	0.7796	0.7796



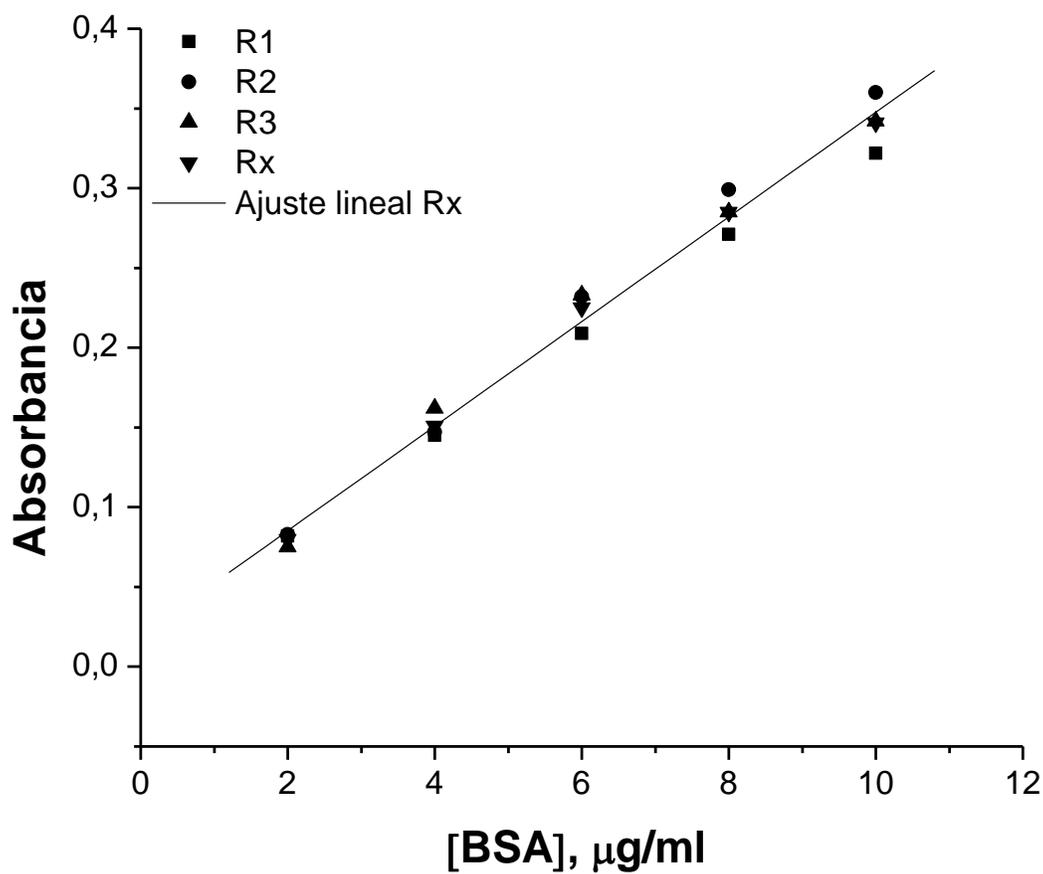
$$Y = 0.0079x + 0.011$$

$$R^2 = 0.9985$$

$$P < 0.0001$$

**ANEXO G: Curva estándar de albúmina sérica bovina para la determinación de proteína**

[BSA] µg / ml	Abs R1	Abs R2	Abs R3	Abs promedio, Rx
2	0.082	0.083	0.075	0.080
4	0.145	0.147	0.162	0.151
6	0.209	0.232	0.233	0.225
8	0.271	0.299	0.285	0.285
10	0.322	0.360	0.342	0.341



$$Y = 0.033x + 0.02$$

$$R^2 = 0.998$$

$$P < 0.0001$$

**ANEXO H: Determinación de la porosidad volumétrica de las partículas de poliuretano molido**

**Tabla VII.** Datos experimentales de la determinación de la porosidad del PUF molido

Diámetro (d)	Peso de PUF	Peso 2 ml agua	peso PUF + agua	$\rho_0$ PUF	Volumen PUF
mm	g	g	g	g ml-1	ml
<b>1.5</b>	0.08	1.96	2.046	2.29	0.0354
<b>0.8</b>	0.14	1.94	2.078	2.33	0.0587
<b>0.52</b>	0.20	1.89	2.099	1.94	0.1052
<b>0.297</b>	0.34	1.86	2.199	2.45	0.1375

## **ANEXO I: Modelos de crecimiento en CMS y desarrollo del modelo doble exponencial**

Los datos experimentales del crecimiento fúngico en medio sólido se utilizaron para estimar todos los parámetros cinéticos por ajuste a los diferentes modelos, usando el programa Origin 8.0 y la herramienta Solver que utiliza un ajuste de suma mínima de errores (Excel 2007, Microsoft Windows).

El crecimiento fúngico se ajustó por las ecuaciones de los modelos: Logístico (Mitchell, 2004), el modelo de Gompertz (Zwietering y col., 1990), el modelo de dos fases desarrollado por Ikasari y Mitchell (2000) y el modelo doble exponencial (DE) propuesto en este trabajo. Las cuales se describen a continuación:

### **Ecuación Logística**

La forma diferencial de la ecuación es:  $\frac{dX}{dt} = \mu_m \left[ 1 - \frac{X}{X_m} \right] X$  (Ecuación 9)

La forma integral está dada por:  $X = \frac{X_m}{\left( 1 + \frac{X_m - X_0}{X_0} \right) e^{-\mu t}}$  (Ecuación 10)

Donde,  $X$ = Concentración de biomasa en tiempo  $t$  ( $g\ l^{-1}$ );  $X_m$ = Valor máximo de la concentración de la biomasa  $\left( \frac{dX}{dt} = 0 \right)$  ( $g\ l^{-1}$ );  $\mu_m$ = Tasa específica de crecimiento máxima,

$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$  medida cuando  $0 < X < X_m$  ( $h^{-1}$ );  $X_0$ = Concentración inicial de biomasa en  $t=t_0$  ( $g\ l^{-1}$ );  $t$ = Tiempo (h).

### **Ecuación Gompertz**

De la misma forma, el crecimiento se puede representar por la ecuación de Gompertz, la

forma diferencial es:  $\frac{dX}{dt} = \mu_m \ln \left( \frac{X_m}{X} \right)$  (Ecuación 11)

La forma integral está dada por:  $X = X_m e^{(-be^{-\mu t})}$  (Ecuación 12)

Donde,  $X$ = Concentración de biomasa en tiempo  $t$  ( $g\ l^{-1}$ );  $X_m$ = Valor máximo de la concentración de la biomasa  $\left(\frac{dX}{dt} = 0\right)$  ( $g\ l^{-1}$ );  $\mu_m$ = Tasa específica de crecimiento máxima,

$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$  medida cuando  $0 < X < X_m$  ( $h^{-1}$ );  $t$ = Tiempo (h);  $b$ = Parámetro de integración.

### **Modelo de dos fases desarrollado por Ikasari y Mitchell para el crecimiento microbiano en membrana**

Este modelo considera dos fases: Una de crecimiento exponencial y otra de desaceleración del crecimiento, con las correspondientes velocidades de cada fase. Incluye también, un factor  $L$  que se describe como el factor de sobrevivencia de la punta hifal, determinada por los segmentos activos entre los segmentos inactivos, inmediatamente después de iniciada la fase de desaceleración (Mitchell y col., 2004).

Durante la fase de crecimiento exponencial, la forma diferencial del modelo es:  $\frac{dX}{dt} = \mu X$

(Ecuación 13)

Y la forma integral del modelo está dada por:  $X = X_0 e^{\mu t}$  (Ecuación 14)

Durante la fase de desaceleración o decaimiento, la forma diferencial del modelo está dada

por:  $\frac{dX}{dt} = \left[ \mu L e^{-k(t-t_a)} \right] X$  (Ecuación 15)

Y la forma integral del modelo durante esta fase es:  $X = X_a \exp \left[ \frac{\mu L}{k} (1 - e^{-k(t-t_a)}) \right]$

(Ecuación 16)

Donde,  $\mu$ = Tasa específica de crecimiento basada en la concentración de biomasa activa ( $h^{-1}$ );  $X$ = Concentración de biomasa en tiempo  $t$ ;  $X_0$ = Concentración inicial de biomasa en  $t=t_0$ ;

$t$ = Tiempo (h);  $L$ = Tasa específica de decaimiento, entre la tasa específica de crecimiento;  $k$ = Constante específica de decaimiento (tasa de autodestrucción del metabolismo respiratorio) ( $h^{-1}$ ) en modelo I-M;  $t_a$ = Tiempo en inicio de la fase de desaceleración (h).

### **Aplicación del modelo de I-M al crecimiento de *Beauveria bassiana* en CMS**

Debido a que el crecimiento en CMS se compone de dos fases, la fase de crecimiento exponencial y una fase de desaceleración de la tasa de formación de  $CO_2$ . La primera etapa puede representarse como un modelo de crecimiento exponencial clásico; mientras que la fase de disminución de formación de  $CO_2$  se puede representar como un modelo de desaceleración de primer orden modificado, el cual se explica más adelante. Es decir, la biomasa total está formada por una parte activa y una parte inactiva.

En el caso de estimar el crecimiento en forma indirecta a través de la medición de  $CO_2$ , es necesario considerar, que  $\frac{Y_{CO_2}}{X} \approx$  constante, asumiendo ésto, se tiene:

$$\frac{dCO_2}{dt} = Y_{\frac{CO_2}{X}} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Donde  $r = Y_{\frac{CO_2}{X}} \mu$ , entonces:

$$\frac{dCO_2}{dt} = rX \quad (\text{Ecuación 18})$$

La forma integral del modelo exponencial clásico que utiliza el modelo I-M está dada por:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Asimismo, la forma integral de la ecuación de producción de  $CO_2$  en la fase de crecimiento exponencial, es decir, cuando  $t < t_a$ ;  $X_c \sim X_t$ ; (biomasa activa ~ biomasa total), se obtiene al sustituir la ecuación 14 en la ecuación 18:

$$\boxed{\frac{dCO_2}{dt} = r \left[ X_0 e^{\mu t} \right]} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Por otra parte, la forma diferencial de la ecuación de disminución de la producción de CO<sub>2</sub> durante la fase de inactivación de la biomasa, es decir cuando  $t > t_a$ ;  $X_c < X_t$ ; se puede presentar de la siguiente manera, al expresar la ecuación de Ikasari-Mitchell (Ecuación 15) en términos de la biomasa activa ( $X_c$ ):

$$\begin{aligned} \frac{1}{X_c} dX_c &= -\mu L e^{-k(t-t_a)} dt \\ \int_{X_a}^{X_c} \frac{1}{X_c} dX_c &= -\mu L \int_{t_a}^t e^{-k(t-t_a)} dt \\ \ln\left(\frac{X_c}{X_a}\right) &= \frac{\mu L}{k} [e^{-k(t-t_a)} - 1] \\ \frac{X_c}{X_a} &= \exp\left[\frac{\mu L}{k} (e^{-k(t-t_a)} - 1)\right] \\ X_c &= X_a \exp\left[-\frac{\mu L}{k} (1 - e^{-k(t-t_a)})\right] \end{aligned} \quad \text{(Ecuación 20)}$$

Se sustituyó la ecuación 20 en la ecuación 18, teniendo en cuenta que  $X_c \sim X_t$ ; (biomasa activa ~ biomasa total)

$$\frac{dCO_2}{dt} = r'X \quad \text{(Ecuación 17)}$$

$$\boxed{\frac{dCO_2}{dt} = r' \left[ X_a \exp\left(-\frac{\mu L}{k} (1 - e^{-k(t-t_a)})\right) \right]} \quad \text{(Ecuación 21)}$$

Para esta fase, se asume que  $\frac{Y_{CO_2}}{X} \approx$  constante y que  $r' = \frac{Y_{CO_2}}{X} k$ .

Las ecuaciones 19 y 21 se utilizaron para los ajustes de los datos en la forma integral, en la etapa previa y posterior a  $t_a$ , respectivamente.

Cabe hacer notar que el modelo de I-M fue desarrollado en un sistema experimental de crecimiento micelial sobre membranas, y el modelo fue validado usando mediciones de biomasa. Mientras que para el presente caso, el modelo fue validado utilizando mediciones en línea y en tiempo real de la tasa de formación de CO<sub>2</sub>. Esta tasa es decreciente durante la fase de desaceleración conforme el cultivo avanza en el tiempo, razón por la cual se introdujo un signo negativo en el modelo originalmente propuesto por Ikasari y Mitchell (2000).

Donde,  $r$ = Coeficiente de unidades de CO<sub>2</sub> producidas por unidad de biomasa por hora durante la fase de crecimiento exponencial (mg CO<sub>2</sub> \* g<sup>-1</sup> X h<sup>-1</sup>);  $r'$ = Coeficiente de unidades de CO<sub>2</sub> producidas por unidad de biomasa por hora durante la fase de desaceleración del

crecimiento (mg CO<sub>2</sub> \* g<sup>-1</sup> X h<sup>-1</sup>);  $\frac{dCO_2}{dt}$  =Tasa de producción de CO<sub>2</sub> por gramo de materia

seca inicial por h (mg CO<sub>2</sub> \* h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>MSI);  $X$ = Concentración de biomasa en cualquier tiempo  $t$ ;

$X_0$ = Concentración inicial de biomasa en  $t=t_0$ ;  $\mu$ = Tasa específica de crecimiento basada en la concentración de biomasa activa (h<sup>-1</sup>);  $t$ = Tiempo (h);  $X_c$ = Concentración de biomasa

activa;  $L$ = Tasa específica de decaimiento, entre la tasa específica de crecimiento;  $k$ =

Constante específica de decaimiento del metabolismo respiratorio (h<sup>-1</sup>);  $t_a$ = Tiempo inicial de

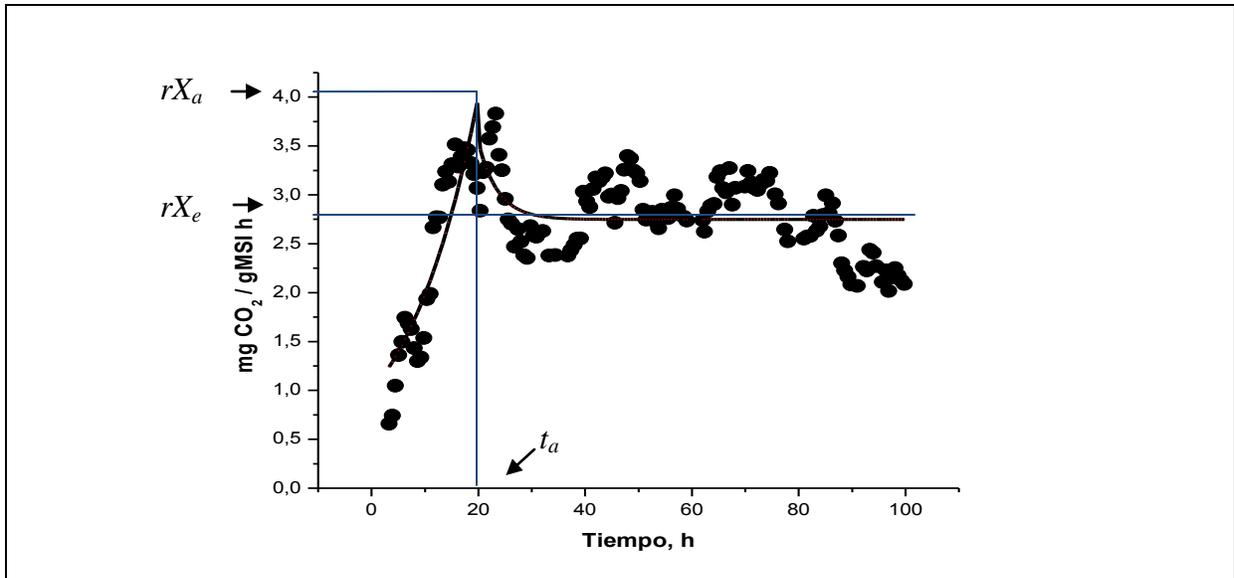
la fase de desaceleración (h);  $X_a$ = Concentración de biomasa en  $t=t_a$ ;  $X_t$ = Concentración de

la biomasa total, incluye biomasa activa y biomasa inactiva.

### **Modelo propuesto de doble exponencial (DE) para CMS**

Se realizó una modificación al modelo publicado por Ikasari y Mitchell (2000), para poder validarlo con los datos de CO<sub>2</sub> obtenidos y ajustado a los modelos de crecimiento Logístico y Gompertz. Posteriormente se obtuvo un modelo de crecimiento de dos fases que considera parámetros similares a los de Ikasari-Mitchell (I-M), pero incorpora nuevas variables considerando que después del tiempo  $t_a$  (transición metabólica) se inicia una fase de desaceleración que no vuelve a cero sino que se mantiene constante, es decir, una parte de la biomasa activa alcanza valores asintóticos en la curva de dCO<sub>2</sub>/dt vs. tiempo. Este modelo

ofrece parámetros con significado biológico asociados a las diferentes etapas del cultivo, como se muestra en la Figura G.1:



**Figura I.1** Definición de los parámetros en la etapa de crecimiento exponencial y crecimiento desacelerado para el cultivo en medio sólido

mg CO<sub>2</sub> \* h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>MSI =Tasa de producción de CO<sub>2</sub> por gramo de materia seca inicial por h;  
t<sub>a</sub>= Tiempo en inicio de la fase de desaceleración (h); rX<sub>a</sub>= Tasa de producción de CO<sub>2</sub> t=t<sub>a</sub>;  
rX<sub>e</sub>= Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en asintota, en la fase estacionaria, cuando ya terminó el proceso de crecimiento balanceado o exponencial; t<sub>0</sub>= Tiempo en inicio de la fase de crecimiento activo (h).

Se asumen las mismas consideraciones que en la sección de la aplicación del modelo I-M, es decir, que  $Y_{\frac{CO_2}{X}} \approx$  constante y que  $r = Y_{\frac{CO_2}{X}} \mu$ , entonces:

$$\frac{dCO_2}{dt} = Y_{\frac{CO_2}{X}} \frac{dX}{dt} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Este modelo propone una fase de crecimiento exponencial clásica y una fase de crecimiento desacelerado que describe una disminución de la biomasa activa ( $X_c$ ) hasta un valor asintótico ( $X_e$ ) que se refiere más adelante. La fase de crecimiento exponencial está

asociada a un parámetro específico de crecimiento ( $\mu$ ), y una constante específica de desaceleración ( $k$ ):

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu + b) \quad (\text{Ecuación 22})$$

La forma integral del crecimiento exponencial está dada por:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Entonces, la forma integral de la ecuación de producción de  $\text{CO}_2$  en la fase de crecimiento exponencial. Es decir, cuando  $t < t_a$ ;  $X_c \sim X_t$ ; (biomasa activa  $\sim$  biomasa total), se sustituyeron las ecuaciones 14 y 17 en la ecuación 22:

$$\boxed{\frac{d\text{CO}_2}{dt} = r [X_0 e^{\mu t}]} \quad (\text{Ecuación 19})$$

La etapa de disminución de la tasa de formación de  $\text{CO}_2$  se puede representar como un modelo de desaceleración de primer orden modificado. Es decir, la biomasa total está formada por una parte activa y una parte inactiva. La parte activa ( $X_c$ ) varía de un valor máximo,  $X_a$ , (cuando  $t = t_a$ ) hasta un valor asintótico  $X_e$ .

Recordando que la segunda fase es la de desaceleración de la biomasa activa, entonces en la ecuación 22,  $X = (X_c - X_e)$ ; por lo tanto, en esta etapa de desaceleración, el valor de

$\frac{dX}{dt}$  disminuye, para todo  $t > t_a$ , de la siguiente forma:

$$\frac{dX_c}{dt} = -b(X_c - X_e)$$

$$\frac{dX_c}{X_c - X_e} = -b dt$$

$$\int_{X_a}^{X_c} \frac{dX_c}{(X_c - X_e)} = -b \int_{t_a}^t dt$$

$$\ln \left( \frac{(X_c - X_e)}{(X_a - X_e)} \right) = -b(t - t_a)$$

$$(X_c - X_e) = (X_a - X_e) e^{-b(t-t_a)}$$

$$X_c = X_e + (X_a - X_e) e^{-b(t-t_a)}$$

(Ecuación 23)

Por último, se sustituyó la ecuación 23 en la ecuación 22 para esta fase, teniendo en cuenta que la biomasa activa es una parte de la biomasa total.

$$\frac{dX}{dt} = bX$$

(Ecuación 22)

$$\boxed{\frac{dCO_2}{dt} = r \left[ X_e + (X_a - X_e) e^{-b(t-t_a)} \right]}$$

(Ecuación 24)

Para esta fase, se asume que  $\frac{Y_{CO_2}}{X} \approx$  constante y que  $r' = \frac{Y_{CO_2}}{X} b$ .

Donde,  $\frac{dCO_2}{dt}$  = Tasa de producción de CO<sub>2</sub> por gramo de materia seca inicial por h (mg CO<sub>2</sub> \* h<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>MSI);  $r$  = Coeficiente de unidades de CO<sub>2</sub> producidas por unidad de biomasa por hora durante la fase de crecimiento exponencial (mg CO<sub>2</sub> \* g<sup>-1</sup> X h<sup>-1</sup>);  $r'$  = Coeficiente de unidades de CO<sub>2</sub> producidas por unidad de biomasa por hora durante la fase de desaceleración del crecimiento (mg CO<sub>2</sub> \* g<sup>-1</sup> X h<sup>-1</sup>);  $\mu$  = Tasa específica de crecimiento

basada en la concentración de biomasa activa ( $h^{-1}$ );  $X$ = Concentración de biomasa en cualquier tiempo  $t$ ;  $X_T$ = Concentración de la biomasa total, incluye biomasa activa y biomasa inactiva;  $X_0$ = Concentración inicial de biomasa en  $t=t_0$ ;  $t$ = Tiempo (h);  $X_c$ = Concentración de biomasa activa;  $b$ = Constante específica de decaimiento del metabolismo respiratorio ( $h^{-1}$ );

$X_e = X_a e^{\left(-\frac{\mu L}{k}\right)}$  Concentración de biomasa activa en asíntota, en la fase estacionaria, cuando ya terminó el proceso de crecimiento balanceado o exponencial;  $X_a$ = Concentración de biomasa en  $t=t_a$ ;  $t_a$ = Tiempo inicial de la fase de desaceleración (h);  $t_0$ = Tiempo inicial del cultivo (h).

**ANEXO J: Parámetros de ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, Ikasari-Mitchell y doble exponencial en CMS**

**Tabla J.1** Parámetros de ajuste de los modelos de crecimiento Logístico, Gompertz, I-M y DE en CMS sobre los medios **GNS, QCS, QGNS, CHA, ST y STS**

Medios	Parámetro	Cepa silvestre (88)				Cepa mutante (885.2)			
		Log.	Gomp.	I-M	DE	Log.	Gomp.	I-M	DE
<b>GNS</b>	$X_m$	109.2	115.6			495.5	146		
	$X_o$ $rX_o$	2.6		0.04	0.03	1.9		0.02	0.02
	$\mu$	0.07	0.04	0.09	0.1	0.04	0.02	0.05	0.06
	$t_a$			46.2	43			84	81.5
	$rX_a$			2.4	2.7			1.5	1.6
	$rX_e$				1.4		0.7		0.24
	$k$ $b$			0.17	0.14			0.06	0.03
	$\mu*L/k$			0.53				5.4	
<b>QCS</b>	$X_m$	94	120.7			56	96.4		
	$X_o$ $rX_o$	2.1		0.15	0.16	2.2		0.16	0.16
	$\mu$	0.04	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.01
	$t_a$			92	90.4			130	130
	$rX_a$			1.1	1.1			0.7	
	$rX_e$				0.66				NA
	$k$ $b$			0.02	0.09			NA	
	$\mu*L/k$			0.9				NA	
<b>QGNS</b>	$X_m$	80	95			33.1	39.5		
	$X_o$ $rX_o$	3.4		0.44	0.44	1.03		0.13	0.12
	$\mu$	0.05	0.03	0.02	0.02	0.06	0.03	0.03	0.03
	$t_a$			59	60.4			55	55
	$rX_a$			1.08	1.04			0.55	0.55
	$rX_e$				0.70				0.25
	$k$ $b$			0.004	0.015			0.03	0.06
	$\mu*L/k$			0.71				1.14	

<b>CHA</b>	$X_m$	172	210			176	190		
	$X_o$ $rX_o$	0.8		0.23	0.25	1.6		0.24	0.24
	$\mu$	0.09	0.05	0.06	0.05	0.1	0.06	0.08	0.08
	$t_a$			49.8	51.4			38	37
	$rX_a$			4,2	4			5.2	5.3
	$rX_e$				1.8				2,32
	$k$ $b$			0.01	0.03			0.01	0.04
	$\mu*L/k$			1.99				2.32	
<b>ST</b>	$X_m$	52	61		Y6	50	61.4		
	$X_o$ $rX_o$	0.65		0.09	0.08	0.7		0.03	0.02
	$\mu$	0.14	0.08	0.11	0.12	0.13	0.07	0.16	0.17
	$t_a$			25	26			27.6	27.6
	$rX_a$			2	2.14			2.5	2.3
	$rX_e$				1.20				0.98
	$k$ $b$			0.04	0.17			0.08	0.09
	$\mu*L/k$			0.99				0.91	
<b>STS</b>	$X_m$	57.7	73.4			59.3	73		
	$X_o$ $rX_o$	0.26		0.06	0.07	1		0.07	0.07
	$\mu$	0.2	0.08	0.12	0.11	0.12	0.07	0.11	0.11
	$t_a$			31.2	31.6			32	32
	$rX_a$			2.5	2.5			2.8	2.8
	$rX_e$				1.16				1.33
	$k$ $b$			0.07	0.13			0.11	0.16
	$\mu*L/k$			0.91				0.8	

$X_m$ = Concentración de biomasa máxima alcanzada (g l-1);  $X_o$ = Concentración inicial de biomasa en  $t=t_0$  en el modelo Logístico;  $rX_o$ = Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en  $t=t_0$  en los modelos I-M y DE;  $\mu$ = Tasa específica de crecimiento basada en la concentración de biomasa activa (h-1);  $t_a$ = Tiempo en momento inicial de la fase de desaceleración (h);  $rX_a$ = Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en  $t=t_a$ ;  $rX_e$ = Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en la asíntota;  $k, b$ = Constante específica de decaimiento (tasa de autodestrucción del metabolismo respiratorio) (h-1);  $\mu L/k$ = Parámetro de ajuste en modelo I-M.

## **ANEXO K: Publicaciones y Congresos relacionados con la tesis**

### **Publicaciones**

---

D. Rodríguez-Gómez, O. Loera, G. Saucedo-Castañeda y G. Viniegra-González. (2009) Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25, 513-518.

### **Memorias en congresos**

---

Rodríguez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. (2009) "Desarrollo de un modelo de dos fases para la respiración de *Beauveria bassiana* sobre cultivos en medio sólido" XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Acapulco, Guerrero. Presentación oral.

Rodríguez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. (2008) "Modificación de la fisiología y virulencia de *Beauveria bassiana* debido al medio de cultivo y al repase por *Tenebrio molitor*". XXXI Congreso Nacional de Control Biológico. Zacatecas, México. Presentación oral.

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

Rodríguez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. (2005) "Evaluación del crecimiento y morfología de cepas de *Beauveria bassiana* con virulencia distintas". XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Mérida, México. Cartel.

Rodríguez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. (2005) "Estimation of  $\mu$  for *Beauveria bassiana* on agar plates and its correlation with complex solid cultures". International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological control. Guanajuato, México. Cartel.

Rodríguez D., Loera O., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González G. (2004) "Caracterización enzimática de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* y su mutante en cultivo sólido" XXVII Congreso Nacional de Control Biológico. Los Mochis, México. Presentación oral.

### **Conferencias**

---

"Caracterización fisiológica de dos aislamientos de *Beauveria bassiana* en cultivo sólido, placa de Petri y relación con su virulencia". Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, México, 2007.

"Caracterización enzimática de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* y su mutante en cultivo sólido". Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, México, 2004.